



***PRUEBA DE CAMPO EN PORTAS (PONTEVEDRA) NOTIFICACIÓN B/ES/07/38
INFORME FINAL***

Introducción

Puesto que la vacuna ISPANVAC es un medicamento veterinario, era preciso realizar una prueba de campo para comprobar su eficacia y seguridad en condiciones reales de administración. Además como se trata de un OMG, la prueba debía efectuarse en condiciones controladas que permitiesen la contención adecuada del virus vacunal impidiendo su difusión al medio ambiente.

Para este fin, se seleccionaron las instalaciones del Tecor de Portas que fueron inspeccionadas y aprobadas por la Comisión Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente en Abril de 2007. En la primavera de ese mismo año se intentó llevar a cabo el ensayo, pero la aparición de un brote de RHD antes de la vacunación de los conejos, obligó a la captura y eliminación de los animales supervivientes y a dejar las instalaciones en vacío sanitario. Una vez comprobada la desaparición del virus en el recinto y la eficacia del vacío sanitario, y obtenida la calificación de la vacuna como Producto en Investigación Veterinaria (107 PIV) y la autorización para efectuar la prueba de campo (230/ECV) por la AEMPS, se abordó de nuevo la realización de la prueba en otoño de 2008, aunque se tuvo que abortar de nuevo por la aparición de un brote, de mixomatosis en este caso, a escasos días de la vacunación, sin dar tiempo a que los animales adquiriesen la inmunidad.

Se volvió a poner en marcha el protocolo de eliminación de animales y desinfección del emplazamiento y tras un periodo de tiempo suficiente para obtener la eficacia del vacío sanitario, se llevó a cabo la prueba de campo EC-VR-0901 a comienzos del mes de Abril de 2009, según las condiciones establecidas en la Resolución de 11 de Abril de 2007 de la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental del Ministerio de Medio Ambiente.



I. INFORMACIÓN GENERAL

A. Nombre y dirección del promotor.

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

Luis Bascuñán 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:

Luis I. Pérez-Ordoyo García
Tel: 987 800 800
Fax: 987 805 852
Correo electrónico: perez-ordoyo@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:

Manuel Martínez Casal (Propietario)

- Control del producto en estudio:

Luis I. Perez-Ordoyo García Licenciado en Veterinaria



C. Título del proyecto.

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

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 con un grupo control separado físicamente del grupo tratamiento, de manera que se trató de un ensayo no ciego.

En la granja de origen, se realizó una preselección de 300 conejos mediante un examen clínico y serológico inicial. Tras comprobar el buen estado general de los animales y su seronegatividad a Mixomatosis y a RHD, se seleccionó un grupo de 240 animales, de edades comprendidas entre 8 y 9 semanas y en una proporción 2:1 (hembras:machos).

Estos animales se distribuyeron en dos grupos paralelos de forma aleatoria empleando una tabla de randomización, y se trasladaron al Tecor de Portas dónde se liberaron en los cercados correspondientes: 180 conejos en el grupo tratamiento y 60 conejos en el grupo control.

Al cabo de 30 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.

Para obtener una valoración de la seguridad de la vacuna se hizo una observación clínica del 30% de los conejos en el día 10 postvacunación. Se evaluaron las reacciones inducidas por la vacuna, tanto locales (mixomas



primarios y secundarios) como generales (conjuntivitis, blefaritis, descarga nasal y disnea). Además, a lo largo de todo el ensayo se registró diariamente la mortalidad.

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 38 días aproximadamente desde la vacunación, tuvo lugar un brote natural de RHD. Según el protocolo, ante la aparición de un brote natural el estudio debía finalizar una vez que se diese por concluido el brote, es decir, cuando durante 21 días consecutivos no apareciesen nuevos casos de enfermedad o animales muertos como consecuencia de ella. De esta manera, a los 120 días aproximadamente postvacunación, se realizó una captura final para recuperar a todos los conejos supervivientes, someterles a eutanasia y eliminarles de forma segura, mediante el gestor Consenur.

La valoración de la mortalidad tras el brote natural de RHD permitió determinar la eficacia de la vacuna y su capacidad de transmisión.

A.3.- Localización de la liberación.

Lugar concreto de la liberación:

Criadero de conejo de monte en semilibertad en Portas

Coto de Caza “Caza de Portas”

Concello de Portas

Portas (Pontevedra)

Explotación PO-002

Nº matrícula PO.10104

Teléfono de contacto 606 856 853



COORDENADAS UTM.

X: 527.923'97

Y: 4.711.860'96

A.4.- Fechas concretas de la liberación.

Considerando como liberación el momento de la vacunación de los conejos, ésta se llevó a cabo el 14 de Mayo de 2009.

El final de la prueba fue el 20 de Agosto de 2009.

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.- Observación diaria 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.

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 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. Todos los conejos fueron seronegativos tanto a Mixomatosis como a RHD, de manera que todos ellos pudieron incluirse en el ensayo.
- Sangría prevacunación: se realizó en el Tecor 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 26, 62 y 90 postvacunación): todos los conejos vacunados fueron seropositivos, tanto a Mixomatosis como a RHD. Hubo dos conejos que seroconvirtieron a ambos virus en el grupo de los no vacunados contacto y ninguno en el grupo de los controles.

Tras el brote de RHD, 7 de los conejos no vacunados contacto y 11 de los controles presentaron seroconversión a RHD.

En el muestreo realizado el día 26 postvacunación, se testaron al menos el 50% de los animales del grupo tratamiento y el 50% de los animales del grupo control. Los siguientes muestreos (días 62 y 90 postvacunación) se llevaron a cabo una vez comenzado el brote natural de RHD, de manera que el número de animales capturados fue menor debido a las bajas causadas por el brote. Los porcentajes de animales sangrados en estos muestreos fueron: 31,1% en el grupo tratamiento y 38,3% en el grupo control.

Los resultados serológicos se consideran aceptables en su conjunto, ya que la respuesta general de los animales vacunados es la normalmente observada en ensayos anteriores realizados en condiciones de laboratorio. Esto permite hacer una primera valoración de la potencia de la vacuna, que se traduce en una aceptable eficacia en los animales vacunados y en una transmisión del virus vacunal muy baja a los no vacunados en contacto con ellos, ya que sólo dos conejos contacto seroconvirtieron a ambos virus y únicamente éstos podrían estar protegidos por transmisión del virus vacunal.



2.- Observación diaria 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 diaria de la misma a lo largo de todo el ensayo.

El número de bajas en el transcurso de la prueba, fue elevado al inicio de la misma, como consecuencia del estrés del transporte, de fracturas vertebrales por las estructuras de los majanos y sobre todo, como consecuencia de problemas digestivos provocados por el cambio de alimentación, de pienso granulado en la granja a gran cantidad de hierba en los cercados. Posteriormente, se produjo un descenso significativo de las bajas hasta finales de Junio. Todas estas bajas fueron negativas a Mixomatosis y a RHD mediante técnicas de PCR.

A partir de este momento, el número de bajas comenzó a incrementarse como consecuencia de la aparición de un brote natural de RHD confirmado por PCR.

En este periodo posterior al brote natural 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, 73,6% y 77,1% 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 RHD, en los animales vacunados, así como la escasa protección en el grupo de animales contacto, en los que sólo se produjo la transmisión del virus vacunal en dos animales a partir de aquellos.

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 el día 10 postvacunación, permitió hacer una valoración de 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.

Todos los conejos vacunados presentaron mixomas primarios y algunos de ellos, además, mixomas secundarios. El tamaño medio de los mixomas coincidía con el obtenido en pruebas anteriores en laboratorio, por lo que probablemente el día de la observación los mixomas se encontraran en el momento de máximo desarrollo. A partir de este momento fueron involucionando hasta su completa desaparición ya que el día de la sangría del primer mes postvacunación la mayoría de los animales no presentaban mixomas sino únicamente alguna cicatriz o calva en los puntos de inoculación.

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.

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 quedan protegidos ante la presencia de un brote natural de RHD. Puesto que la cepa vacunal es un virus mixoma que lleva insertada la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína VP60, si los animales adquieren inmunidad protectora frente a RHD se presupone que también queden protegidos frente a Mixomatosis.

3.- En las condiciones del ensayo, se observa una transmisión del virus vacunal muy baja, del orden del 3%, de los animales vacunados a los no vacunados en contacto con ellos. Sólo dos animales no vacunados contacto seroconvierten a ambos virus, al menos hasta la aparición del brote natural de RHD y los porcentajes de mortalidad tras el brote natural no difieren significativamente entre este grupo y el grupo control.

4.- La escasa 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.