

Vacunación combinada contra mixomatosis y VHD. Una innovación en la producción cunícola.

Stephan Lemiere*, Javier Torrubia**

*Merial AGE, 44153 Ancenis, Francia.

**Merial AGE, c/Tarragona, 161, 08014 Barcelona.

Resumen

La vacunación combinada contra la mixomatosis y la enfermedad vírica hemorrágica (VHD) representa una innovación en la producción cunícola. La seguridad de la vacuna ha sido comprobada de acuerdo a la legislación europea en vigor. La cepa vacunal SG33 no mostró ninguna difusión entre conejos SPF en condiciones de laboratorio, tampoco demostró reversión a la virulencia, ni influencia alguna sobre la inmunidad humoral. La administración de una dosis doble de la vacuna combinada a hembras, demostró no tener ninguna repercusión sobre la gestación ni sobre la descendencia. Las pruebas de desafío en las que se utilizaron cepas virulentas de los virus de mixomatosis y de VHD, en condiciones de laboratorio, demostraron la eficacia de la vacuna.

Abstract

Combined vaccination against mixomatosis and VHD represents an innovative approach in rabbit production. Safety of the vaccine has been tested according to the European legislation in force. Vaccine strain SG33 did not show any spread amongst SPF rabbits in laboratory conditions, no reversion to virulence, and no influence upon humoral immunity. The administration of a double dose of the combined vaccine to females, had no influence upon pregnancy and progeny. Challenge tests in which virulent strains of the mixomatosis and VHD viruses were used, in laboratory conditions, demonstrated the effectiveness of the vaccine.

Introducción

Dentro de la patología que afecta a los conejos, se incluyen 2 enfermedades víricas muy importantes, la mixomatosis y la enfermedad vírica hemorrágica (VHD). La mixomatosis, reconocida primeramente en Sur-América, fue introducida intencionadamente en Francia en 1952 y a partir de allí, se transmitió al resto de los países europeos en unos pocos años. Los primeros casos de VHD aparecieron en China en 1984 y la primera referencia en Europa, fue en Italia, en 1986. En España, apareció por primera vez a mediados de 1988 en Asturias y 1 año después, en toda la península. Rápidamente ocurrió una distribución mundial.

Se lucha contra ambas enfermedades mediante vacunas. Las primeras vacunas contra mixomatosis se produjeron a partir del virus del fibroma de Shope, conocidas como vacunas heterólogas, ya que posteriormente se aislaron y atenuaron cepas propias de conejos, conocidas como homologas, mas inmunógenas que las primeras. Una de estas cepas homologas es la cepa SG33. Contra VHD, desde el principio se han utilizado vacunas inactivadas preparadas a partir de hígados de conejos infectados, ya que el calicivirus causante, no se propaga en líneas celulares. Hasta ahora, las vacunaciones se realizaban de forma separada, con 2 vacunas diferentes, de forma que la vacuna combinada representa una gran innovación para la industria cunicola, que se viene utilizando en Francia desde mitad de 1999. El desarrollo de esta vacuna combinada, ha llevado varios años y ha involucrado a los equipos de investigación y desarrollo de los laboratorios Merial en Lyon, Francia. La nueva vacuna combinada, denominada Dercunimix@, esta constituida por un liofilizado que contiene la cepa homologa SG33 contra la mixomatosis y un líquido preparado a partir de la cepa de campo AG88 de la VHD, con un adyuvante de hidróxido de aluminio.

Debido al riesgo de transmisión de enfermedades de un animal a otro, al utilizar la vía subcutánea, a menos que se utilicen muchas precauciones, también se desarrollo un dispositivo específico de vacunación para la administración intradérmica de la vacuna, que suministra tres impactos en cada disparo. Este dispositivo, fue probado para garantizar que la vacunación combinada era tan eficiente como las vacunaciones por separado. El fraccionamiento de la vacuna en 6 impactos facilita su absorción y trae como consecuencia la optimización de la protección vacunal de Dercunimix@, debido al periodo de contacto mas largo entre los antígenos y las células del sistema inmune. La dosis administrada es 2 x 0,1 ml, cada disparo proporciona 0,1 ml en tres puntos. La seguridad y la eficacia de la vacuna combinada se han demostrado en condiciones del laboratorio. El programa recomendado de vacunación en conejos de cría, es una vacuna SG33 alas 4 semanas de la edad (Picavet et al., 1989), y Dercunimix alas 10 semanas de edad Se debe revacunar con la cepa SG33 cada 4 meses en conejas adultas. En caso de ser necesarias, revacunaciones con la vacuna inactivada de VHD, se deben hacer cada año con Dercunimix@.

1. Seguridad de la vacunación combinada contra mixomatosis y VHD.

Se realizaron los ensayos siguientes para evaluar la seguridad de la cepa vacunal atenuada SG33; diseminación del virus, reversión a la virulencia, e influencia sobre la inmunidad humoral. También fue evaluada la seguridad de la administración de una dosis doble de la vacuna Dercunimix@ a conejas gestantes. Las condiciones experimentales fueron particularmente severas para asegurar la seguridad de la vacuna combinada en condiciones de campo.

1.1. Difusión de la cepa vacunal SG33

1.1.1. Material y métodos

El estudio de la diseminación del virus se realizo para comprobar que la cepa vírica SG33, administrada por vía intradérmica, no se difundía entre los conejos de un grupo. Los animales incluidos en el estudio eran conejos SPF de 8 semanas de edad. La titulación del producto Dercunimix@ en estudio dio el resultado siguiente: 5,0 log₁₀ CCID₅₀ equivalente a 200 veces el titulo mínimo garantizado de la dosis de SG33. El objetivo fue mezclar conejos vacunados con conejos sin vacunar de control. Se monitorizo la producción de anticuerpos de Mixomatosis mediante inmunofluorescencia (IF) para comprobar si el virus SG33 se diseminaba en el grupo de

conejos. Diez conejos sin anticuerpos de mixomatosis fueron distribuidos en dos grupos de cinco animales. Uno de los dos grupos fue vacunado. Cuatro días después de la vacunación, el grupo de control fue mezclado con el grupo vacunado durante 16 días. Los conejos fueron separados al final de este período de contacto y se mantuvieron en observación durante 29 días.

1.1.2. Resultados

Todos los conejos vacunados seroconvirtieron, mientras que ninguno de los de control lo hizo (Ver Figura 1). Durante el período de observación de 45 días, los conejos de control sin vacunar, no mostraron ningún síntoma ni lesión relacionado con mixomatosis. La cepa vírica SG33 utilizada en la formulación de Dercunimix@ demostró no diseminarse en un grupo de conejos, en condiciones de laboratorio.

1.1.3. Discusión

Estos resultados obtenidos bajo las condiciones marcadas en la solicitud de autorización de comercialización a nivel europeo, demostraron que la cepa vírica SG33 no se difundirá en condiciones de campo en una población de conejos debidamente vacunados. Esto representa el mayor interés del estudio. Los dos parámetros escogidos, serología y seguimiento del desarrollo de mixomas, han demostrado ser relevantes ya que ninguno de los conejos de control mostró serología, ni desarrollo de mixomas, después de un contacto prolongado con los animales vacunados.

1.2 Reversión a la virulencia

1.2.1 Material y métodos

El estudio de reversión a la virulencia tuvo como objetivo el comprobar si la cepa vírica SG33, tras cinco retropases seriados en conejos en condiciones de laboratorio, revertía a su virulencia inicial antes de la atenuación.

La estabilidad in vivo de la atenuación fue comprobada. La carencia de algunos de los genes implicados en la patogenicidad del virus SG33 (Guerin et al., 1998) podría prevenir la reversión a la patogenicidad inicial del virus vacunal. En el estudio fueron incluidos conejos SPF de cinco semanas de edad. El producto probado provino de un lote de siembra de trabajo del virus SG33 con un título de $4,4 \log_{10} \text{CCID}_{50}$ por dosis, es decir 50 veces la dosis mínima de liberación de Oercunimix@. El objetivo fue la inoculación individual de un extracto de los mixomas que se desarrollara en los primeros conejos correctamente vacunados a otros conejos. Estos mixomas contuvieron el virus SG33. La inoculación fue repetida cuatro veces consecutivamente. Se realizaron un total de cinco pases llamados «retropases». En cada pase fue comprobada la presencia del virus SG33 en los mixomas examinando si había efecto citopático inducido en los cultivos de células cutáneas del conejo (IOL7). También fue evaluada la seroconversión a mixomatosis en cada pase. Las consecuencias del quinto pase in vivo fueron comparadas con las obtenidas con el virus inicial SG33. Se monitorizaron las reacciones locales, los aumentos de peso y las temperaturas rectales durante 49, 21 Y 4 días, respectivamente. El virus de cada pase fue titulado y detectado. Se proporciono evidencia de seroconversión después del quinto pase.

1.2.2 Resultados

El título de anticuerpos de los conejos a los que se administró el quinto retropase fue similar al de los conejos de control después del primer pase. Estos resultados validan la realidad de la transmisión del virus SG33 en cada pase, a partir de la muestra al animal. El número de conejos que mostraban mixomas primarios y el intervalo entre inoculación y los primeros síntomas (igual para los mixomas secundarios) fue similar en los conejos inoculados con el quinto pase que en los conejos de control sin vacunar. La monitorización de los aumentos de peso, de las temperaturas rectales y de las reacciones clínicas locales, no mostró ninguna diferencia entre ninguna de las poblaciones (veanse las tablas 1 y 2).

1.2.3 Discusión

La evidencia virológica y serológica confirma la relevancia del estudio. Los resultados son consistentes con la suposición teórica de la estabilidad genética de la cepa vírica SG33 según Guérin et al, 1.998.

1.3 Influencia de la vacunación sobre la inmunidad humoral.

1.3.1 Material y métodos

El estudio de la influencia de la vacunación sobre la inmunidad humoral tuvo como objetivo el comprobar que la cepa vírica SG33 no era inmunosupresiva. Se determinó la respuesta serológica a antígenos bacterianos conocidos. En el estudio se incluyeron conejos SPF y también convencionales de 4 semanas de edad. El producto en prueba mostró un título de $3,7 \log_{10} \text{CCID}_{50}$ es decir, casi 10 veces la dosis mínima de aprobación del virus SG33 en la vacuna Dercunimix@. Se administró a todos los animales una sola dosis de la vacuna viva contra Brucella cepa 819. La capacidad inmunosupresiva de la cepa SG33 fue evaluada comprobando su capacidad para inducir una respuesta de anticuerpos anti Brucella comparando la respuesta en conejos vacunados con SG33 y en conejos de control sin vacunar. Se detectaron anticuerpos anti Brucella mediante dos métodos diferentes: aglutinación rápida y seroaglutinación de Wright, ambos métodos permiten obtener resultados cuantitativos. Se constituyeron 4 grupos de conejos: 10 conejos SPF vacunados con la cepa SG33 a los que se administró la vacuna 819, 14 días más tarde, otros 10 conejos SPF vacunados con la cepa SG33 a los que se administró la vacuna 819 simultáneamente, otros 10 conejos SPF de control a los que se administró solamente la vacuna 819 en el D14, y 10 conejos convencionales vacunados con la cepa SG33 a los que se administró la vacuna 819 14 días más tarde. Se evaluó la respuesta de anticuerpos seroneutralizantes anti SG33.

1.3.2 Resultados

Todos los conejos incluidos en el estudio mostraron reacciones positivas después de la administración del antígeno cepa 819 de Brucella abortus usando tanto la aglutinación rápida como la seroaglutinación de Wright, 10 que demuestra que la cepa vírica SG33 no es inmunosupresiva en conejos. Los resultados serológicos demostraron que los conejos vacunados con la cepa vírica SG33 seroconvirtieron y que la respuesta de anticuerpos obtenida en los conejos de control, estaba cerca del valor umbral. La cepa SG33 no es inmunosupresiva (vease la Figura 2).

1.3.3 Discusión

Los resultados obtenidos validaron el estudio. El diseño experimental de utilizar la serología del antígeno cepa 819 de *Brucella abortus* fue sugerido por el Laboratorio Veterinario Central de Weybridge, Reino Unido (ADAS, 1998). Los conejos SPF de 4 semanas de edad son los más sensibles a un agente inmunosupresor. En el estudio se incluyeron animales convencionales, mucho más cercanos a las condiciones de campo, para determinar y comparar su sensibilidad a los agentes inmunosupresores.

1.4 Seguridad de una dosis doble de la vacuna Dercunimix@.

1.4.1 Material y métodos

El estudio de seguridad de una dosis doble de la vacuna Dercunimix@ en hembras gestantes tuvo como objetivo comprobar que la vacuna no tenía ninguna influencia sobre la gestación, comparando hembras vacunadas y hembras de control a las que se administró un placebo. En el estudio se incluyeron treinta y cinco (35) conejas gestantes mediante inseminación artificial. El lote vacunal en prueba provino de un lote de Dercunimix@ cuyo título del virus SG33 era 80 veces la dosis mínima garantizada, administrada en dos veces durante la misma operación de vacunación (0,4 ml entregados en 4 disparos) a las 13 semanas de la edad. Las hembras se sometieron a inseminación artificial 10 días antes de la vacunación. Se incluyeron también en el estudio 37 hembras de control, que recibieron el mismo volumen de placebo por la misma ruta. Fueron supervisados cuatro parámetros: tasa de gestación, tasa de abortos, índice de natalidad y tasa de mortalidad. En los conejos nacidos fueron supervisados otros tres parámetros: porcentaje de conejos nacidos vivos, porcentaje de conejos tras la adopción y selección de conejos viables, y porcentaje de conejos supervivientes tras el destete. Los porcentajes registrados para cada parámetro fueron comparados entre las hembras vacunadas y su descendencia y las hembras que recibieron el placebo y su descendencia.

1.4.2 Resultados

No se observaron durante el estudio ni abortos ni mortalidad alguna. No se encontró ninguna diferencia significativa ($oc = 5\%$) en la tasa de gestación y en la tasa de natalidad entre cualquiera de los grupos. 265 y 297 conejos jóvenes fueron paridos respectivamente por 35 hembras inseminadas artificialmente y vacunadas correctamente y 37 hembras inseminadas incluidas en el grupo placebo. Los porcentajes de conejos nacidos vivos, de conejos tras la adopción y selección de conejos viables, y de conejos supervivientes tras el destete, no revelaron ninguna diferencia significativa entre los grupos vacunados y placebo ($oc = 5\%$) (véase la tabla 3).

1.4.3 Discusión

La administración de una sobredosis de Dercunimix@ permitió determinar las consecuencias de la vacunación sobre la función reproductiva, en las peores condiciones. La ausencia de reacciones adversas tras la vacunación o la administración de un placebo en conejas, justifica la fecha recomendada de vacunación, es decir, aproximadamente 11 días después de la inseminación artificial. La vacuna Dercunimix@ puede ser utilizada en conejas preñadas sin que induzca ninguna reacción adversa durante la gestación y después del nacimiento de conejos jóvenes desde la lactación hasta el destete.

2. Eficacia de la vacunación combinada contra mixomatosis y VHD.

2.1 Materiales y métodos

La eficacia del programa de vacunación en el que se incluye la vacuna Dercunimix@ fue evaluada en condiciones del laboratorio con el programa recomendado de vacunación: 1 dosis de 0,1 ml de la vacuna SG33 a las 4 semanas de la edad, 1 dosis de 0,2 ml de Dercunimix@ suministrada en dos disparos a las 10 semanas de edad, vacunaciones de recuerdo con la vacuna SG33 a 4 y 8 meses después y con Dercunimix@ 12 meses después. En el estudio fueron incluidos conejos SPF de cinco semanas de edad. La monitorización serológica fue realizada mediante la detección de anticuerpos anti-mixomatosis por inmunofluorescencia a lo largo del estudio para validar la eficacia de la vacunación contra mixomatosis. También se monitorizaron serológicamente los conejos de control sin vacunar. Cuatro meses después de la vacunación con Dercunimix@, todos los conejos, tanto vacunados como los de control sin vacunar, fueron desafiados según lo descrito por Saurat et al. 1978. La producción de anticuerpos anti-VHD fue monitorizada por ELISA a lo largo del estudio para validar la eficacia de la vacunación contra VHD. Los conejos de control sin vacunar se monitorizaron serológicamente de manera semejante. Se evaluó y comparó la protección conferida por la vacunación de VHD a las 10 semanas de edad con Dercunimix@ y con una vacuna inactivada monovalente contra VHD, utilizando un modelo interno de prueba de desafío vírico.

2.2 Resultados

Se comprobó que la protección inducida por la vacuna monovalente duraba por lo menos 12 meses, según lo demostrado por Fournier, 1992. La protección conferida por Dercunimix@ fue evaluada como parte del mismo diseño experimental. El seguimiento serológico de Mixomatosis y de VHD reveló altos títulos de anticuerpos en los conejos vacunados, en comparación con los conejos de control sin vacunar, a lo largo del estudio (veanse las figuras 3 y 4). Los resultados obtenidos tras el desafío con un virus virulento de mixomatosis demostraron, según Saurat et al. 1978, que la tasa de protección fue del 100%, cuatro meses tras la vacunación primaria usando s610 SG33 a las 4 semanas de edad y Dercunimix@ a las 10 semanas de edad, mientras que la tasa de enfermedad en conejos de control sin vacunar, fue de 10/10. Por tanto, la protección contra un virus virulento de mixomatosis es total (ningún caso presentado) en los 4 meses siguientes a la vacunación primaria usando SG33 y Dercunimix@.

El diseño experimental fue validado por la tasa de enfermedad del 100% observada en el grupo de control. Los resultados obtenidos después del desafío con un virus de VHD demostraron que el índice de mortalidad era de 0/10 y 0/8 tres meses después de la vacunación a las 10 semanas de edad, con la vacuna inactivada monovalente de VHD y Dercunimix@, respectivamente, mientras que el índice de mortalidad en los conejos de control sin vacunar, era de 7/10. Por tanto, la protección contra un virus virulento de VHD era total (ningún caso presentado) 3 meses después de la vacunación, tanto con la vacuna inactivada monovalente de VHD como con Dercunimix@. El índice de mortalidad del 70% observado en el grupo de control validó el diseño experimental. La protección conferida tanto por la vacuna inactivada monovalente de VHD como por Dercunimix@ es similar, según lo demostrado por los resultados del desafío. La duración de la inmunidad es de 12 meses, lo que es validado mediante el desafío 12 meses tras la vacunación con Dercunimix@. Uno de los 12 conejos desafiados murió en el grupo vacunado, en comparación con 8 de 10 en el grupo de control sin vacunar.

2.3 Discusión

El estudio propuesto para demostrar la eficacia es, por tanto, relevante ya que demuestra con dos modelos de pruebas de desafío, que la protección otorgada por la vacunación dura 4 meses después de la inducción de la inmunidad en animales jóvenes contra mixomatosis y que la protección contra VHD dura 12 meses tras la administración de Dercunimix@ a las 10 semanas de edad. El programa propuesto de vacunación queda en estas condiciones debidamente validado en condiciones de laboratorio en conejos SPF. Uno de los conejos que murió durante la prueba de desafío de VHD un año después de la vacunación, mostró títulos individuales de anticuerpos ELISA anormalmente bajos (2,5 en la semana 24, 5 en la semana 40 y de nuevo 5 en la semana 58). Otro de los conejos del grupo vacunado mostró un nivel similar de anticuerpos, pero no murió de VHD tras la prueba de desafío. El título de anticuerpos no es por tanto el único parámetro relacionado con la protección contra VHD según lo demostrado por ambas observaciones.

Conclusión

El programa de vacunación recomendado para futuros reproductores, es decir, vacuna del virus SG33 a las 4 semanas de edad y vacuna Dercunimix@ a las 10 semanas de edad, confiere protección contra los 2 agentes contagiosos implicados: poxvirus de la mixomatosis y calicivirus de la VHD. La misma protección se induce en reproductores adultos que sigan el programa de vacunación recomendado. La vacuna combinada contra mixomatosis y VHD puede ser utilizada con seguridad en unidades industriales de conejos.

Tabla 1. Comparación de pesos corporales medios (g) entre ambos grupos de conejos (revisión a la virulencia de SG33).

	D28	D35	D42	D49
SG33	1150	1419	1619	1882
5° pase	1232	1456	1667	1944
Diferencia	NS	NS	NS	NS

NS: No significativo ($p > 0.05$)

Tabla 2. Comparación de temperaturas rectales (°C) entre ambos grupos de conejos (reversión a la virulencia de SG33).

	D28	D29	D30	D31	D32
	028	029	030	031	032
SG33	39,1	38,9	39,5	39,3	39,5
5°	39,1	39,2	39	39,3	39,2
Diferencia	0	= 0.03	NS*	NS	NS

NS: No significativo ($P > 0.05$). * $p = 0.054$

Tabla 3. Seguridad de una dosis doble de la vacuna Dercunimix® en conejas gestantes.

		Hembras vacunadas	Placebo	Diferencia
Hembras	Numero de inseminaciones artificiales	35	37	-
	Tasa de gestación	82,9%	83,8%	NS (oe = %)
	Tasa de aborto	0%	0%	
	de natalidad	82,9%	83,9%	NS (oe= 5%)
Conejos jóvenes	Tasa de mortalidad	0%	0%	Ninguna
	Numero de conejos nacidos vivos	265	297	-
	Porcentaje de conejos nacidos vivos	96,6%	97,3%	NS (oe= 5%)
	tras adopción selección de conejos viables	81,2 %es	80,8%	NS (oe= 5%)
	Porcentaje de conejos destetados	62,0 %es	68,7%	NS (oe= 5%)

NS: no significativo.