(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 394 884**

(21) Número de solicitud: 201100683

(51) Int. Cl.:

A61K 39/125 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

15.06.2011

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

06.02.2013

(71) Solicitantes:

TECNOLOGIAS Y SERVICIOS AGRARIOS S.A. (100.0%)
CONDE DE PEÑALVER 84
28006 MADRID ES

(72) Inventor/es:

CALVETE MARGOLLES, Carlos;
FRAILE GABALDON, Montserrat y
GARCIA FELIZ, Carina

(74) Agente/Representante:

FERNÁNDEZ-VEGA FEIJOO, María Covadonga

(54) Título: **KIT DE HIPERINMUNIZACION DE CONEJOS FRENTE A RHD Y USO DEL MISMO (RABBIT HAEMORRHAGIC DISEASE)**

(57) Resumen:

La presente invención se refiere a un kit de hiperinmunización de conejos frente al virus de la RHD, que comprende una cepa de virus de la RHD de campo junto con los materiales necesarios para su replicación y para la preparación de una suspensión vírica con una concentración suficiente de partículas víricas con capacidad infectiva. La invención también presenta un uso del kit anterior para la preparación de una suspensión vírica para su administración a una población de conejos causando la infección de conejos juveniles con menos de 8-12 semanas de edad. Al causar la infección de conejos juveniles con menos de 8-12 semanas de edad, en los que el virus de la RHD no es mortal, se obtiene su hiperinmunización frente a dicho virus.

ES 2 394 884 A1

DESCRIPCIÓN

Kit de hiperinmunización de conejos frente a RHD y uso del mismo (Rabbit Haemorrhagic Disease)

Campo de la invención

La presente invención se refiere de manera general al campo del control de poblaciones animales, y más concretamente se refiere al campo de la protección de poblaciones de conejos de monte frente a la mortalidad por el virus de la RHD (enfermedad hemorrágica del conejo, "*rabbit haemorrhagic disease*").

Antecedentes de la invención

La enfermedad hemorrágica del conejo (RHD) es uno de los principales factores de mortalidad en las poblaciones de conejo silvestre. Desde su aparición en España a finales de los años 80, esta enfermedad vírica ha tenido un drástico efecto sobre esta especie, reduciendo de forma generalizada su abundancia.

Debido a la importancia biológica del conejo, su disminución ha constituido una grave disrupción en la dinámica de muchos ecosistemas. Esta disrupción se ha puesto de manifiesto principalmente en la reducción de disponibilidad de conejos como especie presa para algunas especies de depredadores más emblemáticas. No obstante, el conejo no sólo desempeña un papel como presa, sino que además, debido a su carácter herbívoro, desempeña una elevada actividad moduladora de la estructura y composición de la vegetación, mientras que las madrigueras que construye son refugio invernal o estival para una gran variedad de otras especies, tanto de vertebrados como invertebrados.

Desde el punto de vista cinegético, dado que el conejo es una de las principales especies de caza menor, la distorsión que ha tenido esta enfermedad para la caza resulta evidente. Por ejemplo, en la disminución generalizada del número de ejemplares cazados, la reducción de ingresos económicos por la venta de opciones de caza, los efectos sobre otras especies cinegéticas que tienen que soportar una mayor presión de caza, o incluso el incremento del problema causado

por el uso indiscriminado de translocaciones y la introducción de ejemplares hibridados con razas domésticas como base de su gestión.

Con el objeto de conservar la biodiversidad y potenciar la actividad cinegética, se realizan actuaciones para tratar de recuperar poblaciones silvestres con la consiguiente inversión económica por parte de la Administración y de los colectivos de cazadores.

En la técnica anterior, los métodos utilizados para este fin son fundamentalmente los siguientes:

- la promoción de poblaciones autóctonas que se encuentran a baja densidad; y
- la creación de nuevos núcleos poblacionales mediante la reintroducción de ejemplares de origen silvestre o procedentes de la cría en cautividad.

Sin embargo, estas técnicas conocidas en la actualidad resultan insatisfactorias a medio y largo plazo a causa del virus de la RHD. La mayoría de las poblaciones que han sido gestionadas para incrementar su densidad y en las que el control de la depredación y el manejo de hábitat han sido adecuados, sólo son viables durante un corto período de tiempo (normalmente entre 2 y 3 años), tras lo cual vuelven a disminuir como consecuencia del impacto de esta enfermedad. El motivo es que estas poblaciones han crecido en abundancia de conejos pero en ausencia del virus de la RHD.

Por otro lado, se ha observado que existen poblaciones naturales que, en presencia del virus, consiguen alcanzar densidades elevadas y en las que aparentemente el impacto de la enfermedad es relativamente bajo. El mecanismo responsable de este fenómeno es la reducción de la edad media a la que los conejos son infectados de forma natural por el virus. En efecto, se ha observado que la infección implica una letalidad del 80-99% en conejos subadultos y adultos, mientras que en animales con edades inferiores a las 8-12 semanas de vida la letalidad es prácticamente nula. Por ejemplo, en el artículo

de Robinson A. J., So P.T.M., Müller W. J., Cooke B.D., Capucci L. (2002). Statistical models for the effect of age and maternal antibodies on the development of Rabbit haemorrhagic disease in Australian wild rabbits. Wildlife Research. 29: 663-671, se confirma que la letalidad de la infección por el virus de la RHD es prácticamente nula en conejos con edades inferiores a las 8 semanas de edad, y que éste grado de resistencia puede incrementarse hasta las 12 semanas en el caso de conejos nacidos de hembras que ya han superado la enfermedad.

Dado que la edad media de infección está inversamente relacionada con la tasa de transmisión del virus, en las poblaciones de conejos más densas, la tasa de trasmisión vírica es elevada y por tanto menor la edad media de infección, mientras que en las poblaciones de reciente creación o a baja densidad, la edad media de infección es siempre elevada, por lo que la mortalidad causada por la RHD a nivel poblacional también se ve drásticamente incrementada.

Según otras técnicas anteriores, de manera tradicional se ha tratado de paliar el impacto negativo de la RHD mediante el uso de vacunas inactivadas comerciales. Este tipo de productos presentan una elevada eficacia a nivel individual, pero son de muy difícil aplicación en poblaciones salvajes ya que es necesaria la captura de los ejemplares para poder administrarles la vacuna, no alcanzándose nunca coberturas de inmunización suficientes. Por otro lado, un gran problema de la inmunización mediante vacunas es que, aunque se reduce la mortalidad por la enfermedad entre los animales vacunados, a nivel de población simplemente se limita la transmisión natural del virus al reducir el número de individuos sensibles a la infección. Esto hace que la edad media de infección a nivel poblacional se incremente y, por lo tanto, se incremente la mortalidad entre el contingente de animales no vacunados, por lo que, tal y como han sugerido algunos estudios científicos, la inmunización mediante vacunación sólo podría

ser efectiva cuando se alcanzasen coberturas muy elevadas de vacunación y siempre que se mantuviese el esfuerzo a lo largo del tiempo, pues el cese de la vacunación implicará un incremento súbito de la incidencia de la RHD y un descenso brusco de la densidad poblacional.

Más recientemente se han creado diferentes métodos de inmunización de poblaciones frente a RHD sin el uso de vacunas comerciales inactivadas. Así, se ha logrado expresar y sintetizar la proteína VP60 de la cápside vírica en laboratorio, demostrando su capacidad de inmunización por vía oral. También se ha creado un virus recombinante de mixomatosis con capacidad de provocar inmunidad contra la proteína VP60, integrante de la cápside del virus de la RHD. Sin embargo, como se explicó anteriormente, en ambos casos la inmunidad a nivel poblacional implica la reducción de la transmisión del virus de la RHD, por lo que presentan los mismos inconvenientes desde el punto de vista epidemiológico que las vacunas comerciales tradicionales.

Por último, también se ha considerado el incremento de la densidad poblacional como un método para reducir el impacto de la RHD, con el fin de facilitar la transmisión vírica y disminuir la edad media de infección. Por este motivo la gestión de muchas poblaciones se basa en la reducción de otros factores de mortalidad y/o la realización de refuerzos poblacionales con ejemplares translocados vacunados o no. El problema de este método es que generalmente la propia RHD impide el crecimiento poblacional en el caso de poblaciones a baja densidad sometidas a gestión; mientras que en el caso de los refuerzos poblacionales, éstos implican un desequilibrio en la dinámica del sistema conejo-virus de la RHD, de tal manera que en respuesta a un crecimiento de la población de conejos en ausencia del virus o con una carga vírica ambiental baja (secundaria a la baja densidad poblacional), suele tener lugar una respuesta del sistema consistente en el incremento brusco de la transmisión vírica lo que tiene generalmente como

consecuencia la mortalidad de un elevado contingente de la población.

En países como Australia y Nueva Zelanda, en los que las poblaciones de conejos silvestres son una plaga, se usa el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHD) como un agente de control biológico con la finalidad de diezmar estas poblaciones. Estas introducciones controladas se usan por los propios ganaderos y/o agricultores y también por técnicos de las instituciones con competencia en conservación del medio (Cooke B. D. (2002). Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 21:347-358; y Parkes JP, Glentworth B, Sullivan G. (2008). Changes in immunity to rabbit haemorrhagic disease virus, and in abundance and rates of increase of wild rabbits in Mackenzie Basin, New Zealand. Wildlife Research 35: 775-779). Con este objetivo, existe en el mercado un producto que consiste en virus de la RHD liofilizado (Take Aim®) que se utiliza como un agente de control biológico vehiculándolo en la población mediante cebos. La introducción-reintroducción del virus de la RHD mediante cebo también se realiza en estos países con fines de investigación, principalmente para valorar el control de las poblaciones de conejo y optimizar la aplicación del método de control (Mutze G, Sinclair R, Peacock D et al. (2010). Does a benign calicivirus reduce the effectiveness of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in Australia? Experimental evidence from field releases of RHDV on bait. Wildlife Research 37: 311-319).

Por tanto, sigue existiendo en la técnica la necesidad de un método que permita inmunizar adecuadamente las poblaciones de conejos silvestres protegiéndolas frente a la enfermedad hemorrágica del conejo (RHD), que proporcione resultados satisfactorios a largo plazo y que no requiera la inmunización constante a lo largo del tiempo mediante vacunas de grandes números de individuos en la población.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere por tanto a un método adecuado para hiperinmunizar poblaciones de conejo de monte frente a RHD (enfermedad hemorrágica del conejo) mediante la utilización de cepas campo del virus. El método incluye las etapas de:

i) obtener una cepa de virus de la RHD de campo;

ii) replicar en laboratorio la cepa vírica obtenida;

iii) preparar una suspensión vírica con una concentración suficiente de partículas víricas con capacidad infectiva;

iv) administrar, preferiblemente mediante un cebo adecuado, la suspensión vírica obtenida en la etapa iii) a la población de conejos que va a tratarse causando la infección de conejos juveniles con menos de 8-12 semanas de edad.

La cepa de virus de la RHD de campo se obtiene preferiblemente, de una zona próxima a una población de conejos que va a tratarse, para minimizar de ese modo el riesgo de introducción de cepas víricas diferentes a las ya existentes en dicha zona. Sin embargo, dicha cepa de virus de la RHD de campo también puede obtenerse de otras zonas o de fuentes comerciales.

El objetivo del método dado a conocer en la presente invención es por tanto que los conejos jóvenes, con edades inferiores a las 8-12 semanas, tengan contacto con la suspensión vírica y se infecten antes de sobrepasar esta edad, ya que, como ya se comentó anteriormente, en animales de estas edades la infección cursa prácticamente sin letalidad. Por este motivo, la administración del virus se realizará preferiblemente durante el período reproductor de la especie, cuando tiene lugar la emergencia de juveniles de las madrigueras.

La invención también se refiere, en un segundo aspecto, a un kit de hiperinmunización de conejos frente a RHD que comprende una cepa de virus de la RHD de campo junto con los materiales necesarios para su replicación y para la preparación de una suspensión vírica con una concentración suficiente de partículas víricas con capacidad infectiva. Adicionalmente, el kit de hiperinmunización también puede comprender un cebo atractivo para la población de conejos que va a tratarse para la administración de la suspensión vírica a dicha población de conejos.

La presente invención proporciona, por lo tanto, un método bien diferenciado de los conocidos hasta el momento para conseguir poblaciones de conejo de monte que presenten prevalencias elevadas de individuos inmunes a la RHD. Las principales diferencias y ventajas del método de la invención son:

- Dado que el método no implica el uso de preparados de vacunas inactivadas o de vehículos biológicos diferentes al propio virus de la RHD, y el virus de la RHD utilizado es una cepa campo viable, infectante y con plena capacidad de trasmisión desde los ejemplares que acceden al cebo a otros individuos de su entorno, el presente método no implica el aumento de la edad media de infección entre los ejemplares no inmunizados (como es el caso con los métodos empleados en la actualidad), sino que conlleva siempre una reducción de la edad media de infección a nivel poblacional, independientemente del grado de cobertura de inmunización alcanzado.

- Al usarse cepas campo con plena capacidad de transmisión entre individuos, las coberturas de inmunización que pueden alcanzarse serán siempre superiores a las obtenidas mediante el uso de vacunas convencionales (ya que en este caso es necesario capturar a todos y cada uno de los ejemplares que van a vacunarse) o a las obtenidas mediante el uso de otros

vehículos biológicos basados en modelos epidemiológicos diferentes a los del propio virus de la RHD.

– Al usase cepas campo aisladas de la propia zona de actuación o zonas próximas a la misma, se minimiza el riesgo de introducción de virus o de cepas de virus de la RHD diferentes a las existentes en la población a gestionar.

– Al usarse cepas campo, con plena capacidad de transmisión entre individuos, que se vehiculizan a la población mediante el uso de cebo que se dispone al alcance de los conejos de forma reiterada durante el período reproductor, el grado de inmunización alcanzado a nivel poblacional es menos sensible a la densidad poblacional existente que los métodos anteriores.

– Según el presente método, cuando la población alcance una densidad suficiente, en presencia del virus, como para que éste circule de forma natural infectando a los conejos a una edad media de infección baja, será factible la supresión de la aplicación del método de hiperinmunización sin riesgo de brotes graves de RHD.

Descripción detallada de la realización preferida de la invención

A continuación se describirá una realización preferida del método según la presente invención, facilitada a modo de ejemplo ilustrativo y en absoluto limitativo del método descrito en el presente documento.

Tal como se mencionó anteriormente, la presente invención se refiere a un método adecuado para hiperinmunizar poblaciones de conejo de monte frente a RHD mediante el uso de virus campo existente en la zona de actuación (sin implicar la introducción de cepas víricas ajenas a la propia población) durante la época reproductiva del conejo. De esta manera se consigue que los conejos con edades inferiores a 8-12 semanas, que son resistentes a desarrollar cuadros letales de la enfermedad (pero no a la infección), se infecten durante las

primeras semanas posteriores a su primera emergencia de la madriguera, hecho que suele ocurrir hacia las 3-4 semanas de edad.

El método de la invención comprende las siguientes etapas:

i) Obtener una cepa de virus de RHD de campo

Esta cepa se obtiene, según la realización preferida de la invención, a partir de ejemplares de conejos silvestres encontrados muertos por esa enfermedad en una zonas lo más próximas posibles a las poblaciones de conejos que van a tratarse. Se realiza una necropsia de los cadáveres de conejos encontrados y, en primer lugar, se determina que las lesiones macroscópicas son coincidentes con las descritas para la RHD. Posteriormente se extrae el hígado y se corta una porción del mismo, por ejemplo de un mínimo de 2 g de peso, mientras que el resto del órgano se guarda en congelación hasta su uso. A partir de dicha porción de un mínimo de 2 g de hígado se procede a la confirmación del diagnóstico mediante alguna de las técnicas de laboratorio para detección de antígeno descritas para tal fin y conocidas por los expertos en la técnica, tales como técnicas de enzimo inmuno ensayo (ELISA) o PCR.

Una vez confirmada la presencia del virus de la RHD se procesa el resto del hígado, en condiciones de esterilidad, y según los protocolos descritos por la OIE ("Oficina Internacional de Epizootias") para obtener una suspensión vírica inicial. Se siguen los siguientes pasos:

- Homogeneizar mecánicamente el órgano en tampón fosfato salino (PBS), pH 7,2, en dilución 1/5.
- Filtrar a través de un tamiz para eliminar los residuos más gruesos.
- Aclarar mediante centrifugación (mínimo 8.000 g) durante 20 minutos a 4°C.

- Realizar un filtrado final del sobrenadante, tras un proceso de prefiltrado en membranas de celulosa, a través de una placa con tamaño de poro de 0,20 μm para su esterilización frente a bacterias.
- Dividir la suspensión vírica obtenida en alícuotas que se almacenan en tubos estériles a -80°C hasta su uso para la replicación del virus en laboratorio.

A partir de la suspensión vírica obtenida, se procede a la caracterización genética de la cepa aislada con el fin de establecer su relación filogenética y mantenerla como referencia en el seguimiento de la población hiperinmunizada.

Deberá entenderse, no obstante, que según otras realizaciones de la invención la cepa de virus de RHD también puede obtenerse a partir de fuentes comerciales, o puede proceder de zonas distintas de aquélla en la que desea aplicarse el método de hiperinmunización descrito en la presente invención.

ii) Replicar en laboratorio la cepa de virus de RHD obtenida

A partir de la suspensión vírica inicial obtenida, se procede a la replicación del virus mediante las técnicas disponibles para tal fin. Por ejemplo, se procede a la replicación del virus mediante la infección experimental, en primer lugar de un número limitado de conejos domésticos (3 ó 4) con más de 4 meses de edad y procedentes de centros de cría con sanidad controlada. La infección se realiza por vía oral mediante la administración de 0,5 ml de suspensión vírica. Esta primera replicación del virus en un número limitado de conejos se realiza con dos objetivos, por un lado para comprobar la letalidad del virus, por lo que la muerte de estos conejos deberá tener lugar entre 48-72 horas tras la inoculación y deben presentar lesiones macroscópicas de RHD en la necropsia. Por otro lado, otro objetivo de realizar esta primera replicación en un número limitado de conejos es comprobar que tanto la sintomatología como las lesiones

observadas en la necropsia se corresponden exclusivamente a la RHD y no a otros posibles patógenos.

Una vez muertos estos conejos se procede a la extracción de los hígados y a su procesamiento conjunto siguiendo un protocolo idéntico al descrito anteriormente en el presente documento.

A partir de esta suspensión vírica obtenida tras el primer pase en laboratorio, se procede a la infección experimental de otros 20 conejos domésticos, de similares características y con idéntica pauta de infección: 0,5 ml de suspensión por vía oral.

Tras la muerte de estos animales, se procede a su necropsia y extracción del hígado, que se procesa siguiendo el mismo protocolo. Se mezclan las suspensiones víricas obtenidas de todos los conejos para obtener una única suspensión vírica maestra, que será la que se usará para preparar la suspensión de trabajo en una etapa posterior para su administración en campo.

La suspensión maestra se guarda en alícuotas de un máximo de 50 ml en tubos estériles y a −20°C o −80°C hasta su uso. Se usa una de estas alícuotas para preparar disoluciones en serie en base 10 con PBS, desde 10^{-1} hasta 10^{-7} para realizar la titulación de la suspensión en DL_{50} (dosis letal al 50%: dosis que produce la muerte del 50% de la población).

La titulación en DL_{50} de la suspensión maestra se realiza mediante la administración por vía oral de diluciones decrecientes de suspensión vírica (desde 10^{-1} hasta 10^{-7}) en ejemplares de conejo de laboratorio convenientemente aislados unos de otros para evitar la transmisión del virus por otras vías.

Cada dilución de suspensión vírica se administra a un lote diferente de un mínimo de 5 conejos, a razón de 0,2 ml por vía oral, y se determina la mortalidad en cada lote. El cálculo de la DL_{50} puede realizarse según el método de Reed Muench conocido por los expertos en la técnica.

Antes de la infección experimental, se comprobó en todos los conejos de laboratorio empleados en esta fase que no existía la presencia de anticuerpos anti-RHD mediante un ensayo de tipo ELISA indirecto.

Además, en esta fase se incluyen controles para determinar la viabilidad del virus y la ausencia de patógenos diferentes al virus de la RHD.

iii) Preparar una suspensión vírica con una concentración suficiente de partículas víricas con capacidad infectiva

A partir de la determinación de la concentración de virus infectante en la suspensión vírica maestra descrita en la etapa anterior, se procede a la obtención de la suspensión de trabajo mediante la dilución de la misma, hasta conseguir una conseguir una concentración vírica mínima de 1000 DL_{50}/ml (DL_{50} = dosis letal o concentración de virus capaz de matar al 50% de los individuos). Esta concentración vírica es generalmente suficiente para garantizar la infección del 100% de los conejos a los que se les administre la suspensión. Una vez determinada la suspensión vírica de trabajo, ésta se almacenará en congelación en alícuotas de volumen suficiente (por ejemplo de 10 ml) para impregnar la cantidad de cebo que se considere manejable y suficiente desde el punto de vista logístico, y se mantendrán las alícuotas en tubos estériles, y en congelación a -20°C hasta su uso.

Se considera que la disposición de aproximadamente 150-300 g de cebo es una cantidad que, desde el punto de vista logístico, es suficiente para poder distribuirla en varios puntos alrededor de una madriguera estándar, con un mínimo de 4-5 entradas activas o usadas.

Un volumen de 10 ml de suspensión vírica es generalmente suficiente para impregnar adecuadamente esta cantidad de cebo.

Con estas condiciones se calcula que la suspensión de trabajo debe tener, como se describió anteriormente, una concentración mínima deseable de 1000 DL_{50}/ml, lo que implica

que el consumo de tan sólo un 1% del cebo impregnado por parte de un conejo le supone la ingestión de, al menos, 100 DL_{50}.

iv) Administrar la suspensión vírica obtenida en la etapa iii) a la población de conejos que va a tratarse

Para conseguir la infección del 100% de los conejos juveniles que van emergiendo de las madrigueras, se deben tener en cuenta varios factores: el periodo de gestación; la resistencia que los gazapos recién nacidos muestran a la enfermedad durante las 8-12 semanas primeras de vida; y que los animales no salen al exterior de las madrigueras hasta pasados aproximadamente 21-28 días. Teniendo en cuenta estas condiciones, la administración controlada del virus se realiza preferiblemente con un intervalo temporal de repetición que es de 3 a 6 semanas. Este intervalo temporal se considera generalmente suficiente para garantizar que todos los gazapos que vayan emergiendo de las madrigueras queden infectados por el virus antes de que superen la edad crítica.

La suspensión vírica se vehicula preferiblemente en aproximadamente 150-300 g de un cebo atractivo para los conejos. Su preparación se realiza mezclando una alícuota de suspensión vírica de trabajo (10 ml) con la cantidad de cebo considerada suficiente y manejable desde un punto de vista logístico dentro de un contenedor adecuado con cierre hermético y esterilizable. La preparación puede realizarse varios días antes y conservarse en refrigeración a 4°C hasta el momento de su uso.

Cada dosis de cebo (150-300 g impregnados con 10 ml de suspensión vírica de trabajo) se reparte en el interior de, por ejemplo, 3 ó 4 entradas (preferiblemente las que presenten mayores indicios de uso) de cada madriguera que va a tratarse, y se distribuye al atardecer. También, el cebo se puede administrar distribuyéndolo en el interior de una estructura (de forma y tamaño variable) ubicada en la inmediación de la madriguera, que permita el acceso al cebo únicamente de

conejos juveniles, evitando que éste sea consumido por conejos adultos.

El objetivo es reducir el acceso de otras especies al cebo y facilitar que éste sea ingerido por los conejos lo antes posible, ya que éstos presentan una mayor actividad al atardecer y por la noche. Esto garantiza que el contacto de los conejos es con un virus infectivo y en buenas condiciones.

Con el fin de garantizar que los conejos consumen el cebo impregnado durante las primeras horas después de su distribución, se realizan preferiblemente dos precebos sin impregnación de los mismos con la suspensión vírica, uno durante la semana previa a la semana de administración del cebo impregnado y el segundo dos o tres días antes del mismo. Esta técnica ha demostrado ser ampliamente eficaz para el control de poblaciones de conejo en Australia mediante cebos envenenados y en estudios realizados en España se ha comprobado cómo, con este protocolo de precebo, el 100% del cebo impregnado se consume durante la primera noche.

La cobertura de este tipo de actuación es amplia pues la distribución del cebo es fácil y al tratarse de una cepa vírica viable la transmisión entre conejos queda garantizada, a pesar de que no todos lleguen al cebo. Por tanto, en este caso no se trata ya de una campaña de inmunización mediante vacunación, sino de una campaña de hiperinmunización de la población mediante el uso del propio virus de campo.

El método de la invención puede aplicarse en poblaciones controladas de conejos silvestres, especialmente en las mantenidas en cautividad en sistemas de cría extensivos o semiextensivos orientados a la producción de conejos. También es adecuado para su aplicación en poblaciones libres de reciente creación mediante la introducción o reintroducción de la especie a partir de individuos translocados o bien en poblaciones libres reforzadas con la liberación de individuos translocados. En ambos casos un requisito imprescindible es que los animales translocados, si tienen más de 2 meses de

edad, estén adecuadamente inmunizados frente a RHD, ya sea de forma natural o mediante vacunación.

La aplicación del método según la presente invención en poblaciones libres, no sometidas a manejos que impliquen la suelta de ejemplares translocados, sólo será factible si la prevalencia de individuos inmunes a la RHD es elevada entre los animales con más de 2 meses de edad. Esta circunstancia puede producirse como consecuencia o bien de la ocurrencia de un brote natural de RHD en la población o bien de un manejo previo consistente en la realización de campañas de inmunización mediante vacunación.

Ejemplo 1) Hiperinmunización de poblaciones de conejo silvestre

A continuación se describe un ejemplo de aplicación del método según la realización preferida de la invención descrito anteriormente en el presente documento.

Se aplicó el método descrito anteriormente en núcleos controlados de conejos silvestres mantenidos en cautividad en sistemas de cría extensivos localizados en las fincas experimentales del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Los núcleos de arranque fueron juveniles de conejo silvestre translocados desde fincas cercanas, que se sometieron a un período de observación y cuarentena (de un mínimo de 14 días) en jaulas de cunicultura antes de liberarlos a su ubicación definitiva en cercados al aire libre de 1 Ha de superficie. Durante el período de cuarentena se vacunó a todos los conejos frente a RHD mediante el uso de vacunas inactivadas convencionales. Los cercados estaban equipados con madrigueras artificiales, bebederos automáticos y tolvas en las que suministrar pienso para conejos sin ningún tipo de aditivos. Además, en la superficie de los cercados se realizó una siembra mixta de gramíneas y leguminosas para que los conejos tuvieran acceso a los brotes.

Los cercados eran impermeables al paso de depredadores terrestres, pero no a aéreos, por lo que las poblaciones de conejo estuvieron sometidas a mortalidad por depredación por aves rapaces, mientras que los posibles cadáveres o sus restos, estuvieron expuestos a la acción de aves carroñeras.

La suelta de los conejos tuvo lugar en verano, y se dejó transcurrir un período hasta el inicio del primer período reproductor (mes de diciembre) para facilitar la adaptación de los animales y que alcanzasen su madurez sexual. A partir de ese momento el único manejo consistió en la provisión de agua y pienso, y en la revisión diaria de los núcleos con el fin de detectar posibles mortalidades e incidencias.

La mitad de los núcleos se sometieron al método de hiperinmunización según la presente invención descrito anteriormente, con la introducción de un cebo impregnado con suspensión de virus de la RHD cada tres semanas. Este protocolo se practicó únicamente durante el periodo reproductor, desde el mes de diciembre hasta el mes de mayo del siguiente año. Antes del inicio del siguiente período reproductor (mes de noviembre), se procedió a la captura de todos los ejemplares, con el fin de valorar el efecto de la hiperinmunización sobre la productividad poblacional. Dicha productividad poblacional se valoró estimando el número total de nuevos conejos adultos o subadultos producidos por cada hembra reproductora presente antes del inicio del período reproductor anterior y, de forma secundaria, como el número de nuevos conejos resistentes a la RHD producidos por hembra.

En el momento de la captura, se procedió a la toma de una muestra de suero sanguíneo de todos los conejos capturados, con la que se determinó la presencia de anticuerpos frente a RHD mediante técnicas de ensayo inmunoenzimático. Posteriormente, y con el fin de incrementar la sensibilidad y especificidad de la distinción entre individuos resistentes o inmunes, se procedió a la infección experimental, por vía oral, con 0,2 ml de suspensión vírica de

trabajo, de todos los conejos con niveles de absorbancia comprendidos entre el doble y la mitad del valor límite establecido por el kit.

Durante el tiempo en el que se desarrolló el experimento se detectaron brotes de mortalidad por RHD en los núcleos control, pero no en los hiperinmunizados. Sin embargo, en estos últimos hubo un episodio de mortalidad debido a la ingestión de plantas tóxicas. Los resultados obtenidos, reflejados en la siguiente tabla, muestran cómo la productividad de los núcleos hiperinmunizados fue superior a la de los núcleos control y, especialmente, si ésta se calcula sólo en base a los nuevos individuos que fueron resistentes a la infección por RHD.

	Hembras iniciales	Nuevos producidos	Prevalencia resistentes	Productividad total	Productividad resistentes
Control	12	90	83%	7,5	6,25
Hiperinmunización	16	143	100%	8,9	8,9

Tal como se demuestra en este ejemplo, el protocolo de hiperinmunización incrementa la productividad de las poblaciones de conejo al disminuir la mortalidad por RHD. Este incremento de la productividad se consigue de forma paralela al aumento de la prevalencia de conejos resistentes a la enfermedad.

Tal como se mencionó anteriormente, en un segundo aspecto la presente invención también se refiere a un kit de hiperinmunización de conejos frente a RHD. Según la realización preferida, dicho kit comprende una cepa de virus de la RHD de campo junto con los materiales necesarios para su replicación y para la preparación de una suspensión vírica con una concentración suficiente de partículas víricas con capacidad infectiva, tal como se describió anteriormente en el

presente documento en la descripción del método de la invención.

Según otra realización, el kit la presente invención comprende directamente una suspensión vírica con una concentración suficiente de partículas víricas con capacidad infectiva, lista para administrarse a la población de conejos que va a tratarse.

Según una realización adicional, el kit de la presente invención comprende además un cebo atractivo para la población de conejos que va a tratarse para la administración de la suspensión vírica a dicha población de conejos.

Aunque se ha descrito la presente invención con referencia a una realización preferida y un ejemplo práctico de aplicación de la misma, debe entenderse que los expertos en la técnica podrán aplicar variaciones y modificaciones a dicha realización sin por ello apartarse del espíritu y el alcance de la presente invención, definido por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Kit de hiperinmunización de conejos frente a RHD que comprende una cepa de virus de la RHD de campo junto con los materiales necesarios para su replicación y para la preparación de una suspensión vírica con una concentración suficiente de partículas víricas con capacidad infectiva.

2. Kit de hiperinmunización de conejos frente a RHD que comprende una suspensión vírica con una concentración suficiente de partículas víricas con capacidad infectiva, lista para administrarse a la población de conejos que va a tratarse

3. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que comprende además un cebo atractivo para la población de conejos que va a tratarse para la administración de la suspensión vírica a dicha población de conejos.

4. Uso del kit según la reivindicación 1 para la preparación de una suspensión vírica con una concentración suficiente de partículas víricas con capacidad infectiva para su administración a una población de conejos para su inmunización frente a RHD.

5. Uso según la reivindicación 4, caracterizado por que la suspensión vírica se administra a una población de conejos juveniles con menos de 8-12 semanas de edad.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, caracterizado por que la suspensión vírica se administra a la población de conejos mediante la presentación de la misma en un cebo atractivo para la población de conejos.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado por que la suspensión vírica se administra durante el período reproductor de la población de conejos, garantizando así la infección de ejemplares juveniles de menos de 8-12 semanas de edad.

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, caracterizado por que la suspensión vírica se administra repetidamente durante un intervalo temporal de 3 a 6 semanas.

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201100683

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 15.06.2011

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***A61K39/125*** (2006.01)
A61P31/14 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HUANG, H.-B. Vaccination against and immune response to viral haemorrhagic disease of rabbits: a review of research in the people's Republic of China. Revue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties). Junio 1991, Vol. 10, Nº 2, páginas: 481 - 498. ISSN 0253-1933.	1, 2
Y		3-6
Y	FERREIRA, P. G. et al. Liver disease in young rabbits infected by calicivirus through nasal and oral routes. Research in Veterinary Science. Diciembre 2006, Vol. 81, Nº 3, páginas: 362 - 365. ISSN 0034-5288. <Doi:10.1016/j.rvsc.2006.02.001>	3-6
A		1, 2
A	CALVETE, C. The use of immunization programs in wild populations: modelling effectiveness of vaccination campaigns against rabbit hemorrhagic disease. Biological Conservation. Junio 2006, Vol. 130, Nº 2, páginas: 290 - 300. ISSN 0006-3207. <Doi:10.1016/j.biocon.2005.12.025>	1-7
A	ARGÜELLO, J. L. Viral haemorrhagic disease of rabbits: vaccination and immune response. Revue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties). Junio 1991, Vol. 10, Nº 2, páginas: 471 - 480. ISSN 0253-1933.	1, 2, 4, 5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
17.12.2012	**E. Relaño Reyes**	1/6

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201100683

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 15.06.2011

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***A61K39/125*** (2006.01)
A61P31/14 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FERREIRA, P. G. et al. Adult rabbits acquire resistance to lethal calicivirus infection by adoptive transfer of sera from infected young rabbits. Veterinary Immunology and Immunopathology. Febrero 2008, Vol. 121, Nº 3-4, páginas: 364 - 369. ISSN 0165-2427. <Doi:10.1016/j.vetimm.2007.09.005>	1, 2, 4, 5
A	CALVETE, C. et al. Effects of vaccination against viral haemorrhagic disease and myxomatosis on long-term mortality rates of european wild rabbits. The Veterinary Record. Septiembre 2004, Vol. 155, Nº 13 , páginas: 388 - 392. ISSN 0042-4900.	1, 2, 4, 5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
17.12.2012	**E. Relaño Reyes**	2/6

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPDX, NPL, XPESP, XPESP2

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.12.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-8	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	7, 8	**SI**
	Reivindicaciones	1-6	**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	HUANG, H.-B. Revue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties). Junio 1991, Vol. 10, Nº 2, páginas: 481 - 498.	06.1991
D02	FERREIRA, P. G. et al. Research in Veterinary Science. Diciembre 2006, Vol. 81, Nº 3, páginas 362 - 365.	12.2006
D03	CALVETE, C. Biological Conservation. Junio 2006, Vol. 130, Nº 2, páginas: 290 - 300.	06.2006
D04	ARGÜELLO, J. L. Revue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties). Junio 1991, Vol. 10, Nº 2, páginas: 471 - 480.	06.1991
D05	FERREIRA, P. G. et al. Veterinary Immunology and Immunopathology. Febrero 2008, Vol. 121, Nº 3-4, páginas: 364 - 369.	02.2008
D06	CALVETE, C. et al. The Veterinary Record. 25 Septiembre 2004, Vol. 155, Nº 13, páginas: 388 - 392.	25.09.2004

En D01 se describe el desarrollo de una vacuna frente la enfermedad hemorrágica en conejos, a partir de cepas inactivadas de virus de la enfermedad hemorrágica en conejos (RHDV) procedentes de regiones afectadas por la epidemia.

D02 presenta un estudio sobre la capacidad infectiva por vía oral del RHDV en conejos de cuatro semanas de edad. Esto es debido a que se conoce la resistencia de los gazapos menores de ocho semanas a padecer la enfermedad, siendo una de las posibles causas, el que no son infectados por el virus. Sin embargo, este estudio demuestra que el RHDV es infectivo por vía oral, siendo los síntomas presentados por los gazapos los correspondientes a una enfermedad moderada.

En D03 se desarrolla un modelo teórico sobre el comportamiento de la población de conejos, tras la vacunación con el RHDV. Aunque recalcan la necesidad de realizar estudios de campo, apuntan como la mejor época para la vacunación la segunda mitad del periodo de cría, que es cuando hay un mayor porcentaje de conejos jóvenes. Sin embargo, destacan la necesidad de vacunar conejos de todas las edades, no solo a los jóvenes. También se citan los inconvenientes de la administración de la vacuna mediante inyección, apuntando la necesidad del desarrollo de vacunas transmisibles.

D04 investiga la efectividad de una vacuna trente al RHDV que comprende el virus inactivo, afirmando que el mejor momento para la vacunación en las granjas, es cuando los conejos tienen diez semanas.

En D05 se presenta un estudio sobre la respuesta inmune desarrollada por conejos de cuatro semanas, a los que se les ha inoculado una cepa infectiva del RHDV, no indicándose la procedencia de la misma. Dichos gazapos desarrollaron una respuesta inmune protectora, y no padecieron la enfermedad tras una segunda inoculación del virus a las ocho semanas de edad. Además, el suero obtenido de estos conejos, fue capaz de proteger de la enfermedad a conejos adultos no inmunizados. Sin embargo, los autores consideran que la convivencia en el mismo hábitat de conejos adultos no inmunizados con conejos jóvenes infectados, producirá el contagio y muerte de los adultos.

D06 divulga un estudio de campo sobre los efectos de la vacunación contra la mixomatosis y el virus de la enfermedad hemorrágica, con vacunas comerciales. Concluye que, aunque el efecto de la vacunación contra el RHDV es beneficioso en los conejos jóvenes, a nivel poblacional puede resultar perjudicial al aumentar la edad media de los conejos infectados, y por lo tanto la probabilidad de que no sobrevivan a la enfermedad.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud tiene por objeto, un kit que comprende una cepa de campo infectiva del RHDV junto con los materiales necesarios para su replicación y la preparación de una suspensión vírica con capacidad infectiva, o con una suspensión vírica ya apta para administrar a los conejos, junto con un cebo (reivindicaciones de la 1 a la 3). También se incluye el uso del primer kit para preparar una suspensión vírica para la inmunización de conejos de menos de 8-12 semanas frente al virus de la enfermedad hemorrágica (RHDV), mediante la presentación de la suspensión en un cebo cada 3 a 6 semanas, durante el periodo reproductor de la población (reivindicaciones de la 4 a la 8).

1. NOVEDAD (Art 6.1 L. P.)

Las reivindicaciones de la 1 a la 8 cumplen el requisito de novedad (art. 6.1. L. P).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1. L. P.)

2.1. REIVINDICACIONES 1 Y 2

El objeto de la presente solicitud, es un kit que comprende una cepa de campo del RHDV junto con los materiales necesarios para su replicación y la preparación de una suspensión con capacidad infectiva (reivindicación 1), o un kit que comprende una suspensión del RMDV con capacidad infectiva (reivindicación 2).

En D01 se divulga el desarrollo de una vacuna inactivada frente al RHDV. Ésta se obtuvo a partir de cepas aisladas con capacidad infectiva, procedentes de regiones afectadas por la epidemia. Aunque no se indica que el virus infectivo se incluyera en un kit, ya sea en forma de suspensión o con los elementos necesarios para la constitución de la misma, se considera obvia la formación del mismo.

En consecuencia, a la luz de D01, se opina que las reivindicaciones 1 y 2 no tienen actividad inventiva (art. 8.1 L.P.).

2.2. REIVINDICACIÓN 3

La reivindicación 3 tiene por objeto un kit que comprende una cepa de campo del RHDV con capacidad infectiva, junto con un cebo para conejos.

D01 anticipa el aislamiento y utilización de cepas de campo infectivas.

La diferencia entre D01 y la solicitud, es que en D01 no se especifica que la infección de los conejos se realice mediante la administración el virus por vía oral.

El efecto técnico es una administración menos traumática y más sencilla.

D02 investiga los motivos por los que los gazapos de menos de ocho semanas sobreviven a la infección por el RHDV. Para ello, estudian la capacidad de infección oral o nasal del virus en los conejos de esta edad, demostrando que se produce tal infección. Aunque no se especifica la administración de la composición vírica mediante un cebo, ésta es una de las opciones rutinarias de las que dispone un experto en la materia, a la hora de dar una sustancia por vía oral a animales.

Por lo tanto, un experto en la materia intentaría la producción de un kit que comprendiera una cepa RHDV de campo con capacidad infectiva y de replicación (D01) junto con un cebo para conejos (D02) con una expectativa razonable de éxito.

En consecuencia, dada la combinación de D01 junto con D02, la reivindicación 3 no cumple el requisito de actividad inventiva (art. 8.1 L.P.).

2.3. REIVINDICACIONES DE LA 4 A LA 6

El objeto de la solicitud, es el uso de un kit que comprende una cepa de RHDV de campo, para la preparación de una suspensión vírica con capacidad infectiva, para la inmunización de conejos menores de ocho semanas de edad frente al RHDV, mediante la administración del virus en un cebo (reivindicaciones de la 4 a la 6).

D02 muestra un estudio en el que se inocula por vía oral el RHDV en conejos de cuatro semanas. Éstos desarrollan respuesta inmune, siendo los síntomas que presentan los correspondientes al padecimiento moderado de la enfermedad.

La diferencia entre la presente solicitud y D02 es que no se conoce el origen de la cepa.

D01 divulga el uso de cepas aisladas de los focos epidémicos en la fabricación de una vacuna.

Se entiende, que un experto en la materia intentaría la obtención de un kit que comprendiera una cepa de campo del RHDV (D01) para fabricar una suspensión vírica con capacidad infectiva para la inmunización de conejos menores de ocho semanas, mediante su administración en un cebo (D02), con una expectativa razonable de éxito.

Así, a la luz de D01 junto con D02, las reivindicaciones de la 4 a la 6 no presentan actividad inventiva (art. 8.1 L.P.).

2.4. REIVINDICACIONES 7 Y 8

Las reivindicaciones 7 y 8 tienen actividad inventiva (art. 8.1 L.P.).