

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

C/ Campezo, 1
Edificio 8
28022 - Madrid
España

PROCEDIMIENTO NACIONAL

INFORME DE EVALUACIÓN PÚBLICAMENTE DISPONIBLE PARA UN MEDICAMENTO VETERINARIO

TRICHOBOVIS
liofilizado y disolvente para suspensión inyectable



MÓDULO 1

RESUMEN DEL MEDICAMENTO

Nº de trámite / Nº de RAEFAR	20200000143
Nombre, concentración y forma farmacéutica	TRICHOBOVIS liofilizado y disolvente para suspensión inyectable
Solicitante	CZ Veterinaria, S.A. La Relva S/N – Torneiros – Porriño - Pontevedra
Sustancia activa	<i>Tritrichomonas foetus</i> inactivado
Código ATCvet	QI02AO
Especies de destino	Vacas para reproducción (a partir de 18 meses de edad)
Indicaciones de uso	Para la inmunización activa de las hembras del ganado bovino con el objetivo de reducir la duración media de la infección genital producida por <i>T. foetus</i> y reducir el intervalo entre partos.



MÓDULO 2

El resumen de características del producto o ficha técnica está disponible en la página de Internet de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (<http://www.aemps.gob.es/>).

MÓDULO 3

INFORME DE EVALUACIÓN PÚBLICO

Bases legales de la solicitud original	Solicitud nacional de acuerdo con el Real Decreto 1246/2008 de 18 de julio, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y farmacovigilancia de los medicamentos veterinarios fabricados industrialmente
Fecha del Comité de Medicamentos Veterinarios donde finalizó la evaluación del procedimiento nacional	9 de febrero de 2022
Fecha de la primera autorización	Marzo 2022
Estados miembros afectados	España (ES)

1. VISIÓN GENERAL CIENTÍFICA

Para informes de evaluación públicos durante la primera autorización en un registro:

Esta solicitud se presentó por procedimiento nacional, como solicitud completa de acuerdo con la Directiva 2001/82/CE, modificada por la Directiva 2004/28/CE. La vacuna Trichobovis fue clasificada como MUMS por el CVMP en su reunión del 15-16 de Abril de 2019.

El titular de la autorización de comercialización es CZ Veterinaria, S.A.

La vacuna Trichobovis liofilizado y disolvente para suspensión inyectable contiene *Trichomonas foetus* inactivada (basada en antígenos de trofozoítos de *T. foetus* liofilizados para su inactivación y combinados con saponina como adyuvante) como sustancia activa para ser administrada por vía subcutánea a bovinos.

La pauta vacunal establecida es de 2 dosis de 2 ml, separadas por un intervalo de 21 días por vía subcutánea como primovacunación, que se administrará en hembras a partir de 16 meses de edad; queda sujeta al criterio del veterinario clínico la posible revacunación posterior de los animales.

El solicitante remitió la Descripción Detallada del Sistema de Farmacovigilancia (DDSF) a cuyo frente se encuentra una Persona Cualificada Responsable, en cumplimiento de los requisitos de la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de noviembre de 2001, por el que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios, en su art. 12, apdo 3, letra k. Así mismo, el solicitante envió un Plan de Gestión de Riesgos

Todas las fases de la fabricación (de la sustancia activa y del producto terminado), así como la liberación de los lotes, se llevan a cabo en CZ Veterinaria, S.A. Aporta el expediente autorización



de fabricación de medicamentos de uso veterinario emitida por la AEMPS; y certificado de cumplimiento de NCF/GMP, emitido por la Xunta de Galicia.

Todas las fases de la fabricación de la sustancia activa y del producto terminado, así como la liberación de los lotes, se llevan a cabo en CZ Veterinaria, S.A. Durante la fabricación del medicamento se emplean ensayos y métodos validados; además, se efectúan durante todo el proceso controles adecuados de modo que todas las operaciones garantizan la elaboración de un producto consistente que permite sea liberado para su comercialización.

El medicamento puede ser usado con seguridad en la especie de destino conforme a los resultados de los estudios aportados; además, las reacciones adversas observadas, frecuentes pero leves, se resuelven por sí solas y se describen de forma adecuada en la ficha técnica.

Por otro lado, se trata de un medicamento que, empleado en las condiciones de uso recomendadas, resulta seguro tanto para el usuario como para el medio ambiente. La ficha técnica contiene las advertencias y precauciones correspondientes.

En cuanto a la eficacia el medicamento demostró cumplir con las afirmaciones hechas en la ficha técnica, en cuanto a que la inmunización con el producto permite reducir la duración media de la infección genital producida por *T. foetus* y reducir el intervalo entre partos.

En vista de todo lo anterior, el análisis global del beneficio/riesgo resultó favorable a la concesión de la autorización de comercialización.

2. ASPECTOS DE CALIDAD

A. Composición cualitativa y cuantitativa

Trichobovis contiene *Tritrichomonas foetus* inactivado (aislado 96), conteniendo 1 dosis (2 ml) 5 x 10⁷ trofozoítos, siendo su P.R. ≥ 1 (P.R., la Potencia Relativa, es obtenida como resultado del test de ELISA en suero de cobayas vacunadas en comparación con una vacuna de referencia con resultado satisfactorio en pruebas de eficacia). La elección de la cepa vacunal ha sido justificada convenientemente.

La formulación vacunal fue diseñada por el laboratorio Saluvet Innova (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid). La elección de la fórmula en su conjunto ha sido bien justificada. Las especificaciones de la misma se consideran adecuadas para el control de la calidad y los certificados de análisis demuestran que se cumplen las especificaciones indicadas.

El producto contiene un adyuvante y un estabilizador para la liofilización. Todos los materiales de partida se consideran elementos de uso habitual en productos de similares características existentes en el mercado y cumplen con las especificaciones establecidas.

El liofilizado del producto se presenta en un vial de vidrio tipo I con tapón butilo, cierre vacío y cápsula de aluminio, mientras que el disolvente es envasado, a su vez, en un vial de vidrio tipo I con tapón caucho butilo y cápsula de aluminio. Ambos tapones son perforables. Se presenta en caja de cartón conteniendo ambos viales: 1 vial de 5 dosis (volumen de 10 ml) y 1 vial de 11 ml de capacidad que contiene 10 ml de disolvente.

Trichobovis se presenta en una forma farmacéutica conocida y bien establecida (liofilizado y disolvente para suspensión inyectable) y su desarrollo farmacéutico se describe adecuadamente, con arreglo a lo descrito en las Guías europeas relevantes.

B. Descripción del método de fabricación

El medicamento se ha fabricado de acuerdo con un proceso de fabricación GMP, en un lugar debidamente autorizado y conforme a técnicas convencionales de fabricación; así mismo, de acuerdo con la Farmacopea Europea, la legislación aplicable y las directrices europeas correspondientes.

La consistencia en la fabricación, ha quedado debidamente demostrada.

Se describe también la fabricación del disolvente que acompaña al liofilizado.

A lo largo del proceso se procede a la validación de los equipos de cultivo, de la formulación y de la inactivación. En resumen, el proceso de inactivación y el límite de detección del control de inactivación están correctamente validados.

C. Control de los Materiales de Partida

En relación con los materiales de partida incluidos en la Farmacopea Europea, aquellos de origen no biológico satisfacen lo exigido en aquella mediante los correspondientes certificados. Por otro lado, se incluye una evaluación del riesgo de la utilización de sustancias de origen animal conforme al capítulo 5.2.5. En ambos casos se aportan los correspondientes certificados CEP y de irradiación.



Los materiales de partida no incluidos en una Farmacopea, de origen biológico y no bilógico, se consideran adecuadamente controlados. Las semillas maestra y de trabajo se han fabricado de acuerdo a un sistema de lotes de semilla, de acuerdo a las directrices en vigor.

D. Pruebas de control efectuadas en una fase intermedia del proceso de fabricación

Los controles realizados durante la fabricación han sido adecuadamente descritos y, cuando correspondía, conforme a las pautas establecidas en la Farmacopea Europea.

E. Pruebas de control del producto terminado

Los controles llevados a cabo sobre el producto final son conformes a los requisitos actuales para vacunas inactivadas. Los controles incluyen las características generales del producto (aparición, volumen de llenado, pH y control de vacío), identidad de la sustancia activa, potencia, determinación del adyuvante, esterilidad, humedad residual y control de inactivación.

Se han establecido los límites de aceptación para cada control y se describen los métodos de análisis. Cuando ha sido necesario, el método ha sido validado.

F. Consistencia entre lotes

Básicamente, la demostración de la consistencia entre lotes se basa en los resultados de 4 de ellos fabricados de acuerdo con los métodos descritos en el dossier: Los obtenidos en los controles en proceso (sobre *bulk*) y en producto terminado fueron conformes a especificaciones. Se han proporcionado, además, datos de 3 lotes de disolvente cuyos resultados fueron igualmente conformes a especificaciones.

Se presentan protocolos completos de 4 lotes consecutivos de acuerdo con las plantillas de EDQM, donde figuran los resultados de todas las pruebas realizadas durante la fabricación y con el producto terminado; así como también se presentan protocolos de 3 lotes de disolvente.

Los datos presentados confirman la consistencia del proceso de fabricación.

G. Estudios de estabilidad

La propuesta de un periodo de validez de 2 años para el medicamento veterinario acondicionado para su venta, tanto para el liofilizado como para el disolvente, se basa en un estudio de estabilidad llevado a cabo con distintos lotes de liofilizado, fabricados de acuerdo al método descrito en la parte 2B del dossier de registro. Los envases para el estudio se mantuvieron en las mismas condiciones que las propuestas para su almacenamiento (posición vertical, protegidos de la luz, temperatura de 2-8 °C). También se realizó estudio de estabilidad sobre el disolvente.

Los datos de estabilidad, tanto en la sustancia activa como en producto terminado, incluyendo el disolvente, se han llevado a cabo de acuerdo a las directrices europeas.

No presentan estudio de estabilidad tras su reconstitución puesto que el uso es inmediato y así se refleja en la Ficha Técnica.

Conclusiones de la parte de calidad

Se ha demostrado que en las condiciones de elaboración de Trichobovis éste se ajusta a los requerimientos aplicables de calidad.

3. ESTUDIOS DE SEGURIDAD

La seguridad del producto Trichobovis administrado en la especie de destino (Vacas reproductoras a partir de 18 meses de edad) ha sido convenientemente descrita, prestando atención a los posibles efectos nocivos (residuos del medicamento, potencial presencia de sustancias en los productos alimenticios), así como a los severos riesgos potenciales para las personas o para el medio ambiente durante su manejo e inoculación. De igual modo, se han puesto de manifiesto las posibles consecuencias para la seguridad de los animales que reciben el producto.

La ficha técnica, prospecto y RCP recogen adecuadamente todos aquellos hechos relevantes relacionados con la seguridad que, de resultados de las pruebas realizadas, se ha juzgado conveniente incluir.

Las pruebas se realizaron conforme al Real Decreto 1246/2008 de 18 de julio, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y farmacovigilancia de los medicamentos veterinarios fabricados industrialmente y las recomendaciones de las Directrices aplicables.

Lotes de vacunas utilizados en los ensayos de seguridad.

Pruebas de laboratorio

Para la obtención de antígeno vacunal, se produjeron *in vitro* trofozoítos con arreglo al protocolo interno. Las dosis de vacunación se ajustaron a 3×10^7 y 10^7 trofozoítos de *T. foetus* para las vías de administración SC (subcutánea) e IN (intranasal), respectivamente (Estudio I); y 5×10^7 y 10^7 trofozoítos de *T. foetus* para las vías de administración SC e IV (intravaginal), respectivamente (Estudio II). El aislado vacunal y el de desafío provenían de 2 explotaciones diferentes de vacuno de raza Asturiana de Montaña infectadas por tricomoniasis, localizadas en Asturias. En ambos estudios uno de los grupos se inmunizó utilizando la vacuna comercial Trich Guard® (Boehringer® Ingelheim).

Pruebas de campo

Los lotes de Trichobovis utilizados en el grupo 1 de este estudio fueron vacunados con los lotes número 163646 y 163907, conteniendo cada dosis (2 ml) de vacuna reconstituida 5×10^7 trofozoítos liofilizados del aislado 96 de *T. foetus* (el grupo 2 recibió PBS como placebo y el 3 se dispuso como control negativo).

Pruebas de laboratorio

Seguridad de la administración de una sola dosis.

Se cubrió este apartado a partir de 2 estudios que también abarcaron la seguridad de la administración repetida de una sola dosis.

Estudio 1. Desarrollo de vacunas dirigidas frente a la infección por *Tritrichomonas foetus* en el ganado bovino. Objetivo: Evaluar la seguridad y la eficacia de diferentes formulaciones vacunales y vías de administración en un modelo bovino frente a la infección experimental por *T. foetus* en la especie destino.

Se utilizaron 49 novillas vírgenes (24-36 meses de edad) de la raza Holstein distribuidas al azar en los diferentes grupos con arreglo a la información de la siguiente Tabla:



Grupo	Número de Animales	Inmunización	Vía de administración	Desafío
1	6	A ¹ /A ¹	SC/SC	SI
2	6	A ¹ /A ¹	SC/IN	SI
3	7	A ¹ /A ²	SC/IN	SI
4	7	A ¹ /C ¹	SC/IN	SI
5	6	B ¹ /B ¹	SC/IN	SI
6	7	Trich Guard®	SC/SC	SI
7	7	PBS	SC/SC	SI
8	3	PBS	SC/IN	NO

1: Dosis alta (3×10^7 trofozoitos de *T.foetus*/dosis vacunal); 2: Dosis baja (10^7 trofozoitos de *T.foetus*/dosis vacunal)
B: Antígeno vacunal basado en trofozoitos de *T.foetus* liofilizados; SC: subcutánea; IN: intranasal

El diseño experimental del estudio queda reflejado en la siguiente Tabla, que recoge la distribución de grupos y vacunación.

Grupo de tto	Nº Animales	Vacunación, 1ª dosis (T0) 19.07.13		Vacunación, 2ª dosis (T21) 09.08.13	
		Producto	Vol./Vía admin	Producto	Vol./Vía admin
G5 Vacunado	6	Vacuna inactivada <i>T. foetus</i>	2 mL/SC*	Vacuna inactivada <i>T. foetus</i>	2 mL/IN**
G7 Control +	7	PBS estéril	2 mL/SC	PBS estéril	2 mL/IN
G8 Control -	3	PBS estéril	2 mL/SC	PBS estéril	2 mL/IN

SC*: subcutánea; IN**: intranasal

La evaluación de la seguridad, para ambas dosis, se llevó a cabo mediante exámenes individuales de todos los animales, que incluían:

- Registro de temperatura rectal: Después de cada dosis de vacuna, diaria durante la primera semana post inoculación de cada vacuna, y al menos dos veces a la semana durante el resto del experimento.
- Registro de reacciones adversas locales y/o sistémicas: observación diaria de los animales.

Estudio 2. Desarrollo de una vacuna inactivada frente a la infección por *Tritrichomonas foetus* en el ganado bovino basada en trofozoitos liofilizados. Objetivo: Valorar la seguridad y la eficacia de la vacuna frente a la infección experimental por *T. foetus* en la especie destino, en un modelo bovino experimental.

Se utilizaron 44 novillas vírgenes de la raza Holstein libres de anticuerpos frente a *T. foetus* distribuidas al azar en los diferentes grupos con arreglo a la información de la siguiente Tabla:

Grupo	Número de Animales	Inmunización	Vía de administración	Desafío
1	11	B ¹ /B ¹	SC/SC	SI
2	11	B ¹ /B ²	SC/IV	SI
3	10	Trich Guard®	SC/SC	SI
4	9	PBS	SC/SC	SI
5	3	PBS	SC/IN	NO

1: Dosis alta (5×10^7 trofozoitos de *T.foetus*/dosis vacunal); 2: Dosis baja (10^7 trofozoitos de *T.foetus*/dosis vacunal)
B: Antígeno vacunal basado en trofozoitos de *T.foetus* liofilizados; SC: subcutánea; IV: intravulvar



El diseño experimental del estudio queda reflejado en la siguiente Tabla, que recoge la distribución de grupos y vacunación.

Grupo de tto	Nº Animales	Vacunación, 1ª dosis (T0) 30.09.14		Vacunación, 2ª dosis (T21) 21.10.14	
		Producto	Vol./Vía admin	Producto	Vol./Vía admin
G1 Vacunado	11	Vacuna inactivada <i>T. foetus</i>	2 mL/SC*	Vacuna inactivada <i>T. foetus</i>	2 mL/SC
G4 Control +	11	PBS estéril	2 mL/SC	PBS estéril	2 mL/SC
G5 Control -	3	PBS estéril	2 mL/SC	PBS estéril	2 mL/SC

SC*: subcutánea

La evaluación de la seguridad se diseñó de manera análoga a la efectuada para el estudio 1.

Resultados. Ambos estudios (1 y 2) mostraron aumentos de temperatura breves, pasajeros y estadísticamente significativos en los individuos vacunados, de forma particular los primeros días tras la inoculación (días 1 y 2), tras la segunda dosis y después de 2 administraciones por vía SC; y ausencia de signos clínicos sistémicos tras ambas inoculaciones en todos los grupos experimentales. En cuanto a las reacciones locales se evidenciaron tras la administración subcutánea en los animales vacunados (edema, tumefacción, dolor y aparición de nódulos, patentes entre los días 1 y 20 post inoculación; presentaban los animales lesiones cuyo tamaño era estadísticamente significativo en relación con su diámetro hasta el día 9 o 10 post inmunización dependiendo de si recibieron la primera o la segunda dosis vacunal). En el punto 4.6 del RCP y resto de textos queda reflejada toda ésta información.

Seguridad de la administración (única) de una sobredosis. No se presentaron estudios y se consideró aceptable.

Seguridad de la administración repetida de una sola dosis en la especie diana. Este apartado queda cubierto con el estudio de la administración 1 sola dosis (ver más arriba, Seguridad de la administración de una sola dosis).

Examen de la función reproductora. Se realizaron estudios de forma específica sobre la función reproductora -seguridad de la administración de la vacuna durante la gestación- debido a que la vacuna se utiliza, precisamente, por la afección que la enfermedad causa en animales reproductores, y persigue reducir la sintomatología que la patología provoca (ver RCP, 4.2). La vacuna demostró que su administración era segura durante la gestación en condiciones de campo (ver más abajo y Parte 3c).

Examen de la función inmunológica. La respuesta inmunitaria se valoró en los animales participantes en los estudios 1 y 2 (Ver Seguridad de la administración de una sola dosis). De todos ellos se tomó muestra de sangre y moco cérvico-vaginal hasta 21 días después de la segunda dosis de vacuna para determinar la respuesta inmunitaria mediante ELISA de tipo:

- Humoral para la detección de IgG en suero;
- Local en el tracto genital para la detección de IgA.

Los datos individuales de IgG e IgA fueron expresados en IRPC (índice relativo por 100), cuyo valor en cada muestra se obtuvo a partir de los valores de densidad óptica (DO) de la muestra problema y los obtenidos con las dos réplicas de los controles positivo y negativo, según la fórmula $IRPC = (DO_{405} \text{ muestra} - \text{media } DO_{405} \text{ control negativo}) / (DO_{405} \text{ control positivo} - \text{media } DO_{405} \text{ control negativo}) \times 100$.



En los dos estudios los respectivos grupos vacunados mostraron incremento significativo de los niveles séricos de IgG específicas tras inmunizarse, más acusados tras la segunda dosis, frente a los no vacunados; en cuanto a los niveles de IgA, en la respuesta inmunitaria a nivel genital se constató un incremento significativo en el grupo vacunado frente a los controles y la asociación niveles de IgA-tiempo de infección genital a diferentes días post infección arrojó una correlación negativa, significativa para el grupo vacunado; también fue negativa la correlación de la pervivencia del parásito en tracto genital (moco cérvico-vaginal) en días post infección (p.i.). En cuanto a los niveles protectores de IgA, calculados a través de su concentración eficaz 50 (CE₅₀), los animales vacunados mostraron que a niveles medios o altos de IgA la mayoría de los individuos eliminaba la infección antes de 28 días.

Existe, por otra parte, correlación positiva significativa entre los niveles de IgG y los de IgA en distintos días post infección del estudio.

En resumen, la inmunización provoca unas respuestas humoral y local específicas que propiciarían una eliminación más temprana de la infección del tracto genital y la disminución del riesgo para el embrión/feto.

Seguridad para el usuario. La identificación y caracterización de los riesgos se abordó desde 2 perspectivas:

- Riesgo específico de los diferentes componentes de la vacuna. Ni el principio activo, inactivado, ni los excipientes que forman parte de la presente vacuna son relevantes para la seguridad del usuario; sin embargo, el adyuvante, Quil A, habitual en vacunas animales, podría, debido a sus propiedades, producir efectos a nivel local en el punto de inyección (como así sucede y fielmente refleja el RCP).
- Valoración del riesgo derivado de la exposición. La vacuna es un producto inmunológico que se administra de forma individual en la especie de destino por vía subcutánea. previa reconstitución. Existe un riesgo específico para el usuario asociado con el manejo y administración de la vacuna, siendo el principal el derivado de una auto-inyección accidental. Incidiendo en esto último, han sido incluidas las correspondientes advertencias en el RCP (apartado 4.5) y en el prospecto (12).

Estudio de los residuos. Ninguno de los excipientes supone riesgo para el ser humano, otras especies o el medio ambiente al no precisar ninguno de ellos de límite máximo de residuos (LMR) conforme al Reglamento 37/2010/UE; excipientes que, por otra parte, se presentan a concentraciones extremadamente bajas. El empleo de la saponina (Quil A) como adyuvante también se considera seguro en productos inmunológicos y no requiere límite máximo de residuos (LMR), tal y como se indica en el Reglamento 37/2010/UE.

Interacciones. No se ha evaluado la interacción de la vacuna con otros productos. Por tanto, se ha incluido el correspondiente aviso en la Ficha Técnica y demás textos relacionados.

Estudios de campo

La seguridad (junto a la eficacia) de la vacunación frente a la tricomonosis bovina causada por *Tritrichomonas foetus* en condiciones de campo se abordó mediante el estudio Ref. TRIVAC-FR-RD-1, "Prueba de seguridad y eficacia de una vacuna inactivada frente a la tricomonosis bovina en condiciones de campo". El estudio se desarrolló entre 2016 y 2018.

Material y métodos



Diseño experimental. La prueba (ensayo doble-ciego de grupos paralelos, aleatorizada y estratificada) se llevó a cabo en 14 rebaños seleccionados de explotaciones de vacas nodrizas de la raza Asturiana de Montaña infectadas por *Tritrichomonas foetus*. Los animales infectados de cada rebaño se dividieron de forma aleatoria simple en uno de 2 grupos de tratamiento para recibir, vía SC, 2 dosis de vacuna/placebo con 21 días de separación:

Grupo 1 - Lote A. Hembras vacunadas con Trichobovis (Cada dosis de vacuna reconstituida contiene 5×10^7 trofozoítos liofilizados del aislado 96 de *T. foetus*; lotes 163646 y 163907) e infectadas.

Grupo 2 – Lote B. Hembras no vacunadas (tratadas con placebo, PBS, lotes 170896 y 170920) e infectadas.

Además, se incluyó un control negativo único para todos los rebaños (Grupo 3, no vacunado y no infectado).

21 días después de la segunda dosis las hembras (grupos 1 y 2) entraron en contacto con los machos infectados, método de desafío escogido para el estudio (la exposición al parásito mediante la cubrición de las vacas por toros infectados de forma natural es el modo de transmisión habitual en el ganado bovino).

Tamaño de la muestra. Se obtuvo un dato teórico de 460 vacas/grupo procedentes de 18-20 rebaños infectados para el tratamiento y un total de 150 hembras para el grupo control), calculado sobre un porcentaje esperado de mejora de los índices reproductivos del rebaño y partiendo del número medio aproximado de hembras por rebaño en esta raza según la bibliografía.

Selección de rebaños. La selección de rebaños infectados, respetando siempre las pautas habituales de manejo de las explotaciones, se basó en distintos criterios para machos y hembras:

Machos. En los muestreos del esmegma prepucial de sementales se consideraba infectado un rebaño si había 1-más machos infectados (positivos a *T. foetus*), los cuales, además, debían cumplir las siguientes premisas para ser incluidos en el estudio:

- Edad > 2 años; haber sido empleados como sementales en la estación reproductiva anterior.
- Haber guardado reposo sexual ≥ 14 días previos al muestreo.
- Ser negativos a la infección por campilobacteriosis por *C. fetus venerealis* en los dos muestreos efectuados.

Hembras. Pertencientes a la raza bovina Asturiana de la Montaña, con una edad > 18 meses (púber); además, disponer del historial reproductivo del rebaño del que procediera (n° de terneros nacidos e intervalo de partos de dos ciclos reproductivos anteriores a la prueba)

Quedaron excluidos los animales que no cumplían los criterios de inclusión en el momento de la inoculación antigénica; y los que sufrieran cualquier proceso que causara sufrimiento o pérdida del buen estado del animal o requiriera tratamiento que pudiera interferir en el desarrollo de la prueba (p.e., corticoides).

Evaluación de la seguridad.

La seguridad de la vacuna se valoró observando a diario la eventual aparición de sintomatología local (lesiones locales, las cuales eran valoradas, los días 0, 1, 3, 7, y 14 post vacunación) y sistémica (aparición de shock anafiláctico, cuadro de reacciones adversas graves -incapacidad persistente o significativa, presencia de defectos congénitos o reproductivos, etc.-, indicios de anorexia, cambios de comportamiento u cualquier otro signo) en los animales (grupos 1 y 2); y con la medición de la temperatura.

Se emplearon 52 vacas, 26 en cada lote (A y B), de tres rebaños distintos, denominados "explotaciones de seguridad". Al final. En total, se examinaron la temperatura rectal y las lesiones



locales en aproximadamente el 40% de los animales del lote A (26 animales analizados/63 disponibles en la explotación) y B (26/60) durante los días 0 (día de la vacunación), 1, 3 y 7 p.v.

La valoración de la respuesta inmunitaria sistémica se efectuó a través de 4 muestras de sangre tomadas los días 0 (antes de vacunar), 21, 42 y 280 post vacunación en las que se determinó el nivel de anticuerpos (IgG) frente a *T. foetus* en suero mediante un ELISA indirecto. Los resultados se expresan como valores de IRPC (índice relativo x 100) por cada muestra.

Resultados

Selección de rebaños. La evaluación de la presencia de *T. foetus* en toros resultó en 49 positivos de 41 explotaciones distintas. En las 14 explotaciones infectadas que participaron en la prueba de campo se vacunaron 411 vacas, la mitad con la vacuna en estudio y la otra mitad con placebo (grupos 1 y 2, respectivamente). 6 explotaciones más constituyeron el grupo centinela (grupo 3), cuyos toros resultaron negativos a *T. foetus* y *C. fetus venerealis* y que se conformó con 277 vacas.

Seguridad sistémica. No se observaron shock anafiláctico, reacciones sistémicas anormales ni acontecimientos adversos graves (muerte por causas atribuibles a la vacunación, efectos abortigénicos o teratogénicos, efectos negativos sobre la descendencia) en ninguno de los animales control, ni en ninguno de los animales vacunados.

Temperatura rectal. No se observaron diferencias entre los animales del lote A y B, ni entre la primera y segunda dosis en los días analizados (0, 1, 3 y 7 p.v.; $P > 0,05$; t-Student).

Seguridad local. Tras la primera dosis cerca del 40% (rango 0-80%) del total de los animales mostraron reacción, en torno al 60% tras la segunda (rango 33-100%). 10 animales mostraron reacción inflamatoria en el punto de inoculación cuyo tamaño medio el día 14 p.v. de la primera dosis fue de $0,85 \pm 1,27$ cm, remitiendo totalmente a los 21 días; después de la segunda dosis, 16 animales mostraron reacciones inflamatorias (tamaño medio, $6,54 \pm 11,05$ cm el día 1 p.v.) que desaparecieron por completo a los 21 días en todos los casos.

Respuesta inmunitaria sistémica. Se observó un aumento significativo de los niveles de IgG séricas frente a *T. foetus* (como valores de IRPC) cuyo máximo se alcanzó el día 42 en los animales vacunados (lote A) en función del tiempo comparado con los niveles mostrados por el grupo no vacunado (lote B); los niveles detectados a los 280 días p.v. en los animales del lote A fueron bajos, aunque significativamente superiores a los del lote B. El nivel de IgG en suero frente a *T. foetus* mostró un aumento significativo de los valores de IRPC en los animales vacunados con el lote A en función del tiempo y en comparación con el lote B. A día 280 los valores a día 280 p.v. de IgG de los animales del lote A disminuyeron drásticamente ($P < 0,0001$), si bien resultaron significativamente superiores a los observados en los animales del lote B ($P < 0,0001$).

Conclusiones

La administración de Trichobovis a vacas en campo no propició incrementos significativos de temperatura ni aparición de reacciones sistémicas graves atribuibles a la vacunación; tampoco dio lugar a reacciones locales distintas a las observadas previamente en laboratorio. Trichobovis no causó efectos abortigénicos, teratogénicos o sobre la descendencia.

Evaluación del riesgo ambiental

Al analizarse los riesgos para el medio ambiente derivados del uso de Trichobovis, tratándose de un principio inactivado la capacidad de réplica es despreciable, y por tanto, también la de sobrevivir, diseminarse o resultar patógeno para otros organismos; tampoco el resto de



componentes de la vacuna poseen capacidad de provocar efectos tóxicos. Además, el tipo de producto, su modo de administración y su manipulación reducen el riesgo de contacto con el medio. No se identifica, en definitiva, riesgo alguno asociado a la administración de Trichobovis, la probabilidad de ocurrencia puede considerarse nula y por tanto el riesgo global de su administración puede asimilarse a cero.

Las recomendaciones y precauciones incluidas en la información del producto son genéricas (centradas en la eliminación de envases no empleados o de los residuos resultantes de la aplicación) pero adecuadas para garantizar la seguridad del medioambiente, siempre y cuando se apliquen correctamente, igual que el empleo del medicamento. Las advertencias han sido incluidas en el RCP, punto 6.6 y en el prospecto, punto 13.

Conclusiones de la parte de seguridad

La vacunación con Trichobovis se mostró segura tanto en laboratorio como en campo. Los efectos observados en los animales han sido incluidos en el RCP y textos correspondientes.

4 ESTUDIOS DE EFICACIA

Requisitos generales

Las pruebas de seguridad y eficacia se llevaron a cabo de forma conjunta para Trichobovis al haber sido éste clasificado como MUMs (Usos menores/ especies menores). Los ensayos de eficacia se ajustaron a la legislación y directrices aplicables. Además de valorarse la respuesta inmunitaria la eficacia del producto se examinó a través de la duración media de infección y de parámetros relacionados con la gestación/reproducción.

Estudios clínicos

Estudios de laboratorio

Se llevaron a cabo dos pruebas de laboratorio.

Estudio 1. Estudio de (la seguridad y) la eficacia de la vacuna frente a la infección experimental por *T. foetus* en 49 novillas vírgenes.

Diseño experimental: Los animales se distribuyeron al azar en los diferentes grupos (ver descripción en la parte de seguridad). En el estudio se emplearon diferentes formulaciones y vías de administración. Ningún grupo fue tratado a la concentración propuesta en el RCP (5×10^7 trofozoitos), ni tampoco se administraron las dos dosis por la vía propuesta (subcutánea, separadas 21 días entre sí) por lo que este estudio se consideró información de apoyo. El desafío se realizó por vía intravaginal con 3×10^6 trofozoitos de *T foetus* de un aislado heterólogo excepto el grupo G8 (control)

Se tomaron muestras de sangre semanalmente hasta el día 112 post-desafío para el análisis de la respuesta humoral (ELISA para detección de IgG) y se recogió moco cérvico-vaginal para determinar la respuesta inmunitaria en el tracto genital (ELISA para detección de IgA)

Resultados:

Evaluación de la respuesta inmunitaria

Respuesta inmunitaria a nivel sistémico. La inmunización indujo niveles de IgG significativamente más elevados después de la segunda inmunización y hasta el final del estudio en el grupo vacunado con respecto a los grupos control ($p < 0,0001$, ANOVA-Tukey).

Respuesta inmunitaria a nivel local. A nivel genital, se constató un incremento significativo de los niveles de IgA tras el desafío en el grupo vacunado, alcanzando el valor máximo en el día 28 post-desafío ($p < 0,0001$, ANOVA-Tukey). Los resultados de la asociación entre los niveles de IgA



y el tiempo de infección genital muestran una correlación negativa significativa (análisis de correlación de Pearson, días 14-65 pi) en los grupos desafiados no vacunados y en el grupo vacunado (días 14 y 21 pi). Altos niveles de IgA específicos en el moco cérvico-vaginal contribuyen a acortar el tiempo de infección del parásito (parámetro de valoración de la eficacia). Los niveles de IgA requeridos para inducir protección se estimaron mediante el cálculo de la concentración de IgA eficaz 50 (CE₅₀), definida como los niveles de IgA necesarios para producir la eliminación de la infección genital a ≤ 28 días pi (duración media de la infección en el grupo vacunado) en el 50% de los animales.

Ver Examen de la función inmunológica, parte de seguridad.

Evaluación de la eficacia

Duración de la infección. El tiempo medio en el grupo vacunado G5 fue de 32 días y todos los animales eliminaron la infección antes del día 42. Las novillas no vacunadas y desafiadas permanecieron infectadas hasta el fin del experimento (día 64 post-infección). No se observaron diferencias significativas entre grupos.

Estudio 2. Estudio de la seguridad y eficacia de una vacuna inactivada utilizando diferentes vías de administración en un modelo bovino experimental.

Diseño experimental: Se utilizaron 44 novillas vírgenes libres de anticuerpos frente a *T. foetus*, distribuidas al azar en los diferentes grupos.

21 días después de la última inmunización, las hembras de los grupos 1 al 4 fueron desafiadas vía vaginal con 3×10^6 trofozoítos viables de *T. foetus*.

Se evaluaron la respuesta inmunitaria humoral (IgG) en suero y la local (IgA) en el moco cérvico-vaginal siendo estudiadas semanalmente desde el desafío hasta el día 112 post-infección.

La eficacia se determinó analizando la duración de la infección genital mediante cultivo del parásito a partir de moco cérvico-vaginal (MCV), del que se recogieron muestras semanalmente; dichas muestras se cultivaron y se examinaron diariamente para determinar la presencia de trofozoítos móviles. Los resultados de cada grupo experimental se expresaron como el tiempo medio de infección (promedio de días con presencia de parásito detectable viable en el tracto genital).

Resultados

Evaluación de la respuesta inmunitaria.

Todos los grupos vacunados mostraron un incremento significativo de los niveles séricos de IgG tras la primera inmunización, desde el día 22 previo al desafío y así se mantuvieron hasta el final del experimento ($p < 0,0001$; ANOVA-Tukey).

A nivel genital la respuesta se caracterizó por un incremento significativo de los niveles de IgA tras el desafío en todos los grupos vacunados (grupos 1 y 3 desde el día 14 p.i. y grupo 2 desde el día 21 p.i.), y en el control positivo (desde el día 28 p.i.) ($p < 0,01$; ANOVA), permaneciendo significativamente elevados hasta el día 91 p.i. ($p < 0,0001-0,005$; ANOVA-Tukey).

Evaluación de la Eficacia.

El tiempo medio de infección fue significativamente menor en todos los grupos vacunados (1, 2 y 3) con respecto al control positivo (grupo 4) ($p < 0,05$; Log-rank Test). Los grupos vacunados presentaron un tiempo medio de infección de entre 26,7 y 28 días, mientras que las novillas de grupo 4 (no vacunadas y desafiadas) permanecieron infectadas 54,1 días de media.

En consecuencia, la eficacia del producto quedó demostrada en estudios de laboratorio controlados de desafío de acuerdo con los resultados de la respuesta inmunitaria, con incrementos de los niveles de IgG e IgA, y de la menor duración de la infección genital.



Estudios de campo

TRIVAC-FR-RD-1: Prueba de (seguridad y) eficacia de una vacuna inactivada frente a la trichomonosis bovina en condiciones de campo. El objetivo de esta prueba de campo fue determinar la inmunogenicidad y eficacia de una vacuna inactivada frente a la mencionada trichomonosis. La prueba de campo se realizó en explotaciones de vacas nodrizas de la raza Asturiana de la Montaña (AM) infectadas por *Tritrichomonas foetus*, localizadas en una zona con presencia endémica de la enfermedad.

Diseño experimental. Ver descripción detallada en la parte de estudios de campo de seguridad. Los animales, hembras bovinas en edad púber (>18 meses), se vacunaron vía SC con dos dosis de vacuna de 2 ml, separadas un intervalo de 21 días, y con una concentración de 5×10^7 trofozoítos por dosis 7 y 4 semanas antes de la cubrición. 21 días después de la segunda dosis, las hembras de los grupos 1 y 2 se pusieron en contacto con los machos infectados como método de desafío: Exposición al parásito mediante la cubrición de las vacas por toros infectados de forma natural (modo de transmisión habitual de parásito).

Ver estudios de campo de seguridad para el cálculo del número de animales teórico requerido en la prueba y los datos reales/finales de número de explotaciones y animales participantes.

Valoración de la eficacia. Para tal fin se registraron los siguientes datos reproductivos para todos los animales (hembras vacunadas/infectadas y hembras no vacunadas/infectadas) y se compararon estadísticamente (grupo 1 frente al 2):

- Intervalo entre partos
- Fecha media de partos
- Porcentaje de terneros nacidos
- Cronología de los partos estimada como porcentaje total de partos en los primeros meses de la paridera.

Valoración de la respuesta inmunitaria sistémica (Indicador secundario de eficacia). El estudio de la respuesta inmunitaria humoral (ELISA indirecto para IgG) se llevó a cabo en al menos 25 animales/grupo (grupo vacunado e infectado, grupo no vacunado e infectado), procedentes de las "explotaciones de seguridad". Se tomaron muestras antes de la vacunación (día 0), y a los 21, 42 días y día 280 p.v. Para más información, ver la parte de Seguridad.

Resultados

Histórico reproductivo de las explotaciones. Se recogieron las fechas de partos de la paridera de los años 2015, 2016 y 2017, calculándose el porcentaje de partos y el intervalo entre partos y se compararon estos índices reproductivos entre explotaciones infectadas y centinelas. En los rebaños infectados se observó un menor porcentaje de partos en los años 2015 ($p < 0,0001$; χ^2) y 2017 ($p < 0,05$; χ^2) que en los centinelas. En el periodo 2015-2017 se observó una disminución próxima al 10% en el número de terneros nacidos ($p < 0,0001$; χ^2) en las explotaciones infectadas versus centinela.

Estado sanitario frente a otras enfermedades reproductivas. Los valores de seropositividad frente a otros patógenos reproductivos (IBRv, BVDv y *N. caninum*) fueron similares en las explotaciones infectadas y en las centinela. En relación con los toros, muestreados tras el contacto con las hembras del estudio, se mantuvo la positividad en las granjas con enfermedad endémica y la negatividad en los de las explotaciones centinelas.

Respuesta inmunitaria de las hembras vacunadas (parámetro secundario de eficacia). Se recogieron muestras de suero de los animales pertenecientes a las tres explotaciones de seguridad en los días 0, 21 y 42 p.v. y en el día 280 p.v. (semana 40 p.v.). Conforme transcurrió el tiempo el número muestreado disminuyó (por no poder localizar algunas vacas o haber sido



ventas). El nivel de IgG séricas frente a *T. foetus* aumentó de forma significativa en los valores de IRPC en los animales vacunados con el lote A en función del tiempo ($p < 0,01$; t-Student) y frente al lote B ($p < 0,0001$; t-Student) (Figura 2). A día 280 p.v., los niveles de IgG de los animales del lote A, disminuyeron drásticamente ($p < 0,0001$), pero fueron significativamente superiores a los observados en los animales del lote B ($p < 0,0001$).

También se analizaron los niveles de anticuerpos en suero a las 40 semanas p.v. con el objetivo de estudiar la duración y magnitud de la inmunidad y verificar la presencia de la infección después del desafío. Los niveles de IgG detectados en los animales del lote A fueron bajos, aunque significativamente superiores a los del lote B.

Valoración de la eficacia. Para la valoración de la eficacia se realizó el registro de datos reproductivos de los animales del lote A (vacunados) y del lote B (placebo). Tras el análisis inicial se decidió eliminar algunos animales de la prueba (por edad insuficiente, ausencia de registro de partos o ausencia de datos de los animales -venta, eliminación, muerte o sacrificio-, cuyo porcentaje alcanzó el 17,15% (71/411) de los iniciales.

Intervalo entre partos y fecha media de partos. Se observó una reducción significativa de 43 días de media (IC 95%: -84,54; -2,11) en los animales del lote A *versus* el B al efectuar el análisis individual de los datos. De esta forma, la media del grupo A (hembras vacunadas/infectadas) fue de 447,22 días ($n=86$) y la media del grupo B (hembras no vacunadas/infectadas) fue de 490 días ($n=88$), tanto por pruebas paramétricas ($p=0.039$, t de Student) como no paramétricas ($p=0,01$, test de Mann-Whitne2).

En el análisis a nivel individual por explotación se observa también un acortamiento en el lote A en 9 explotaciones, siendo significativo *versus* el lote B en dos de ellas, La Trapa y Moriñigo ($p < 0,05$; t-Student). El análisis estadístico individual no se pudo realizar en 3 explotaciones por falta de datos.

Por otra parte, se comparó la fecha media de los partos del lote A (grupo vacunado) y lote B (grupo no vacunado), observándose un adelantamiento en la paridera en el lote A. Sin embargo, únicamente se observaron diferencias significativas en dos explotaciones: La Trapa y Remís ($p < 0,05$; t-Student) y tendencia en una de ellas (La Justariaga, $p = 0,05$, t-Student) donde las vacas del lote A paren de media casi un mes antes que las del lote B.

Número de terneros nacidos y partos en los primeros meses de la paridera. A fecha 30 de junio de 2018 no se observaron diferencias significativas en el número de terneros nacidos en las vacas del lote A (69%) y B (74%).

Adicionalmente se realizó un estudio de la distribución temporal de la paridera del lote A y B. Aunque las diferencias no fueron significativas ($P > 0,05$; χ^2), se observó un 7% más de partos en los meses de enero-febrero en los animales del lote A *versus* el lote B. Asimismo, un mayor porcentaje de vacas del lote B parieron en los últimos meses (mayo-junio)

Conclusiones de la parte de eficacia

Para las indicaciones propuestas la eficacia de la vacunación con Trichobovis se demostró tanto en condiciones de laboratorio como en condiciones de campo.

5. CONCLUSIÓN GLOBAL Y EVALUACIÓN BENEFICIO-RIESGO

Trichobovis fue calificado como MUMS (Usos menores/ especies menores) por el CVMP en abril de 2019. Contiene *Tritrichomonas foetus* inactivado como sustancia activa, formulada como liofilizado y disolvente para suspensión inyectable para ser administrada por vía subcutánea en



las hembras bovinas. La solicitud se presentó de acuerdo con la Directiva 2001/82/EC, modificada por la Directiva 2004/28/CE como solicitud completa.

La información presentada en el expediente demuestra que cuando el medicamento se utiliza de acuerdo con el Resumen de Características del Producto o Ficha Técnica, el perfil beneficio-riesgo para las especies de destino es favorable y la calidad y seguridad del medicamento para el ser humano y el medio ambiente es aceptable.

La vacunación permitiría el acortamiento del tiempo de infección del parásito en el tracto reproductivo de la hembra y, por tanto, la protección frente a la pérdida embrionaria/fetal como consecuencia de la infección natural por *T. foetus*. Ello redundaría en la mejora de los índices reproductivos del rebaño. En consecuencia, las indicaciones propuestas son: “Inmunización activa del ganado bovino para reducir la duración media de la infección genital producida por *T. foetus* y protección frente a pérdidas de gestación tempranas mediante la mejora de los índices reproductivos (reducción del intervalo entre partos)”.

En consecuencia, se considera positiva la relación beneficio/riesgo.



MÓDULO 4

EVALUACIONES DESPUÉS DE LA AUTORIZACIÓN

La ficha técnica actualizada está disponible en la página de Internet de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (www.aemps.gob.es/).