

ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LABORATORIO UTILIZANDO DOS VACUNAS DISTINTAS CONTRA LA MIXOMATOSIS

E.España, M.Nogareda, A.Pages, P.Casadevall
Laboratorios HIPRA, S.A. AMER (Gerona)

INTRODUCCION

En 1938, Shope demostró que la inoculación del virus del fibroma de los conejos confería a estos un alto grado de protección en la inoculación experimental con virus virulento del Mixoma de Sanarelli.

El porcentaje de conejos vacunados con el virus del fibroma de Shope que resisten a la infección experimental varía según los distintos investigadores (4) (1) (3).

Varios factores pueden influenciar en mayor o menor grado, el porcentaje de conejos protegidos, oscilando entre un 60 y un 85% del efectivo vacunado con el virus del Fibroma de Shope.

Actualmente y en parte debido a la presencia endémica del virus de Sanarelli en ciertas zonas, así como la aparición de variantes del mismo con distintos grados de virulencia, han hecho que se cuestione el grado de protección de las vacunas heterólogas clásicas. (8)

Las vacunas homólogas utilizando virus de Sanarelli atenuado, han sido estudiadas extensamente durante estos últimos años (5) (3) (6). Aunque estos confieren una inmunidad muy sólida, la utilización de las mismas puede entrañar ciertos riesgos debido a sus efectos secundarios en gazapos, tales como la posible circulación del virus vacunal en la granja, la reversión de aquel a formas virulentas, el desarrollo de infecciones persistentes, abortos, etc.

La utilización de adyuvantes para incrementar la inmunogenicidad de las vacunas heterólogas fue descrita por Durand et al. (1984). Estos autores utilizaron Caolin para adyuvantar el virus del Fibroma de Shope, consiguiendo así mejorar grandemente la inmunidad conferida.

Varios intentos para desarrollar una vacuna inactivada contra la Mixomatosis ya sea a partir de virus de Sanarelli o de Shope, han fracasado totalmente. Estas

vacunas inactivadas no confieren practicamente protección alguna.

Nosotros pudimos observar que los conejos vacunados con una vacuna inactivada y adyuvantada con aceites minerales no solamente no resistieron a la prueba de infectividad sino que sucumbieron con unas lesiones mucho más severas que los conejos controles no vacunados (2). Este hecho fue independiente del tipo de adyuvante y del método de inactivación utilizado.

En este trabajo hemos analizado el comportamiento de dos vacunas distintas contra la mixomatosis, una de ellas producida a partir de virus del Fibroma de Shope propagado en conejo, a la que llamamos vacuna convencional (VC) y la otra se hizo a partir de virus de Shope propagado en cultivos histicos convenientemente adyuvantada (vacuna Fibroma de Shope adyuvantada ó FSA)

MATERIAL Y METODOS

Preparación de las vacunas

Vacuna FSA.- Esta vacuna se hizo a partir de la cepa Boerlage del virus del Fibroma de Shope que se propagó seis veces consecutivas en cultivos de tejidos de RK13. Este stock de virus se utilizó para todas las pruebas manteniéndose almacenada a -70°C en pequeñas alíquotas.

El virus de producción fue congelado y descongelado 3 veces y seguidamente se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos. Seguidamente el sobrenadante se mezcló con el excipiente y el adyuvante en la siguiente proporción: 3 ml sobrenadante, 3 ml de excipiente y 1 ml de adyuvante. Cada dosis vacunal tenía un título mínimo de $10^{3.5}\text{DICT}_{50}/\text{ml}$.

Vacuna VC.- A esta vacuna la llamamos vacuna convencional (VC) puesto que su formulación y método de producción es el que se ha venido utilizando tradicionalmente. Se trata de la vacuna heteróloga con virus de Shope hecha a partir de fibromas de conejo. El virus liofilizado tenía un título medio de $10^{3.5}\text{DICT}_{50}$ por dosis vacunal.

Test de Infectividad

Para estudiar el nivel de protección en los conejos vacunados se llevaron a cabo pruebas de infectividad. Los conejos vacunados fueron inoculados con virus virulento de Sanarelli cepa RIN₃ (tipo I-II) a distintos tiempos después de las vacunaciones. Cada conejo fue inoculado vía intradermoparpebral con 0,2 ml de virus virulento (10^3 DI₅₀). Los conejos así infectados fueron observados durante 30 días.

Ensayos de valoración vírica

La potencia vírica (título) se determinó mediante titulación en microplacas de 96 pocillos (3) utilizando células RK13 que fueron incubadas durante 7 días en un incubador de ambiente controlado de CO₂. Los pocillos con ECP o formación de placas fueron dados como positivos y el título se calculó de acuerdo con el método Kärber.

Asimismo la técnica de anticuerpos fluorescentes se empleó para determinar la identidad vírica, efectuándose las lecturas a las 24 horas post-infección.

Enzyme-linked-immunosorbent Assay (ELISA)

Para valorar la inmunidad humoral inducida por estas vacunas se estudiaron varias técnicas (SN, FC y ELISA) eligiéndose finalmente esta última ya que se mostró muy sensible y específica para testar un número elevado de muestras. Esta se utilizó tal como la describimos (6).

Pruebas comparativas

Para poder comparar las 2 vacunas antes mencionadas se llevaron a cabo varios ensayos.

Prueba 1 - Estudio comparativo de las vacunas VC y FSA.- Se vacunaron los conejos por vía subcutánea con una dosis vacunal de acuerdo con el siguiente esquema: Dos grupos de 16 conejos cada uno fueron inmunizados con las vacunas FSA y VC, dejando un tercer grupo de 8 conejos sin vacunar como controles. A los 27 días de la vacunación estos animales fueron infectados con 10^3 DI de virus virulento de Sanarelli y se observaron durante 30 días.

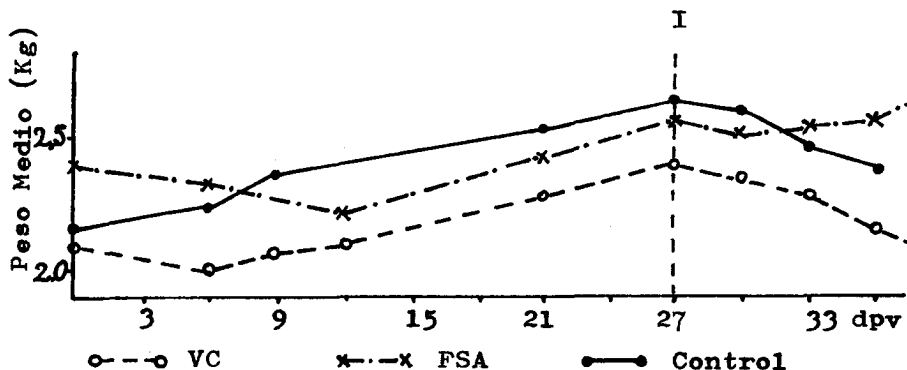
Se estudiaron los siguientes parámetros durante esta prueba: peso, temperatura, desarrollo de fibroma local, anorexia, cinética de anticuerpos humorales

(ELISA) y protección a la infección experimental.

Prueba 2 - Relación entre vía de administración y protección.- Para estudiar la incidencia de la vía de inoculación en relación al grado de protección, 3 grupos de 7 conejos cada uno fueron vacunados por vía subcutánea, intradérmica y dermojet respectivamente. Se efectuó la infección a los 30 días post-vacunación y se estudió el porcentaje de supervivientes, las reacciones locales y la cinética de la inmunidad humoral.

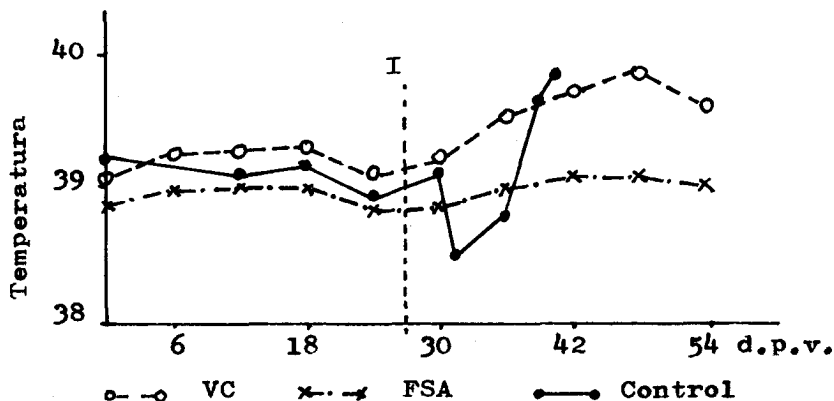
RESULTADOS

Fig. 1.- EVOLUCION DEL PESO



Todos los conejos muestran un ligero descenso de peso después de la vacunación con vacuna FSA y VC. Este descenso alcanza un límite máximo a los 6 días post-vacunación para la vacuna VC y a los 12 días p.v. para la vacuna FSA. Seguidamente hay un aumento gradual hasta el momento de la infección, después de la cual los conejos no vacunados sufren un acusado descenso de peso que culmina con la muerte de los mismos por generalización de mixomatosis. Los vacunados con la vacuna VC experimentan también una disminución de peso, mientras que los vacunados con FSA mantienen su peso, no siendo afectados por la infección virulenta.

Fig.2.- EVOLUCION DE LA TEMPERATURA



Los 3 grupos de conejos muestran una evolución térmica que se mantiene dentro de las oscilaciones normales ($\pm 0,3^{\circ}\text{C}$). No hay cambios significativos de temperatura después de la vacunación en ningún grupo. Sin embargo, a los 6 días post-infección, los conejos no vacunados sufren un descenso de temperatura seguido de un incremento muy marcado de la misma, que culmina con la muerte de estos. Del mismo modo los conejos a los que se administró la vacuna VC, muestran un aumento térmico apreciable mientras que los inmunizados con FSA no sufren alteración térmica alguna después de la infección.

Tabla 1.- PORCENTAJE DE CONEJOS CON NODULO EN EL PUNTO DE INOCULACION

Vacuna	Días post-vacunación					Conejos inmunizados
	6	13	20	27	30	
VC	0	15	0	0	0	63%
FSA	100	100	55	8	0	100%
-	-	-	-	-	-	0%

A los 6 días de la vacunación por vía subcutánea con vacuna VC apareció un pequeño nódulo en el punto de inoculación en un reducido porcentaje de animales con un tamaño que oscilaba entre 2 y 3 mm. Estos nódulos alcanzaron un volumen máximo a la semana p.v. desapareciendo después lentamente. El grupo de conejos vacunados con FSA mostró también la aparición de nódulos en el punto de inoculación y pudimos observar una relación entre el desarrollo de nódulo local y protección a la infección en esta vacuna. Este hecho fue descrito anteriormente (1). Es importante reseñar el pequeño tamaño del nódulo (1-2 mm) inducido por la vacuna FSA así como el alto porcentaje de conejos que poseían el mismo después de la vacunación.

Tabla 2.- PROTECCION A LA INFECCION

Vacuna	Muertes (días post-infección)						Muertes
	11	14	20	22	25	30	
VC	-	-	2	2	2	-	6/16
FSA	-	-	-	-	-	-	0/16
-	6	2	-	-	-	-	8/8

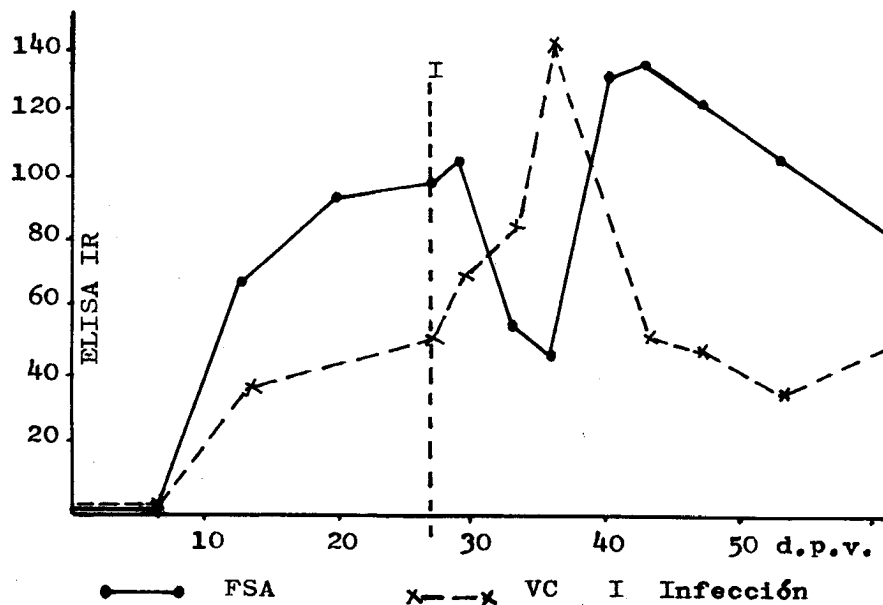
Esta tabla muestra la evolución de los conejos vacunados después de la infección. Algunos murieron y otros fueron sacrificados "in extremis" después de observarse una mixomatosis generalizada. La muerte tardía de algunos animales inmunizados con la vacuna VC indica que éstos tenían un cierto grado de protección aunque no suficiente como para resistir a la infección experimental. La muerte de los controles se produjo entre los 11 y 14 días post-infección, mientras que los vacunados con la vacuna VC que no resistieron la prueba murieron entre los 20 y 25 días. Todos los conejos vacunados con vacuna FSA sobrevivieron a la infección.

Tabla 3.- REACCION A LA INFECCION

Vacuna	Sin lesión	Nódulo local	Mixomatosis generalizada	Conejos inmunes
VC	6	4	6	10/16
FSA	10	6	-	16/16
-	-	-	8	0/8

Por lo que se refiere al grado de reacción a la infección, los conejos que presentaron generalización benigna o maligna fueron considerados como no protegidos, mientras que aquellos en los cuales se desarrolló un nódulo primario en el punto de inoculación, que decreció y desapareció al cabo de unos días, fueron considerados como inmunes. Asimismo todos aquellos que no presentaron reacción alguna a la infección se consideraron como protegidos.

Fig.3.- CINETICA DE ANTICUERPOS PARA LAS VACUNAS FSA Y VC



En este gráfico podemos ver la cinética de los anticuerpos en conejos vacunados e infectados comparando las vacunas VC y FSA. Mientras que los conejos vacunados con la vacuna VC tenían un IR medio de 50,7 en el momento de la infección, aquellos inmunizados con la vacuna FSA tenían IR medios de 98,5. Estas diferencias pueden apreciarse también al valorar los niveles de anticuerpos estimados en medias de Densidades Ópticas (DO492) tal como queda reflejado en la Tabla 4.

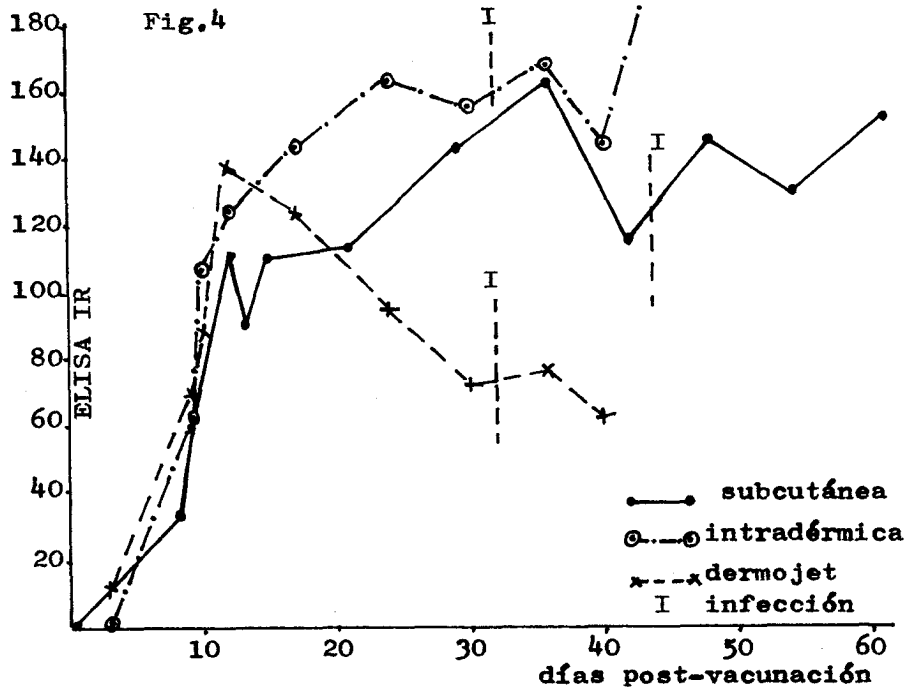
Tabla 4.- MEDIAS DE D.O. A 492 nm HASTA EL MOMENTO DE LA INFECCION

Vacuna	Días post-vacunación				
	1	6	13	20	27
VC	0,006	0,003	0,394	0,444	0,611
FSA	0,009	0,005	0,729	0,898	1,015
Sin vacunar	0,008	0,004	0,006	0,012	0,018

Las medias de las D.O. absolutas en el momento de la infección se muestran muy superiores en la vacuna FSA (1,015) cuando la comparamos con la vacuna VC (0,611).

VIAS DE INOCULACION Y PROTECCION CON LA VACUNA HETEROLOGA FSA

Tal como podemos apreciar en la Fig.4, los valores de ELISA-IR experimentan un aumento marcado, pudiéndose detectar anticuerpos humorales a partir de los 8 días post-vacunación, independientemente de la vía de inoculación utilizada. Este aumento del índice IR alcanza un máximo a los 15 días post-vacunación en los conejos vacunados con Dermojet, mientras que aquellos en los que se utilizó la vía subcutánea e intradérmica, el índice IR sigue aumentando hasta alcanzar valores de 76 y 81 respectivamente en el momento de la infección. Los conejos inoculados con Dermojet muestran valores medios de 32 en el momento de la infección. Esta diferencia de valores según la vía de inoculación, se refleja también en el nivel de protección a la infección ya que el 100% de los conejos va-



cunados por vía subcutánea e intradérmica resistieron la infección experimental mientras que sólo el 60% de los vacunados con el Dermojet, sobrevivieron a la misma.

DISCUSION

La utilización del ELISA así como las pruebas de infectividad con virus virulento nos han permitido comparar la eficacia de estas vacunas con pruebas de laboratorio.

La vacuna heteróloga adyuvantada FSA se ha mostrado muy superior a la convencional (VC) en todas las pruebas que hemos llevado a cabo. Aquella indujo un nivel alto de anticuerpos humorales en conejos vacunados confiriendo una protección total (100%) del efectivo cuando se administró por vía subcutánea o intradérmica. Asimismo, no hubo hipertermia ni pér-

dida de peso después de infectar con virus virulento los animales vacunados con FSA. Ambas vías de inoculación (intradérmica y subcutánea) se han mostrado efectivas para resistir a la mixomatosis experimental, sin embargo, la marcada reacción local al utilizar la vía intradérmica no hace aconsejable su uso. La aplicación mediante Dermojet dió unos niveles de protección mucho más bajos (65 a 80%). Esto podría deberse al hecho de que parte del adyuvante vacunal no penetrara en la dermis, ya sea debido a la dificultad de paso del mismo por el Dermojet o a su dispersión en la dermis. Asimismo, la variabilidad al usar esta vía de inoculación ha sido muy grande, pero en ningún caso el nivel de protección ha sido satisfactorio. La rápida aparición de anticuerpos humorales así como su pronta caída a los 25 días de la inoculación, nos inducen a creer que el adyuvante no actuó al utilizar el Dermojet, contrariamente a lo que ocurrió en los conejos vacunados por vía intradérmica y subcutánea, las cuales mantuvieron niveles altos hasta el momento de la infección. La vacuna heteróloga adyuvantada FSA administrada por vía subcutánea, puede ser de gran utilidad por la protección que induce y por la ausencia de efectos secundarios, factor a tener en cuenta al emplear vacunas homólogas.

RESUMEN

Se llevaron a cabo una serie de pruebas para determinar la efectividad de 2 vacunas heterólogas contra la mixomatosis.

La vacuna convencional (VC) heteróloga producida con virus del Fibroma de Shope confirmó el nivel de protección usual en este tipo de vacunas (63% del efectivo vacunado) en la infección experimental. Sin embargo, con vacuna adyuvantada FSA el porcentaje de conejos protegidos fue del 100% de los conejos vacunados, no habiendo además reacción térmica ni pérdida de peso alguno después de la inoculación con virus virulento por vía intraparpebral.

La inocuidad y protección conferida por la vacuna FSA la hacen ideal para su utilización en la inmunoprophilaxis de la Mixomatosis, ya que se ha mostrado muy superior a la vacuna convencional en las pruebas de challenge con cepa virulenta RIN3 (tipo I-II) sin entrafñar además el peligro que puede suponer la introducción en una explotación de cepas homólogas que aunque suficientemente atenuadas no eliminan totalmente la eventualidad de una posible reversión en circunstancias desfavorables.

SUMMARY

Several trials were carried out to compare the performance of 2 heterologous vaccines against Myxomatosis. The conventional heterologous vaccine produced with Shope's Fibroma virus conferred the usual level of protection (63% of the vaccinated rabbits) when challenged experimentally. However when the vaccine with adjuvant (FSA) was used a 100% protection was achieved. Besides no side effects such as weight loss or hypertermia were recorded after the challenge with virulent Sanarelli virus.

The innocuousness and potency of the FSA vaccine provide a useful tool to fight Myxomatosis as it has shown to be superior to the conventional heterologous vaccine. Furthermore it does not entail the potential danger that might mean the entry of homologous strains into a farm that although sufficiently attenuated don't discard completely the possible reversion to virulence or the appearance of side effects.

BIBLIOGRAFIA

1. DURAND, M., RAVON, D., GUERCHE, I., PRUNET, P.
Étude d'un nouveau vaccine contre la myxomatose.
Rec. de Med. Vet. Tome 150, 6, 1974.
2. ESPUÑA, E. Estudio de una vacuna inactivada oleosa (VAVISAN) contra la Mixomatosis. 1981 Inf.
Téc. Dept. Inv. Lab. Hipra, S.A.
3. JACOTOT, H. VIRAT, B., RECLARD, P. et VALLÉE, A.
Étude d'une souche atténuée du virus de myxome infectieux obtenue par passages en culture cellulaires. Ann. de l'Institut Pasteur, 113, 2, 1967.
4. JARABEK, J. Applicability of Shope Fibroma virus replicated in cell cultures for immunoprophylaxis of rabbit myxomatosis. Acta Vet. Brno. 49, 1980: 259-267.
5. Mc KERCHER (D.G.) and SAITO (J.K.). Nature, 1964, 202, 933.
6. NOGAREDA, M., ESPUÑA, E., CASADEVALL, P. Adaptación del Enzimoimmunoensayo indirecto para la valoración de la respuesta humoral frente al virus del fibroma de Shope. Med. Vet. vol.1 nº 9 Sept. 1984.
7. NOUGAYREDE, Ph. et GAYOT, G. Comparaison en laboratoire de deux vaccines contre la myxomatose. Bull. Soc. Vet. Prat. de France, Janvier 1980, T.64 nº1 pp.75-86.
8. SAURAT, P., GILBERT, Y., GANIERE, J.P. Étude d'une souche de virus myxomateux modifié. Revue Méd. Vet. 1978, 129, 3:415-451.