

# Respuesta serológica tras la vacunación contra la mixomatosis mediante distintos sistema de aplicación

M. Alonso y A. Pagés-Mante

Alfonso, M., Pagès\_Manté, A.

Laboratorios Hipra, S.A. Avda. La Selva 135 - 17170 AMER, Girona, Spain  
e-mail: mag@hipra.com - apm@hipra.com

## Resumen

Se administró una vacuna viva heteróloga contra la mixomatosis (Mixohipra-FSA®) en cinco grupos de 20 conejos/grupo para valorar la eficacia de distintos sistemas de vacunación. La aplicación de la vacuna fue distinta en cada grupo: por inyección subcutánea (grupo A), por inoculación intradérmica en un disparo de un impacto (grupo B), en un disparo de tres impactos (grupo C), en dos disparos de un impacto (grupo D) y en dos disparos de tres impactos (grupo E).

Se valoraron los signos clínicos generales y locales, así como la respuesta serológica a los 28 días post-vacunación y se compararon entre grupos. La vacunación no afectó el estado general de los animales pero produjo nódulos en el punto de inoculación, principalmente en los grupos vacunados por vía intradérmica. En estos casos se observó una estrecha relación entre la presencia y tamaño de los nódulos y la respuesta serológica. Aunque no se observaron diferencias entre las respuestas serológicas de los cinco grupos ( $p > 0.05$ ), la administración subcutánea y la intradérmica en dos disparos produjeron las respuestas serológicas más eficaces y más homogéneas.

## Abstract

In order to assess efficacy of vaccination systems, five groups of 20 rabbits each were inoculated with a live attenuated heterologous vaccine against myxomatosis (Mixohipra-FSA®). Administration systems differed between groups: subcutaneous injection (group A), intradermic inoculation in one-shot one-impact (group B), one-shot three- impacts (group C), two-shots one-impact (group D) and two shots three-impacts (group E). Clinical signs, general and local, as well as serological response at 28 days post-vaccination were compared. Vaccination did not affect health status of rabbits but it produced nodules at the inoculation site, mainly in groups vaccinated by intradermic route where the presence and size of the nodules were closely related to serological response. Although no differences due to the administration system were found in the serological response ( $p > 0.05$ ), subcutaneous injection and two-shots intradermic administration gave the most homogeneous and efficient responses.

## Introducción

La mixomatosis es una enfermedad vírica causada por un Poxvirus. Afecta a los conejos domésticos produciendo problemas persistentes en las explotaciones industriales. La

única forma de controlarla es mediante medidas de bioseguridad y una correcta profilaxis vacunal. En el mercado existen actualmente dos tipos de vacunas vivas atenuadas para prevenir la mixomatosis: heterólogas y homólogas. El antígeno que contienen las primeras es el virus del fibroma de Shope y en las segundas es el virus de la mixomatosis. Ambos pertenecen a la familia Poxviridae, género Leporipoxvirus.

Las vacunas heterólogas, por su escasa reactividad, están especialmente recomendadas para conejos jóvenes (Pagès-Manté, 2001). Desafortunadamente, la vacunación rutinaria del engorde en las explotaciones industriales no es una práctica muy extendida, a pesar de que estos animales son susceptibles a la infección (Pagès-Manté, 2002). Las razones para no vacunar suelen ser el coste y el tiempo que supone la administración a tantos animales. Para facilitar la vacunación y reducir los contagios que se pudiesen producir utilizando agujas, han aparecido en el mercado sistemas de vacunación alternativos. Estos aparatos permiten una inoculación intradérmica de la vacuna pero, a veces, un manejo o un mantenimiento incorrecto producen fallos vacunales y, consecuentemente, favorecen las infecciones con el virus de la mixomatosis. Vacunando con estos aparatos se han observado diferencias en la homogeneidad, la magnitud y la duración de la inmunidad (España et al., 1984).

El objetivo de este trabajo fue comparar la respuesta serológica de conejos de engorde tras vacunarlos frente a la mixomatosis mediante distintos sistemas de aplicación.

## Material y métodos

### Animales

Se utilizaron un total de 100 conejos en el estudio. A los 35 días de edad se separaron en 5 grupos (A, B, C, D y E; 20 conejos/grupo) y se alojaron en 10 jaulas (100x40.5x38cm, 10 conejos/jaula) en un módulo independiente de una explotación industrial. Recibieron pienso ad libitum durante toda la prueba.

### Tratamientos y controles

El primer día de la prueba se observó si los animales presentaban signos clínicos y se tomaron muestras de sangre de todos ellos por punción en la vena marginal de la oreja izquierda (1-1.5ml/conejo). Después de extraer la muestra de sangre se vacunó a todos los animales con una vacuna viva heteróloga y adyuvantada frente a la mixomatosis (Mixohipra-FSA®, Laboratorios Hipra, S.A. – una dosis/conejo). Se utilizó la vacuna inmediatamente tras su reconstitución. Para vacunar al grupo A la pastilla liofilizada que contenía 25 dosis vacunales se disolvió en 12.5ml de agua para inyección. Para los grupos B y C se disolvió en 2.5ml y para los grupos D y E en 5ml. Tras vacunar los 20 conejos de cada grupo la vacuna sobrante se eliminó por incineración. La cantidad de virus administrada a cada animal fue similar (virus vivo fibroma de Shope cepa OA  $\geq 103.5$ DICT/dosis) pero el sistema de aplicación fue diferente en cada grupo tal como se detalla en la Tabla 1.

**Tabla-1**

Diseño del estudio				
Grupo	Número conejos	Vía de administración	Volumen administrado <sup>2</sup>	Administración de la vacuna
A	20	Subcutánea	0,5 ml/conejo	1 iyección -
B	20	Intradérmica <sup>1</sup>	0,1 ml/conejo	1 disparo 1 impacto/disparo
C	20	Intradérmica <sup>1</sup>	0,1 ml/conejo	1 disparo 3 impactos/disparo
D	20	Intradérmica <sup>1</sup>	0,2 ml/conejo	2 disparos 1 impacto/disparo (0,1ml/disparo)
E	20	Intradérmica <sup>1</sup>	0,2 ml/conejo	2 disparos 3 impactos/disparo (0,1ml/disparo)

1 - Con Demojet (Societé Akra Dermojet)

2 - Independientemente del volumen administrado, cada dosis contenía  $\geq 10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub> de virus vivo del fibroma de Shope cepa OA.

La vacunación subcutánea se realizó con agujas de 0.9x40mm (20G 11/2 Nr.1, Microlance3) inyectando en la parte anterior de la espalda. Para la vacunación intradérmica se utilizó un dermojet® automático (Societé Akra Dermojet) con un cabezal de un impacto (grupos B y D) o con un cabezal de 3 impactos (grupos C y E). En ambos casos, el cabezal se colocó en contacto estrecho con la parte media de la cara interna del pabellón auricular derecho. Se evitaron las zonas con pelo para asegurar una correcta penetración de la vacuna. Los 5 grupos fueron vacunados por la misma persona tal como se hace a nivel de campo.

Siete días después de la vacunación se evaluaron los signos clínicos: reacciones generales como letargia, anorexia, etc. y reacciones en el punto de inoculación. Cuando se palparon nódulos se valoró y se anotó su tamaño: pequeño (<0.5cm), mediano (0.5-1cm) o grande (>1cm). Esta valoración de signos clínicos se repitió 28 días después de la vacunación y, además, se extrajeron muestras de sangre tal y como se ha descrito anteriormente.

La sangre se recogió en tubos con perlas para favorecer el desuerado. El día posterior a la extracción se centrifugaron (2500rpm durante 10 minutos) y al día siguiente se analizó la presencia de anticuerpos específicos frente al virus de la mixomatosis en el suero. Para ello se utilizó un ELISA indirecto ((CIVTEST CUNI MIXOMATOSIS ®, Laboratorios Hipra, S.A.) y los resultados se presentaron como índice relativo (IR), obtenido tras aplicar la siguiente relación (en ella se utilizaron los valores medios de DO450 obtenidos con las dos réplicas controles):

$$IR = \left[ \frac{(DO_{450} \text{ Muestra} - \text{Media } DO_{450} \text{ Control Negativo})}{(\text{Media } DO_{450} \text{ Control Negativo} - \text{Media } DO_{450} \text{ Control Negativo})} \right] \times 100$$

Los conejos se consideraban seropositivos cuando el índice relativo era mayor que 20 (IR>20).

### Análisis estadístico

Se calculó en cada grupo la frecuencia de los animales que manifestaban signos clínicos y la de los animales seropositivos. Estas frecuencias se compararon por c2. También se calculó el valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la respuesta serológica de cada grupo. Posteriormente se comparó por análisis de varianza

(ANOVA). Se calcularon las correlaciones simples (coeficiente de Pearson) entre la respuesta serológica de cada grupo y la presencia y tamaño de nódulos en el punto de inoculación. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 9.0.

## Resultados

### Signos clínicos

Los conejos no presentaron signos clínicos generales ni antes ni después de la vacunación (Tabla 2). Únicamente se vió una ligera diarrea en un animal del grupo A a los 7 días post-vacunación pero no se incluyó en el análisis estadístico porque no se consideró como un efecto de la vacunación.

Se observaron signos clínicos locales a los 7 y a los 28 días post-vacunación (Tabla 2). En ambos casos la proporción de conejos con nódulos en el punto de inoculación fue mayor en los grupos vacunados por vía intradérmica (grupos B, C, D y E,  $p < 0.001$ ). En todos los grupos el número de conejos con nódulos se redujo de los 7 a los 28 días post-vacunación. En el grupo A a los 28 días post-vacunación ya no se palparon nódulos.

En los grupos vacunados con el dermojet de un impacto (grupos B y D), a los 7 días post-vacunación, había más conejos con nódulos grandes ( $>1\text{cm}$ ) y en los grupos vacunados con el dermojet de tres impactos (grupos C y E) predominaban los conejos con nódulos medianos (0.5-1cm). Esta tendencia se mantuvo tres semanas más tarde observándose en los grupos C y E una proporción de animales con nódulos pequeños ( $<0.5\text{cm}$ ) mayor que en los grupos B y D (Tabla 3).

**Tabla-2**

Número (y porcentaje) de conejos con nódulos de diversos tamaños tras la vacunación contra mixomatosis mediante distintos sistemas de administración						
Grupo	Signos clínicos generales			Signos clínicos locales		
	Día 0	Día 7 p.v. <sup>1</sup>	Día 28 p.v. <sup>1</sup>	Día 0	Día 7 p.v. <sup>1</sup>	Día 28 p.v. <sup>1</sup>
A (n=20)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (10%)	0 (0%)
B (n=20)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	14 (70%)	6 (30%)
C (n=20)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	18 (90%)	14 (70%)
D (n=20)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	20 (100%)	14 (70%)
E (n=20)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	19 (95%)	8 (40%)
Sig. <sup>2</sup>	-	-	-	-	***	***

1 - p.v. post vacunación.

2 - \*\*\*  $< 0,001$ .

**Tabla-3**

Número (y porcentaje) de conejos con nódulos de diversos tamaños tras la vacunación contra mixomatosis mediante distintos sistemas de administración						
Grupo	Tamaño <sup>2</sup> del nódulo 7 días p.v. <sup>1</sup>			Tamaño <sup>2</sup> del nódulo 28 días p.v. <sup>1</sup>		
	Pequeño	Mediano	Grande	Pequeño	Mediano	Grande
A (n=20)	0 (0%)	1 (5%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (10%)	0 (0%)
B (n=20)	3 (15%)	2 (10%)	9 (45%)	1 (0%)	5 (70%)	0 (0%)
C (n=20)	5 (25%)	13 (65%)	0 (0%)	13 (0%)	1 (90%)	0 (0%)
D (n=20)	0 (0%)	4 (20%)	16 (80%)	7 (0%)	4 (100%)	3 (15%)
E (n=20)	9 (45%)	10 (50%)	0 (0%)	8 (0%)	0 (95%)	0 (0%)

1 - p.v. post vacunación.

2 - Pequeño  $< 0,5\text{ cm}$ .; Mediano 0,5 - 1 cm.; Grande  $> 1\text{ cm}$ .

## Respuesta serológica

Todos los conejos eran seronegativos antes de la vacunación (día 0). Cuatro semanas más tarde se observó una seroconversión en respuesta a la vacunación en los 5 grupos (Tabla 4).

La proporción de animales que seroconvirtieron fue elevada en los grupos A, C, D y E ( $\geq 90\%$ ) y significativamente menor en el grupo de animales vacunados con el dermojet de un impacto (grupo B 70%,  $p < 0.05$ ). Aunque no había diferencias significativas en la magnitud de la respuesta serológica (IR,  $p > 0.05$ ), ésta también fue inferior en el grupo B.

La variabilidad del índice relativo fue alta en todos los grupos (coeficiente de variación de 42, 76, 56, 28 y 44% en los grupos A, B, C, D y E respectivamente), pero disminuyó cuando se consideraban únicamente los animales seropositivos para calcular el IR medio de cada grupo (36, 36, 42, 28 y 28% en los grupos A, B, C, D y E respectivamente) (Tabla 4).

**Tabla-4**

Respuesta serológica de los conejos tras la vacunación contra mixomatosis mediante distintos sistemas de administración					
Grupo	Nº y porcentaje de conejos seropositivos		Índice relativo <sup>3</sup> . Media (std)		
	Día 0	Día 28 p.v. <sup>1</sup>	Día 0	Día 7 p.v. <sup>1</sup>	Día 28 p.v. <sup>1,4</sup>
A (n=20)	0 (0%)	19 (95%)	1,20 (0,89)	74,15 (30,79)	77,53 (27,57)
B (n=20)	0 (0%)	14 (70%)	1,05 (0,22)	53,55 (40,77)	75,36 (26,75)
C (n=20)	0 (0%)	18 (90%)	1,20 (0,70)	80,55 (44,81)	89,39 (37,64)
D (n=20)	0 (0%)	20 (100%)	1,00 (0,00)	82,75 (23,49)	82,75 (23,49)
E (n=20)	0 (0%)	18 (90%)	1,00 (0,00)	75,85 (33,30)	83,83 (23,74)
Sig. <sup>2</sup>	-	*(p 0,031)	n.s. (p 0,536)	n.s. (p 0,081)	n.s. (p 0,634)

1 - p.v. post vacunación.

3 - Seropositivos cuando el índice relativo  $> 20$ .

2 - n.s.  $p > 0,05$ ; \*  $P < 0,05$

4 - Valor medio considerando únicamente los conejos seropositivos.

## Correlación entre signos clínicos locales y respuesta serológica

La correlación entre la respuesta serológica y la presencia y tamaño de los nódulos en el punto de inoculación fue significativa en los animales vacunados por vía intradérmica (Tablas 5 y 6). Esta correlación era más fuerte cuando los nódulos se valoraban la semana posterior a la vacunación. En ese momento, los conejos vacunados con el dermojet de un impacto (grupo B) presentaban una mayor correlación que los vacunados con el dermojet de tres impactos (grupos C y E). A los 28 días post-vacunación en el grupo E la relación entre la presencia y tamaño de nódulos y su nivel de anticuerpos desaparecía pero, en cambio, en los grupos B, C y D la correlación era significativa y del mismo orden (coeficiente de Pearson  $0.55 \pm 0.10$ ).

**Tabla-5**

Correlaciones <sup>3</sup> (coeficiente de Pearson) entre la respuesta serológica y la presencia de reacciones en el punto de inoculación tras la vacunación contra mixomatosis mediante distintos sistemas de administración		
Índice Relativo	Relación local día 7 p.v. <sup>1</sup>	Relación local día 28 p.v. <sup>1</sup>
GRUPO A (n=20)	0,27	n.d. <sup>2</sup>
GRUPO B (n=20)	0,84 **	0,52 **
GRUPO C (n=20)	0,61 **	0,56 **
GRUPO D (n=20)	n.d. <sup>2</sup>	0,57 **
GRUPO E (n=20)	0,49 *	0,05

1 - p.v. post vacunación. 2 - n.s. Imposible de calcular porque al menos una variable era constante.

3 - \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

**Tabla-6**

<b>Correlaciones<sup>3</sup> (coeficiente de Pearson) entre la respuesta serológica y el tamaño de reacciones en el punto de inoculación tras la vacunación contra mixomatosis mediante distintos sistemas de administración</b>		
<b>Índice Relativo</b>	<b>Relación local día 7 p.v.<sup>1</sup></b>	<b>Relación local día 28 p.v.<sup>1</sup></b>
GRUPO A (n=20)	0,26	n.d. <sup>2</sup>
GRUPO B (n=20)	0,89 **	0,46 *
GRUPO C (n=20)	0,62 **	0,45 *
GRUPO D (n=20)	0,17	0,64 **
GRUPO E (n=20)	0,49 *	-0,01

1 - p.v. post vacunación.

2 - n.s. Imposible de calcular porque al menos una variable era constante.

3 - \*\* p<0,01, \* p<0,05

## Discusión

La vacunación de conejos seronegativos a la mixomatosis no afectó a su estado general de acuerdo a lo observado por Espuña et al. (1984). Por el contrario, si que produjo reacciones en el punto de inoculación, especialmente en los conejos vacunados por vía intradérmica (Tabla 2). El antígeno de la vacuna, el virus del fibroma de Shope, es conocido por provocar un fibroma localizado cuando se inyecta en conejos europeos (*Oryctolagus cuniculus*) (Fenner, 1994). Estos fibromas se detectaban con mayor facilidad en las orejas que a nivel subcutáneo. Eran pasajeros y disminuían de tamaño e incluso llegaban a desaparecer (Tabla 3). El tamaño del nódulo parecía estar relacionado con la cantidad de antígeno inyectada en el punto de inoculación ya que cuanto más diluido y más disperso estaba el antígeno, más pequeño era el nódulo.

En contra de considerar los nódulos como una reacción adversa, podrían servir como indicadores de que los animales han respondido positivamente a la vacunación, tal como sugieren las elevadas correlaciones encontradas en este estudio (Tablas 5 y 6). Tripathy y Reed (1997) describieron un fenómeno similar tras la vacunación de aves frente a la viruela (virus de la familia Poxviridae, género Avipoxvirus). Estos autores señalaron la presencia de "tomas" tras la vacunación. La "toma" consistía en una inflamación de la piel o una costra en el sitio donde se había aplicado a vacuna y se consideraba como una evidencia de una vacunación exitosa. En conejos, Jacotot et al. (1955) no encontraron ninguna correlación entre el tamaño del nódulo vacunal y la respuesta inmune pero, en ese trabajo, las vacunas heterólogas que utilizaron las aplicaron por vía subcutánea, coincidiendo así con nuestros resultados (grupoA) y con los del Nougayrede y Gayot (1980).

En este trabajo se ha visto un mayor porcentaje de conejos seronegativos en el grupo B, vacunados con un disparo del dermojet de un impacto (Tabla 4). La probabilidad de que la vacuna penetre a nivel intradérmico mediante este sistema es menor si se compara con los otros sistemas (3 impactos o 2 disparos). Comparándolo con la inyección subcutánea los puntos críticos relacionados con el manejo del aparato son mayores, lo que puede explicar la mayor proporción de fallos. Esto refleja lo que está ocurriendo actualmente en el campo y nos ayuda a entender los fallos vacunales que se observan en las explotaciones. Factores como la presión, la dosificación, la colocación del dermojet, la penetración de la vacuna a nivel intradérmico, etc. son puntos críticos que deben ser revisados cuando se vacuna con estos aparatos. Pensamos que en el grupo B se produjeron fallos en la penetración de la vacuna porque coincidía que los animales seronegativos no presentaban nódulos en el punto de inoculación (Tablas 2 y 4).

La magnitud de la respuesta serológica (Tabla 4) fue similar a la descrita en otros trabajos (Espuña et al., 1984; Pagès-Manté y Alfonso, 2002). Aunque no se encontraron diferencias significativas entre el índice relativo de los 5 grupos, hay que tener en cuenta la gran variabilidad de este valor dentro de cada grupo y cómo puede afectar al análisis de varianza (IR,  $p > 0.05$ ). A pesar de eso, por la magnitud y la dispersión del IR de los grupos vacunados por inyección subcutánea y con dos impactos de dermojet, se puede decir que son los sistemas que combinaban una mayor homogeneidad y eficacia. Cuando sólo se consideraban los animales seropositivos de cada grupo, la respuesta serológica fue similar independientemente del sistema de vacunación. En este caso también se vió que la inoculación en dos impactos de dermojet inducía una respuesta serológica eficaz y uniforme.

Otros autores que compararon distintos sistemas de administración de vacunas también reportaron una buena respuesta serológica inicial con un disparo del dermojet de un impacto (Espuña et al., 1984) pero, tal y como hemos visto, esta respuesta era más heterogénea y menos persistente en el tiempo. En nuestro trabajo sólo se ha estudiado la inmunidad para los conejos de engorde cuya duración de interés coincide con la duración del periodo de engorde. En caso de vacunación de futuros reproductores habría que ampliar el periodo estudio para comprobar si la duración de la inmunidad se puede ver afectada por el sistema de vacunación utilizado.

A la vista de los resultados recomendaríamos la vacunación de conejos de engorde por inyección subcutánea o dos impactos de dermojet, pero hay que tener en cuenta que estos resultados se han obtenido con un grupo reducido de animales en buen estado sanitario en comparación con ciertas circunstancias que a veces se dan en campo, en las que el estrés y otras patologías son frecuentes. Estos factores inmunodepresores podrían afectar negativamente la respuesta a la vacunación disminuyendo su eficacia y aumentando su heterogeneidad.

## Conclusiones

La vacunación frente a mixomatosis mediante los diferentes sistemas no ha afectado el estado general de los conejos de engorde pero ha producido nódulos en el punto de inoculación, principalmente en los grupos vacunados por vía intradérmica donde la presencia y el tamaño del nódulo estaban estrechamente relacionados con la respuesta serológica. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en la respuesta serológica en función del sistema de vacunación ( $p > 0.05$ ), la inyección subcutánea y la administración intradérmica en dos impactos produjeron las respuestas más homogéneas y eficaces. Tanto una correcta inyección con agujas estériles como un manejo adecuado del dermojet, son puntos críticos que hay que controlar para realizar la vacunación con éxito.

## Bibliografía

ESPUÑA, E., NOGAREDA, M., PAGÈS, A., CASADEVAL, P. 1984. Estudios comparativos de laboratorio utilizando dos vacunas distintas contra la mixomatosis. IX Symposium Cunicultura, Figueras, 193-204.

JACOTOT, H., VALLEE, A., VIRAT, B. 1955. Considérations sur la durée et le mécanisme de l'immunité engendrée par le virus du fibrome de Shope contre le virus du myxome de Sanarelli. Annales de l'Institut Pasteur 1, 88 (3), 381-384.

NOUGAYREDE, PH., GAYOT, G. 1980. Comparaison en laboratoire de deux vaccins contre la myxomatose. Bull. Soc. Vét. Prat. de France, janvier, T.64, nº1, 75-86.

FENNER, F. 1994. Rabbit fibroma virus in OSTERHAUS, A.D.M.E. (ed.) Virus infections of rodents and lagomorphs, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 71-76.

TRIPATHY, D.N., REED, W.M. 1997. Pox in CALNEK, B.W. (ed). Diseases of poultry. Iowa State University Press, USA. 653.

PAGES-MANTÉ, A. 2001 Profilaxis vacunal en cunicultura. Jornadas Profesionales de Cunicultura 2001, Calella, 12.1-12.10.

PAGES-MANTÉ, A. 2002. Patología del conejo: retrospectiva histórica, situación actual y tendencias futuras. XXVII Symposium de Cunicultura, Reus, 137-143.