



PRUEBA DE CAMPO EN VEZDEMARBÁN (LOCALIZACIÓN 2)
NOTIFICACIÓN B/ES/09/62
INFORME FINAL

Introducción

La prueba se realizó según las condiciones establecidas en la Resolución de 1 de Junio de 2009 de la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

I. INFORMACIÓN GENERAL

A. Nombre y dirección del promotor.

1) Nombre y titulación del responsable de la solicitud de autorización:

Luis Bascañán Herrera Licenciado en Veterinaria

2) Centro, Instalación o Empresa:

Laboratorios SYVA, S.A.

3) Domicilio:

Avda. Párroco Pablo Díez 49-57
24010 – Trobajo del Camino (León)

4) Persona de contacto:

Ángel Urbano Llanos Pellitero
Tel: 987 800 800
Fax: 987 805 852
Correo electrónico: angel.llanos@syva.es



B. Nombre, titulación y experiencia del científico o científicos responsables.

1) Responsable de la actividad objeto de la solicitud de autorización:

Jaime Fernández Souto Licenciado en Farmacia

2) Responsables de la vigilancia y/o control.

- Vigilancia de los conejos en explotación cinegética:

Carlos Díez Valle (Propietario) Dr. en Veterinaria

Beatriz Gutiérrez Muñiz (Investigador Principal) Licenciada en Veterinaria

- Control del producto en estudio:

Ángel Urbano Llanos Pellitero Licenciado en Veterinaria

Beatriz Gutiérrez Muñiz Licenciada en Veterinaria

C. Título del proyecto.

Comprobación de la eficacia y seguridad de la vacuna ISPANVAC en conejos silvestres en semilibertad. Localización 2.

II. INFORMACIÓN DEL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

A. Características de los organismos donante y receptor:

1. Nombres científicos.

a. Donante: *Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV).*

b. Receptor: *Myxoma Virus(MV)* .

2. Taxonomía.

a. Donante: *Caliciviridae Lagovirus.*

b. Receptor: *Poxviridae Chordopoxvirinae Leporipoxvirus.*



3. Otros nombres (nombre común, nombre de la cepa, etc).

- a. Nombre común del donante: Virus de la Enfermedad Vírica Hemorrágica del conejo.
- b. Nombre común del receptor: Virus de la Mixomatosis del conejo.

4. Características del material genético donado

- Tipo de material genético utilizado: secuencia de la proteína VP60 de la cepa AST/89 de virus de la Enfermedad Vírica Hemorrágica del conejo.

- Función prevista del material genético utilizado en la modificación genética: expresión por el virus de mixomatosis receptor de la proteína VP60 del virus de la Enfermedad Vírica Hemorrágica del conejo para lograr la inducción de respuesta inmune protectora en conejos vacunados con el recombinante frente a ambas enfermedades, Mixomatosis y la Enfermedad Vírica Hemorrágica.

III.CONDICIONES DE LA PRUEBA REALIZADA.
--

A. Información sobre la prueba:

A.1.- Objetivo de la prueba.

La prueba de campo tenía como objetivo evaluar la eficacia ligada a la transmisión y la seguridad de la vacuna ISPANVAC en conejos silvestres en condiciones de campo.

A.2.- Descripción de la prueba.

El estudio se llevó a cabo como un ensayo no ciego, ya que el grupo control estaba físicamente separado del grupo tratamiento.

Tras un examen clínico y serológico inicial en la granja de origen, se seleccionaron 230 conejos silvestres con un buen estado general y seronegativos



a Mixomatosis y a RHD, de distinto sexo en una proporción 2:1 (hembras:machos) y edades comprendidas entre 8 y 9 semanas.

Estos animales se distribuyeron en dos grupos paralelos de forma aleatoria empleando una tabla de randomización, y se trasladaron a la explotación cinegética de Zamora dónde se liberaron en los cercados correspondientes: 180 conejos en el grupo tratamiento y 50 conejos en el grupo control.

Al cabo de 40 días aproximadamente, una vez establecida la población y las condiciones climatológicas fueron lo más apropiadas posibles, se llevó a cabo la vacunación del 20% del grupo tratamiento. La inoculación se efectuó por vía intradérmica en dos puntos: a la altura de la escápula derecha y sobre el muslo derecho, administrando 0,1 ml de vacuna por punto. Todos los animales vacunados se sangraron inmediatamente antes de la vacunación, para comprobar que seguían siendo seronegativos, tanto a Mixomatosis, como a RHD.

Una vez aplicada la vacuna se hizo una observación clínica del 30% de los conejos en los días 4, 10 y 28 postvacunación, que permitió hacer una valoración de la seguridad de la misma, evaluando las reacciones locales (mixomas primarios y secundarios) y generales (conjuntivitis, blefaritis, descarga nasal y disnea) inducidas por la vacuna. Además, a lo largo de todo el ensayo se registró la mortalidad, con una frecuencia de tres veces por semana.

También se realizó un seguimiento serológico, mediante sangrías mensuales del 50% de la población, para comprobar la seroconversión frente a Mixomatosis y RHD y su evolución a lo largo del ensayo, proporcionándonos información sobre la eficacia de la vacuna en los conejos vacunados y sobre la transmisibilidad de la cepa vacunal de conejos vacunados a conejos no vacunados en contacto con ellos.

Transcurridos 100 días aproximadamente desde la vacunación, tuvo lugar un brote natural de Mixomatosis. Según el protocolo, no hubiese sido necesario realizar el desafío de RHD en laboratorio, pero aún así se llevó a cabo. De manera que se realizó una captura final para recuperar a todos los conejos supervivientes y trasladarlos al animalario de la Universidad de León, dónde se sometieron al desafío.



La valoración de la mortalidad tras el brote natural primero, y tras el desafío después, permitió determinar la eficacia de la vacuna y su capacidad de transmisión.

Transcurrido el periodo de observación posterior al brote y al desafío, los conejos supervivientes se sometieron a eutanasia y sus cadáveres se eliminaron de forma segura, mediante el gestor Consenur.

A.3.- Localización de la liberación.

Lugar concreto de la liberación:

Cinegética Ibercún

Explotación Cinegética Semiextensiva de Conejo de Monte

Vevedemarbán (Zamora)

Explotación 492350000017

Teléfono de contacto 696 452 217

COORDENADAS UTM.

X: 305036.17

Y: 4614519.64

A.4.- Fechas concretas de la liberación.

Considerando como liberación el momento de la vacunación de los conejos, ésta se llevó a cabo el 22 de Abril de 2010.

En el mes de Septiembre se realizó la captura final de los conejos, en tres semanas consecutivas y se trasladaron al animalario de la Universidad de León para el desafío programado de RHD.

El final de la prueba fue el 28 de Septiembre de 2010.

B. Seguimiento realizado a la liberación voluntaria:

El seguimiento efectuado durante la prueba de campo consistió en:

1.- Muestreo sanguíneo inicial y secuencial de los conejos del grupo tratamiento (vacunados y no vacunados contacto) y del grupo control.



2.- Con una frecuencia de tres veces por semana, supervisión del estado general de los conejos y control de la mortalidad mediante recogida y análisis de bajas producidas a lo largo de toda la prueba.

3.- Observación, mediante examen clínico, de las reacciones locales y generales inducidas por la vacuna, en los días 4, 10 y 28 postvacunación.

4.- En el animalario de la Universidad de León (desafío de RHD): seguimiento diario del estado de los conejos desafiados, recogida y confirmación de la causa de las bajas.

Además de lo anteriormente citado, durante el transcurso de la prueba de campo, el personal de Laboratorios Syva comprobó el cumplimiento de las medidas de contención y seguimiento, en las visitas semanales que efectuó a la explotación.

IV. RESULTADOS DE LA LIBERACIÓN VOLUNTARIA REALIZADA

Los resultados obtenidos en el seguimiento de la prueba de campo fueron:

1.- Muestreo sanguíneo inicial y secuencial de los conejos del grupo tratamiento (vacunados y no vacunados contacto) y del grupo control.

- Sangría inicial: se hizo en la granja de origen y mostró la seronegatividad de todos los conejos tanto a Mixomatosis como a RHD, de manera que todos los animales pudieron incluirse en el ensayo.

- Sangría prevacunación: se realizó en la explotación inmediatamente antes de la vacunación y permitió comprobar que, tras el periodo de aclimatación, los animales seguían siendo seronegativos a ambos virus, corroborando además, la ausencia de cualquier virus circulante en la zona dónde se estaba realizando el ensayo.

- Sangrías mensuales (días 28, 54 y 84 postvacunación): la seroconversión, tanto a Mixomatosis como a RHD, únicamente se observó en los conejos vacunados. En los conejos no vacunados contacto y en los controles no se produjo seroconversión,



permaneciendo seronegativos a ambas enfermedades, al menos hasta la aparición del brote natural de Mixomatosis.

En los muestreos realizados a los 28 y 54 días postvacunación, se testaron al menos el 50% de los animales del grupo tratamiento y el 50% de los animales del grupo control. En el muestreo del día 84, por motivos técnicos, solamente se pudieron testar un 25% de los conejos tratamiento, además del 50% de los conejos control.

A pesar de este contratiempo, los resultados serológicos se consideran aceptables en su conjunto, ya que coinciden con los obtenidos en ensayos anteriores realizados en condiciones de laboratorio, y permiten hacer una primera valoración de la eficacia de la vacuna, que se traduce en la ausencia de transmisión del virus vacunal desde los animales vacunados a los no vacunados en contacto con ellos.

2.- Supervisión del estado general de los conejos y control de la mortalidad.

La mortalidad de los conejos como consecuencia de un brote natural o desafío en laboratorio es la principal variable a tener en cuenta para valorar la eficacia de la vacuna, por eso se hizo una valoración de la misma a lo largo de todo el ensayo con una frecuencia de tres veces por semana.

El número de bajas en el transcurso de la prueba, fue más elevado de lo esperado al inicio del periodo de aclimatación, como consecuencia del estrés del transporte y sobre todo, como consecuencia de las adversas condiciones climatológicas en ese periodo. Posteriormente, las bajas se redujeron de forma significativa y se relacionaron de forma mayoritaria con el estrés provocado por las capturas programadas. Todas las bajas hasta comienzos de Agosto fueron negativas a Mixomatosis y a RHD mediante PCR.

A partir de este momento, el número de bajas comenzó a incrementarse y las PCR confirmaron la aparición de un brote natural de Mixomatosis. En este periodo todas las bajas registradas pertenecieron al grupo de los no vacunados contacto y al grupo de los controles siendo los porcentajes de mortalidad muy similares en estos grupos, 70,1% y 71,4% respectivamente. Ningún animal vacunado causó baja durante dicho periodo.



Estos resultados confirman por sí solos la eficacia de la vacuna frente al brote natural de Mixomatosis, en los animales vacunados, así como la ausencia de protección en el grupo de animales contacto, en los que no se produjo la transmisión del virus vacunal a partir de aquellos, durante los más de 100 días transcurridos desde el momento de la vacunación, hasta la aparición del brote.

3.- Observación clínica de las reacciones locales y generales inducidas por la vacuna.

La observación clínica individual del 30% de la población de conejos, realizada los días 4, 10 y 28 postvacunación, permitió valorar la seguridad de la vacuna. Los parámetros estudiados fueron:

- Reacciones locales: se realizó un estudio mediante inspección y palpación, de mixomas primarios (producidos por la vacunación y presentes en los puntos de inoculación) y mixomas secundarios, que podían aparecer en cualquier punto de la anatomía del conejo. Únicamente aparecieron mixomas primarios en todos los animales vacunados observados, y mixomas secundarios en una pequeña proporción de los mismos. Los mixomas alcanzaron el máximo desarrollo sobre el décimo día postvacunación y a partir de este momento fueron disminuyendo de tamaño hasta su completa desaparición.

No se observaron mixomas en ninguno de los animales del grupo contacto ni del grupo control.

- Reacciones generales: se valoró la sintomatología general (conjuntivitis, blefaritis, descarga nasal y disnea). La presencia de estos síntomas fue muy leve o nula en el conjunto de los conejos observados, sin afectar, en ningún caso, el estado general de los animales.

Estos resultados coinciden con los observados en las pruebas de seguridad realizadas en condiciones de laboratorio y permiten asegurar la inocuidad de la vacuna cuando se aplica en condiciones de campo.



4.- Desafío programado de RHD en condiciones de laboratorio.

Tras el brote natural de Mixomatosis se realizó una captura final de los animales supervivientes sobre los que se llevó a cabo un desafío programado con el virus RHDV, para comprobar si los datos obtenidos con el brote de Mixomatosis se repetían o no con RHD.

Este desafío se efectuó en la zona contenida con nivel de bioseguridad P2 del animalario de la Universidad de León, mediante la inoculación de la cepa vírica virulenta (BS89) en cada uno de los conejos de cada grupo: grupo de conejos vacunados, grupo de conejos no vacunados contacto y grupo de conejos control.

Tras la inoculación, los conejos fueron observados diariamente valorando la mortalidad durante un periodo de 9 días. Sobre las bajas se realizaron las correspondientes necropsias con recogida de muestras para posteriormente llevar a cabo las pruebas diagnósticas (técnicas de PCR) que permitían confirmar la causa de la muerte.

Los porcentajes de supervivencia tras el desafío fueron de 100% en el grupo vacunado, 9,1% en el grupo no vacunado contacto y 20% en el grupo control.

De acuerdo con lo establecido en Farmacopea Europea y O.I.E., el desafío de RHD fue válido puesto que al menos el 80% de los conejos control murieron. De esta manera los resultados obtenidos son aceptables y confirman la ausencia de transmisión y por lo tanto de protección en los animales del grupo no vacunado contacto.

V. CONCLUSIONES DE LA PRUEBA REALIZADA

Los resultados obtenidos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1.- La vacuna ISPANVAC es totalmente segura en las condiciones recomendadas ya que no se observan reacciones generales de importancia y las reacciones locales son leves, únicamente aparecen mixomas primarios y alguno secundario en los animales



vacunados, que posteriormente desaparecen, sin afectar el estado general de los conejos.

2.- La vacuna ISPANVAC es eficaz en los animales que reciben una dosis vacunal. Los animales vacunados seroconvierten frente a Mixomatosis y RHD y además sobreviven primero, al brote natural de Mixomatosis, y después al desafío programado frente a RHD.

3.- En las condiciones del ensayo, no se observa transmisión del virus vacunal, de los animales vacunados, a los no vacunados en contacto con ellos. Todos los animales no vacunados contacto permanecen seronegativos, tanto a Mixomatosis como a RHD, al menos hasta la aparición del brote natural de Mixomatosis y los porcentajes de mortalidad tras el brote natural y tras el desafío programado, no difieren significativamente entre este grupo y el grupo control.

4.- La ausencia de transmisión del virus vacunal a los animales contacto, determina que la vacuna no es eficaz en este grupo de animales y por tanto, la vacuna ISPANVAC no puede estar indicada para la protección frente a Mixomatosis y RHD, en conejos mantenidos en contacto con otros vacunados, al menos en estas condiciones.