

PARECER TÉCNICO Nº 2741/2010

Processo nº: 01200.001577/2010-25

Requerente: Fort Dodge Saúde Animal.

CQB: 244/08

CNPJ: 43.588.045/0001-31

Endereço: Rua Luis Fernando Rodriguez, 1701 Vila Boa Vista - Campinas/ São Paulo; CEP 13064-798; Fones: (19) 37456240 Fax: (19) 37456189.

Assunto: Solicitação de parecer sobre a biossegurança de organismo geneticamente modificado para atividades de importação, transporte, armazenamento e comercialização.

Extrato Prévio: 2368/10 publicado em 17/05/10

Reunião: 138ª Reunião ordinária da CTNBio, realizada em 17 de novembro de 2010

Decisão: DEFERIDO

EMENTA: O Responsável Legal da instituição solicitou à CTNBio parecer técnico sobre a biossegurança do organismo geneticamente modificado denominado Poulvac ST – Uma vacina viva contra *Salmonella typhimurium* para as atividades de importação, armazenamento, transporte e comercialização. O referido produto será importado pronto e acabado, sendo as etapas de produção, purificação e envase realizadas nos Estados Unidos (Iowa, EUA) pela empresa Fort Dodge Animal Health. Este produto está registrado no país de origem (EUA) desde 16 de maio de 2001, tendo tido desde então histórico de uso seguro. A CIBio da instituição afirma que a unidade operativa dispõe de infra-estrutura adequada e pessoal técnico competente para desenvolver com segurança as atividades propostas. A instituição é possuidora do Certificado de Qualidade em Biossegurança nº 244/08 emitido pela CTNBio em 2008 para as finalidades de importação, comercialização e armazenamento de produtos veterinários biológicos contendo organismos geneticamente modificados da classe de risco biológico I, conforme parecer CTNBio nº 1270/2008. O produto em questão é uma vacina, a partir de linhagem de *S. typhimurium* LT2 cepa 1545, onde os genes *aroA* e *serC* estão deletados. A demanda aromática conferida pela deleção do *aroA* resulta em uma incapacidade de crescimento em meios definidos sem suplementos aromáticos, como por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano e p-aminobenzoato (PABA). A necessidade de PABA, um metabólito não encontrado em tecidos de vertebrados resulta em uma atenuação do crescimento *in vivo*.

1. Informações Gerais

A contaminação de alimentos por *Salmonella* é um grave problema de saúde pública em todo o mundo. A bactéria pertence à família Enterobacteriaceae, e encontra-se amplamente distribuída na natureza, tendo como reservatórios naturais o trato intestinal do homem e de outros animais. Entre estes, destacam-se as aves, pois são portadores assintomáticos e eliminam constantemente a *Salmonella* pelas fezes. A transmissão ao homem ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com fezes de animais portadores (bovinos e aves) e através de ovos e leite. Normalmente, os casos de salmonelose estão associados ao consumo de produtos de origem aviária como ovos e carne mal cozidos. Em seres humanos, o aparecimento dos sintomas causados pela infecção por *Salmonella* iniciam de 6 a 48 h após a ingestão, e incluem diarreia intensa, vômitos, náuseas, dores abdominais e dores de cabeça intensas, que persistem de 2 a 7 dias.

Atualmente há no mercado vacinas tradicionais compostas pela bactéria inteira inativada por formalina, que são utilizadas para vacinação de aves e que apresentam proteção limitada por não conferirem imunidade significativa no trato

intestinal. Vacinas vivas atenuadas colonizam temporariamente o intestino e estimulam a imunidade local e sistêmica do animal vacinado, prevenindo a infecção.

A vacina proposta para liberação comercial, objeto deste parecer, contém a bactéria *Salmonella typhimurium* geneticamente modificada para ser utilizada como vacina viva para aves. A vacina é administrada em spray com gota grossa, com $1,1 \times 10^7$ UFC por dose a aves com apenas 1 dia de vida. O objetivo é proteger as aves contra infecção com *S. enteritidis*, *S. typhimurium* e *S. heidelberg*, apenas ocasionalmente patogênicas para aves jovens, mas que podem causar sérios problemas de saúde pública.

2. Descrição do OGM

O organismo parental é um isolado aviário de *Salmonella typhimurium*, cepa 82/6915, isolada de um frango em Victoria, Austrália em 1982. A modificação genética foi realizada por transdução bacteriófaga usando transdução p22 de aroA-554:Tn 10 de *S. typhimurium* LT2 cepa 1545 para a cepa selvagem. Inicialmente o alelo aroA-554:Tn10 da cepa *S. typhimurium* 1545 foi transferido para a cepa *S. typhimurium* 82/6915 e transdutores resistentes à tetraciclina foram selecionados. Os transdutores aroA-554:Tn10 cresceram em meio seletivo contendo tetraciclina. Colônias foram isoladas e selecionadas para a perda de resistência à tetraciclina. Um mutante sensível à tetraciclina que permaneceu auxotrófico para metabólitos aromáticos foi identificado. Este mutante mostrou ter sofrido deleção também no gene *serC*, adjacente ao *aroA*. Portanto, o organismo mutante apresenta deleção em dois genes, *aroA*- e *serC*-, sendo denominado cepa STM-1. O gene *aroA* codifica a proteína 3-fosfoenolpiruvilchiquimato-5-fosfatossintase, uma enzima da via de biossíntese de aminoácidos aromáticos. O gene *serC* codifica a fosfoserina aminotransferase, uma enzima da via biossintética de serina. A perda da função do gene *aroA* impede a biossíntese de metabólitos aromáticos, como tirosina, fenilalanina, triptofano, p-aminobenzoato (PABA) e 2,3-dihidroxibenzoato. O meio de cultura precisa ser suplementado com estes metabólitos para haver crescimento bacteriano. A exigência para PABA, um metabólito não encontrado em tecidos de vertebrados, resulta em retardamento do crescimento *in vivo*, já que este é exigido para proliferação bacteriana. A mutação em *serC* resulta em uma exigência de serina para crescimento. Fora do hospedeiro, o microrganismo mutante não é capaz de se replicar devido à necessidade da presença de serina, dos aminoácidos aromáticos e do PABA. Linhagens deficientes em genes desta rota metabólica permanecem nos tecidos do hospedeiro por alguns dias, mas sem causarem sintomas e terminam por serem eliminados por mecanismos de defesa imunológica.

3. Biossegurança do Produto

Análise do microrganismo GM conforme Resolução Normativa N° 5, de 12 de março de 2008 Anexo III

- Virulência da Semente máster

A semente máster foi produzida a partir de um frasco original da cultura STM-1 armazenado a -70°C . A cultura foi confirmada e testada quanto à pureza por coloração de Gram, PCR, perfil de plasmídeo, testes de antígenos, crescimento em meio Agar sangue, Agar XLD, Agar de MacConkey e TSI e caldos mínimos. Estudos de reversão à virulência demonstraram que o organismo *S. typhimurium* STM-1 não é virulento após uma série de cinco retropassagens em frangos. Estabilidade genotípica e fenotípica é elevada. A taxa de reversão para o mutante *aroA* é estimada ser $<10^{-11}$ e a taxa de reversão para o mutante *aroA* e *serC* $<10^{-18}$.

- **Avaliação de risco à Saúde Humana e Animal**

Foi realizado estudo para avaliar a possível reversão de virulência, demonstrando que a cepa *S. typhimurium* STM-1 não é virulenta após uma série de retropassagens em frangos. Em 5 dias após a inoculação, o conteúdo dos cecos das aves foram coletados e cultivados, demonstrando uma recuperação de até 60% em cada retropassagem. Não houve recuperação do microrganismo de quaisquer das aves não inoculadas mantidas em contato com as inoculadas em quaisquer das retropassagens. Em estudo de comparação de 21 dias, as aves inoculadas com o conteúdo cecal reunido da 5ª retropassagem ou com a semente mãe, não mostraram quaisquer sinais clínicos de doença típica de *S. typhimurium*. Concluiu-se que a cepa vacinal não reverteu a virulência através das 5 retropassagens nas aves vivas e pode ser administrada a aves de modo seguro.

A virulência da cepa foi testada em camundongos BALB/c por injeção intraperitoneal a 10^8 UFC. Não foram observados efeitos adversos aos camundongos por até 10 dias após a inoculação. Entretanto, camundongos que receberam uma dose oral de 42 UFC da cepa parental morreram em 8 dias. A cepa foi usada para vacinar bovinos e suínos com dose de 10^{10} UFC por via subcutânea, mostrando-se segura quanto ao seu uso. Não houve mortalidade ou sinais clínicos de doença atribuíveis à administração da vacina durante o estudo. Analisando as informações que compõem o processo, os estudos de atenuação de virulência da cepa mutante, a constatação de não reversão de virulência no animal alvo (frangos) e em animais não alvos (camundongos, suínos e bovinos), pode-se concluir que o risco desta vacina é baixo, tanto para os animais, como para o meio ambiente. Embora não tenham sido feitos estudos em humanos com esta cepa, trabalhos observados na literatura com cepas de *Salmonella* Typhi mutantes para o gene *aroA* não apresentaram reações adversas em humanos voluntários, o que nos leva a concluir que a cepa vacinal para aves não apresenta riscos significativos para a saúde humana.

- **Segurança Ambiental**

O isolamento do microrganismo por varredura ambiental de um aviário teste e granjas de aves comerciais demonstrou que a cepa vacinal não persiste no ambiente ou nas aves por mais que 21 após a vacinação. O microrganismo vacinal mostrou não se propagar entre aves quando mantidas em isolamento. Não houve recuperação do microrganismo de quaisquer das aves não inoculadas mantidas em contato com as inoculadas em quaisquer das retropassagens. Com isso, conclui-se que o microrganismo vacinal não se espalha para aves vizinhas, e não pode ser isolado após 21 dias da inoculação realizada em aves no primeiro dia de vida. Não houve mortalidade ou sinais clínicos de doença atribuíveis à administração da vacina durante o estudo realizado. Dessa maneira, acredita-se que a vacina viva com deleção *aroA* e *serC* da *S. typhimurium* ($1,1 \times 10^9$ UFC por dose) é segura. Os testes para comprovar a segurança do produto revelaram que ele não é prejudicial à saúde pública, meio ambiente ou animais inoculados. O produto já está aprovado e é utilizado na Austrália e nos EUA sendo registrado para comercialização conforme cópia incluída no processo. Até o momento não foram relatados quaisquer efeitos prejudiciais pelo uso da vacina.

- **Plano de Monitoramento de Segurança Pós-Liberação Comercial**

Em atendimento a informações adicionais solicitadas à empresa, esta esclarece em documento enviado em 10/11/2010 que a comercialização da vacina POUVALC ST – vacina viva contra *Salmonella typhimurium* será feita através de

distribuidores parceiros da empresa, sendo que a Fort Dodge Saúde Animal Ltda. possui capacidade de rastrear a utilização da vacina no campo. A Fort Dodge esclarece que possui um programa de monitoramento geral de utilização de seus produtos na área avícola denominado MISA (Monitoria Integrada de Sanidade Avícola), que consta de visita às criações avícolas com consultorias veterinárias, exames clínicos, necropsias e diagnóstico laboratorial quando necessário. Esse sistema MISA resulta em relatórios e análises que são arquivados em banco de dados que poderão ser utilizados para identificação de desafios e necessidade de controle.

A empresa ressalta que, apesar de ter concluído que a vacinação com POULVAC – ST contra *Salmonella typhimurium* não acarreta riscos aos animais, ambiente e aos seres humanos, dispõe de capacidade de monitoramento geral através do sistema de farmacovigilância, monitorando o comportamento do produto a campo. A empresa possui ainda número telefônico gratuito, disponível na embalagem do produto, através do qual podem ser recebidas reclamações e dúvidas. Se houver relatos recebidos por este número, serão iniciados processos investigativos.

Em relação ao procedimento de monitoramento caso-específico, a empresa informa que avalia e filtra as possíveis reclamações e conduz investigações para os casos procedentes, o que inclui visita à granja afetada e testes diagnósticos. Casos considerados graves poderão ser reportados ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, além de procedimentos relativos ao recolhimento do produto e parada de distribuição.

4. Parecer Final

O parecer técnico sobre a biossegurança do organismo geneticamente modificado denominado **Poulvac ST** – Vacina Viva contra *Salmonella typhimurium* é fundamentado nos seguintes pontos: (1) a vacina é produzida nas instalações da Fort Dodge Health nos Estados Unidos e apresenta histórico seguro de uso neste país e na Austrália; (2) na construção do organismo vacinal geneticamente modificado foram deletados os genes *aroA* e *serC*, o que torna o microrganismo dependente de suplementos de nutrientes como aminoácidos aromáticos e PABA para sua multiplicação, impedindo que este se estabeleça no ambiente; (3) a cepa parental atenuada não apresenta virulência à espécie humana e outros mamíferos testados (como suínos, bovinos e camundongos); (4) os dados apresentados pela empresa sobre construção e segurança demonstram baixo risco para a saúde pública, saúde animal e meio ambiente; (5) a empresa encaminhou programa de monitoramento geral através de farmacovigilância, monitorando o produto a campo e por toda a sua vida comercial.

Assim sendo, concluímos que esta atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou prejudicial à saúde humana e animal.

Dr. Edilson Paiva
Presidente da CTNBio