



Efecto del virus de Mixomatosis en el tracto reproductor del conejo macho adulto. Estudio preliminar

A. PAGES-MANTÉ y D. TORRENTS

Laboratorios HIPRA SA, Amer, Girona

apm@hipra.com

■ RESUMEN

En este estudio hemos querido conocer los efectos de los virus de Mixomatosis (MV) vacunal homólogo y del MV patógeno de referencia en el tracto reproductor masculino básicamente, testículos y semen, una vez inoculados los conejos por vía subcutánea con estos virus y tras un periodo de muestreo de 21 días.

El diagnóstico molecular mediante PCR de las muestras obtenidas nos indica presencia de MV en el semen a los 13 días postinoculación en dos de los conejos sobrevivientes inoculados con virus patógeno. Negatividad a MV en el semen de todos los conejos inoculados con virus vacunal durante toda la prueba. Presencia de MV en los testículos del 100% de los conejos inoculados con virus patógeno tras su muerte o sacrificio ante mortem y presencia de MV en el 80% de los testículos de los conejos inoculados con virus vacunal homólogo al final de la prueba. A su vez, se observaron claras diferencias a nivel anatomopatológico en los testículos de los conejos inoculados con virus vacunal y virus patógeno de referencia.

■ INTRODUCCIÓN

La Mixomatosis es una enfermedad vírica que es producida por un Poxvirus que afecta al conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*). Es una enfermedad benigna para el conejo americano (*Sylvilagus*) y fue aislado por primera vez por Sanarelli en 1898 en Uruguay. Mediante un intento de realizar una destrucción biológica de los conejos europeos fue introducida en Francia por Armand Delille, y en poco tiempo difundió por toda Europa causando los problemas que conocemos (Fenner *et al.*, 1952) desde su evidencia por Sánchez Botija en el 1954.

El tropismo del virus es dérmico pero puede afectar diferentes órganos y en especial el tracto reproductor, poco se conoce del efecto de este virus en este sistema sobretodo en miras a conocer su persistencia en el mismo y su potencial efecto reproductivo como contaminante del semen. El virus en los conejos machos se difunde a los testículos tras una inoculación intradérmica y se replica allí en altos títulos (Fenner y Woodroffe 1953). Dependiendo de la patogenicidad de la cepa los conejos pueden quedar infértiles y perder la apetencia sexual durante 12 meses (Sobey y Turnbull 1956) pero poco se ha investigado sobre este hecho. Por otra parte según Poole 1960 el conejo de monte afectado de Mixomatosis y recuperado de la enfermedad tiene infertilidad por la ausencia de espermatozoides en el epidídimo. El uso de virus atenuados de baja patogenicidad induce el retorno a la normalidad sexual cuando el virus desaparece de los testículos (S. Fountain *et al.* 1997). Con estos precedentes y por la carencia de conocimientos sobre el efecto de las cepas vacunales y patógenas sobre el tracto reproductor del conejo dado el potencial riesgo de vehicular virus de MV a través del semen (Pages-Mante .A 1996), teniendo en cuenta la popularidad de la inseminación artificial en la cunicultura industrial, hemos querido realizar este estudio preliminar en miras a conocer mejor estas cuestiones de alta relevancia actualmente.

■ MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron para esta prueba 11 conejos machos de un año de edad procedentes de (Isoquimen, Sant Feliu de Codines, Barcelona), sin vacunar de MV. Con ellos se confeccionaron dos grupos (A y B) de cinco y seis conejos respectivamente y se adecuaron en jaulas individuales con agua *ad libitum* y pienso, siguiendo las

recomendaciones de la casa preparadora en cuanto a la ración diaria. Se instalaron en dos naves de contención biológica. Antes de la prueba se entrenaron a la eyaculación asistida.

Virus de MV utilizados

El virus vacunal utilizado fue la vacuna Mixohipra .-H (Laboratorios Hipra S.A.) y la cepa patógena fue la cepa de referencia Laussane. (062-ET-97-RK13). Ambas se inocularon a razón de 10 a la 3'5 DICT 50 por conejo. El lote A se empleó para el virus vacunal y el lote B para la cepa patógena de referencia.

Extracción de las muestras

Los conejos una vez instalados en las naves de contención respectivas para los grupos A y B, se ordeñaron antes de la inoculación con los MV y posteriormente se ordeñaron a los 4, 7, 11, 13 y 21 días postinoculación. Las muestras de testículos se obtuvieron al final de la prueba o inmediatamente después del sacrificio de algún conejo afectado irreversiblemente de MV. Todas las muestras recogidas se congelaron a -30° C hasta su evaluación molecular.

Determinación molecular de MV

Las muestras de semen y testículos recogidos se procesaron por PCR de MV en Neiker (Derio, Bizkaia).

Diagnostico anatomopatológico

Una muestra de testículo se guardó en formol al 10% para su posterior diagnóstico anatomopatológico.

Resultados

Los resultados de los PCRs de semen y testículos obtenidos se reflejan en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Resultados del PCR de MV en el semen de los conejos inoculados con virus vacunal y patógeno de MV

Virus	Grupo	Nº conejo	Días extracción y resultados de PCR					
			Antes	4	7	11	13	23
Vacunal	A	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-
		4	-	-	-	-	-	-
		5	-	-	-	-	-	-
Patógeno	B	6	-	-	-	0	M	M
		7	-	-	-	-	+	M
		8	-	-	0	M	M	M
		9	-	-	-	0	M	M
		10	0	0	0	0	M	M
		11	-	-	-	-	+	M

0: Sin muestra por falta de monta; +: positivo; -: negativo; M: Animal muerto.

Tabla 2. Resultados de PCR de MV en los testículos de los conejos inoculados con virus vacunal y patógeno de MV

Virus	Grupo	Nº conejo	Día muestra	Resultado PCR
Vacunal	A	1	23 días p.i.	+
		2	23 días p.i.	+
		3	23 días p.i.	-
		4	23 días p.i.	+
		5	23 días p.i.	+
Patógeno	B	6	13 días p.i.	+
		7	13 días p.i.	+
		8	8 días p.i.	+
		9	12 días p.i.	+
		10	12 días p.i.	+

p.i.: postinoculación; +: positivo; -: negativo.

■ RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

Aunque este apartado será expresado ampliamente en otro trabajo, podemos adelantar que en los testículos de los conejos inoculados con virus vacunal solo existe degeneración testicular leve, con presencia de espermatozoides. Sin embargo, en los conejos inoculados con virus patógenos hay pérdida de células espermáticas y orquitis intersticial que va de moderada a grave, con presencia de infiltrados de células de mixoma.

■ DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En primer lugar nos gustaría dejar claro que dadas las medidas de bioseguridad y contención mantenidas durante la prueba por el personal especializado que realizó el estudio, los virus que encontramos por PCR en los lotes de conejos A y B utilizados pertenecen a los virus que les inoculamos. Esta consideración es interesante dado que el PCR utilizado amplifica el gen MA 51 que es común a los virus de MV vacunales y patógenos.

Tal como se desprende de los resultados obtenidos no hemos podido detectar por el PCR utilizado virus de MV en el semen de los conejos inoculados con virus vacunal durante toda la prueba.

En los conejos inoculados con virus patógeno que manifestaron graves lesiones de MV a partir de los 7 días postinoculación, solo se encontró MV en el semen de dos conejos sobrevivientes, obviamente con lesiones de MV que pudieron donar semen a los 13 días postinoculación. Anteriormente a esta fecha los resultados fueron negativos. Hay que manifestar que solo pudimos realizar la extracción de semen a todos ellos antes de empezar y a los 4 días, a excepción del macho 10 del que nunca se pudo extraer semen. A los 7 días solo 4 conejos dieron semen y uno (Macho 8) murió a los 8 días. A los 11 días solo dos (Machos 7 y 11) dieron semen y tres (Machos 6, 9 y 10) se sacrificaron a los 12 días. A los 13 días solo dos dieron semen y se sacrificaron posteriormente por estar terminales de MV. En este lote claramente vemos que hay posibilidad de excretar virus de MV patógeno a través del semen con el riesgo que esto puede representar sobre todo si a diferencia de lo que ha ocurrido aquí con el uso de una cepa patógena, que manifiesta síntomas, se hubiera utilizado una cepa mesogena o lentogena que al no manifestar signos clínicos tempranos ni matar al conejo nos hubiera podido dar mayor contagio seminal sin ser conscientes de ello.

Respecto al PCR de los testículos hemos podido observar que ambos virus se replican en los testículos como evidenciaron Fenner y Woodrooffe. Al final de la prueba el virus vacunal solo está presente en los testículos del 80% de los conejos. No podemos saber en este estudio si en testajes posteriores este virus desaparece, pero la lógica nos indica que sí si tenemos en cuenta que Fountain et al. manifiestan que su PCR encuentra virus de baja patogenicidad a los 120 días postinoculación tras episodios de orquitis intersticial que no produce el virus vacunal. En el mismo estudio Fountain et al. indican episodios de infertilidad de 60 días tras la inoculación de la cepa Uriarra que nunca se han descrito con las cepas vacunales. También se indica que el clearing vírico con Uriarra es de entre 20 y 30 días y que la detección de ADN vírico por PCR durante 120 días es debido a la alta sensibilidad de la técnica.

El PCR de los testículos de los conejos inoculados con virus patógeno es también positivo en todos los conejos independientemente del día de obtención de la muestra.

Consideramos que los datos obtenidos en este estudio preliminar pueden ser de gran interés para ir conociendo la relación entre detección de virus de MV en semen, clearing de virus de MV en órganos sexuales y procesos de infertilidad dependiendo naturalmente de la cepa de virus existente en la explotación. Hasta el momento podríamos concluir en que a mayor patogenicidad de la cepa de MV mayor es el efecto del virus de MV en el aparato reproductor masculino, mayor es el tiempo para que se produzca el clearing antigénico si no muere el conejo y por último mayor es el riesgo de introducir vía semen virus de MV a la vagina de la hembra.

■ AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al Dr. Jaume Serra su ayuda en el desarrollo de la parte operativa de este estudio.

■ BIBLIOGRAFÍA

- FENNER F. 1952. Myxomatosis : the virus and the disease it cause. *Austr. J. Sci.* 15, 81.
- FENNER F., WOODROOFE G.M. 1953. The pathogenesis of infectious Mixomatosis: The mechanism of infection and immunological response in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Brit . J. Exp. Path.* 34, 400.
- FOUNTAIN S., HOLLAND M.K., HINDS L.A., JANSSENS P.A., KERR P.J. 1997. Interstitial orchitis with impaired steroidogenesis and spermatogenesis in the testes of rabbit infected with an attenuated strain of myxoma virus. *Journal of Reproduction and Fertility* 110, 161-169.
- PAGÈS-MANTÉ A. 1996. Patología asociada a la reproducción de la coneja. *REA Jornadas Profesionales de Cunicultura "Especial Reproducción"*. Sitges 8.1-8.13.
- POOLE W.E. 1960. Breeding of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, (L) in relation to the environment. *Australian Wildlife Research* 5 ,21-43.
- SANARELLI G. 1898. Das myxomatogene Virus Beitrag zum Stadium der Krankheit serreger ausserhalb de Sichtbarem. *Zbl .Bakt.* (Abt. I) 23, 865.
- SANCHEZ BOTIJA C., ARROYO C., BLANCO A. 1954. Identificación de la Mixomatosis del conejo en España. *Rev. Patron. Biol. Anim.* 1, 75.
- SOBEY W.R., TURNBULL K. 1956. Fertility in rabbits recovering from Mixomatosis. *Aus. J. Biol. Sci.* 9, 455.