



# InfoMerial

La fuerza de la Innovación



MX-AC6/2003

## Eficacia de la vacuna Merial de Coronavirus Canino –Virus Vivo Modificado (VVM)

D.V.M., MSc. M. Camila Pardo y  
D.V.M. Marc Mackowiak  
Traducción M.V.Z. Jorge Domínguez O.

### Puntos importantes:

Existen dos formas de la enfermedad producida por el Coronavirus Canino

- Enteritis clínica
- Forma asintomática – no hay signos clínicos notorios, pero sí hay daños en las paredes del intestino delgado.

Tanto la forma clínica como la asintomática del Coronavirus Canino establecen un escenario favorable para el efecto sinérgico infeccioso de múltiples patógenos.

Las vacunas con virus muerto de Coronavirus Canino solo reducen, pero no protegen en contra de:

- Infección Viral
- Replicación Viral
- Daño en Epitelio Intestinal
- Excreción viral después de desafío de campo

Las vacunas elaboradas con virus vivo modificado estimulan Inmunidad local de las mucosas y ofrecen protección más efectiva en contra de virus entéricos o respiratorios.

La vacuna de Merial de Coronavirus Canino elaborada con Virus Vivo Modificado (VVM) protege a los perros contra el desafío de Coronavirus Canino patógeno.

- Los animales vacunados no manifestaron signos clínicos
- Los animales vacunados estuvieron protegidos contra el desafío intestinal.

- Los animales vacunados no tuvieron daño epitelial en el intestino.
- No hubo excreción viral post-desafío.

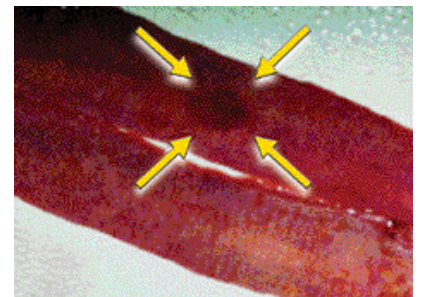
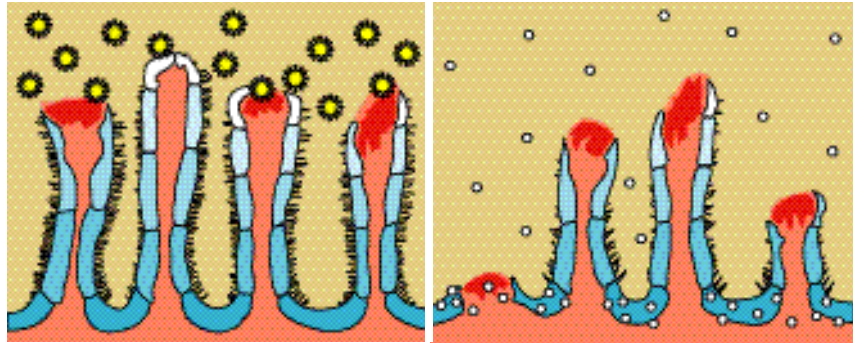


Fig. 1: El daño epitelial en el intestino de un perro con la forma asintomática de Coronavirus Canino se encuentra señalado con flechas (arriba), comparado con el tejido de un animal normal (abajo).

## INTRODUCCION

La gastroenteritis canina causada por Coronavirus Canino (CCV) es una enfermedad infecciosa, relativamente común, de rápida diseminación, que se contagia por contacto oronasal con heces que contienen CCV sirviendo como fuente principal de infección<sup>1</sup>. El Coronavirus Canino daña las células epiteliales que recubren las vellosidades intestinales, dando como resultado ya sea una enfermedad clínica aparente o una forma asintomática que de cualquier manera resulta en daño intestinal severo (Fig. 1).



*Fig. 2: Coronavirus Canino atacando las células epiteliales maduras del intestino delgado de un perro (izquierda), responsables de la digestión y absorción, ocasionando su atrofia y la fusión de las vellosidades que se alinean en las paredes del intestino. Virus infectante y células infectadas son excretadas a segmentos caudales del intestino y a las heces. Conforme las células epiteliales basales en las criptas del intestino comienzan a reemplazar a las células dañadas por CCV, el Parvovirus Canino (derecha) se multiplica. El ataque del CCV continúa en la parte media- alta de las vellosidades intestinales, unido al ataque en las criptas por parte del Parvovirus Canino, perdiéndose tanto enzimas digestivas como la capacidad de absorción del epitelio.*

Los signos clínicos aparentes de la enfermedad por Coronavirus incluyen vómito, diarrea, depresión, deshidratación, y ocasionalmente, síntomas respiratorios asociados. Estos signos son similares a los ocasionados por el Parvovirus Canino (CPV), el más frecuente de los patógenos entéricos, que puede estar presente concurrente o secuencialmente con la infección por CCV.

Evidencia reciente sugiere fuertemente una cascada de eventos infecciosos en la cual el Coronavirus y otros patógenos actúan juntos para incrementar la severidad de la infección gastrointestinal (Fig. 2).<sup>2,3</sup> Las células epiteliales intestinales en las criptas intestinales comienzan a reemplazar a las células epiteliales maduras dañadas por el Coronavirus. Esta división germinal activa provee de un sitio ideal para la replicación de otros patógenos entéricos.

Conforme estos patógenos se multiplican, destruyen también a las células germinales del epitelio intestinal. Las vellosidades intestinales están severamente dañadas e incapaces de funcionar normalmente, resultando en diarrea y una amenaza para la vida del animal.

Las vacunas elaboradas con Virus Vivo Modificado (VVM) estimulan la inmunidad de las mucosas y ofrecen una protección más efectiva en contra de virus entéricos y respiratorios, además de otras ventajas prácticas (Tabla 1). Sin embargo, una de las primeras vacunas con VVM se vendió para su empleo en perros en Estados Unidos en el año de 1983 y tuvo que retirarse rápidamente del mercado por ocasionar un síndrome neurológico post - vacunal,<sup>4,5</sup> por ello durante los siguientes 10 años, todas las vacunas en dicho país, fueron elaboradas con Coronavirus Inactivado.

Las vacunas con Coronavirus Muerto solamente **reducen** la replicación viral que dan como resultado daño en el epitelio del intestino así como la excreción viral post – desafío en lugar de proteger contra la infección. De la misma manera, la multiplicación del Coronavirus Canino en el intestino delgado solamente se ve reducida pero no eliminada por las vacunas conteniendo Coronavirus Muerto.

Para superar estas deficiencias, una nueva vacuna que contiene Coronavirus Canino vivo fue desarrollada y autorizada por el USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos). Esta nueva vacuna esta elaborada a partir de la cepa Cornell de Coronavirus (Origen canino), y ha sido exhaustivamente probada para garantizar su seguridad.

Los resultados demuestran que la nueva vacuna es excepcionalmente segura así como efectiva.

Los objetivos de este estudio fueron el determinar la eficacia de esta vacuna de Coronavirus (VVM).

**TABLA 1: Atributos generales de vacunas con virus vivo o con virus muerto**

PARAMETRO	VACUNAS	
	Virus Vivo Modificado	Virus Muerto
Producción de Anticuerpos	Rápida	Lenta
Inmunidad Mediada por Células	Alta	Baja
Inmunidad de las Mucosas	Si	Escasa o Ninguna
Riesgo de Complicaciones Alérgicas	Mínima	Moderada
Reacciones Debidas al Adyuvante	No	Si

### La Investigación

Catorce (14) perros seronegativos a CCV (de 3 a 5 meses de edad) fueron vacunados contra el Parvovirus Canino antes de su llegada, y mantenidos en unidades aisladas. En el día cero (0) y día 21, la mitad de los perros fueron vacunados con vacuna de CCV – VVM en forma monovalente. La otra mitad recibió vacuna control de Distemper, Adenovirus tipo 2, Parainfluenza y parvovirus (DA2PiP) rehidratada con bacterina de *Leptospira canicola* – *icterohaemorrhagiae* (LCI) (Tabla 2)

En los días 0, 21 y 34 post-vacunación (PostV), se realizó serología de todos los perros para todos los componentes de las vacunas.

En el día 34 PostV, todos los perros fueron desafiados con CCV por la vía oronasal (0.5 ml./por c/orificio nasal + 1 ml oral) con una cepa de CCV perteneciente al Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (NVSL) de la USDA. El desafío se evaluó en todos los perros por medio de examen físico diarios y hasta 6 días después del desafío

En el día 40 (6 días después del desafío), se colectaron muestras de sangre previo a la eutanasia de los perros. De cada perro, se obtuvieron diez secciones estándar del intestino delgado y una muestra fecal. Se procesaron mediante métodos de aislamiento viral establecidos en cultivos celulares y confirmados por técnica de anticuerpos fluorescentes (FA).

**TABLA 2: Estudio de eficacia de CCV – VVM :Las vacunas fueron aplicadas a 14 perros seronegativos en los días 0 y 21.**

Número de perros	Vacuna
7	Vacuna Monovalente de CCV-VVM
7	DA2PiP/LCI, no CCV (controles)

**TABLA 3: Hallazgos a la necropsia en perros, 6 días después del desafío con Coronavirus Canino**

Controles (no vacunados con CCV)	Hallazgo: Vacunados:	Nódulos linfáticos mesentéricos agrandados y hemorrágicos 1/7 (14 %)
		5/7 (71 %)
Controles (no vacunados con CCV)	Hallazgos: Vacunados:	Mucosa intestinal o placas de Peyer: hiperémicas / edematosas 0/7 (0 %)
		3/7 (43 %)

## Resultados

**Observaciones después de la vacunación** - La vacuna de CCV - VVM no produjo reacciones locales adversas o generalizadas.

**Lesiones y signos clínicos después del desafío** - Después del desafío, la vacuna demostró que protege en contra de la enfermedad por CCV. En el día 6 después del desafío, ninguno (0/7; 0%) de los perros controles tuvo heces con moco, líquidas o diarrea. El desafío no indujo fiebre en ninguno de los perros. A pesar de que solo hubieron algunos signos clínicos visibles de enfermedad entérica, los hallazgos a la necropsia (Tabla 3) mostraron lesiones en 1 / 7 (14%) de los animales vacunados y 5 / 7 (71%) de los controles.

**Serología** - Todos los perros fueron seronegativos a todos los antígenos

**TABLA 4: Títulos de anticuerpos por Sero Neutralización (log 10) en los días 0 y 40 (6 días después del desafío)**

Media Geométrica de Anticuerpos log 10	CCV Día 0	CCV Día 40	DAPIp/LCI Día 0	DAPIp/LCI Día 40
D	≤ 0.47	≤ 0.47	≤ 0.47	2.3
A	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	2.5
Pi	≤ 0.3	≤ 0.3	≤ 0.3	1.0
P	1.7	1.8	2.0	3.3
CC	≤ 0.3	2.0	≤ 0.3	≤ 0.3

(D) Distemper(A2) Adenovirus tipo 2 (CCV) Coronavirus Canino (Pi) Parainfluenza (CPV) Parvovirus (LCI) Leptospira canicola - icterohaemorrhagiae

(excepto a parvovirus) en el día 0. Los perros en el grupo control (DAPIp/LCI) permanecieron seronegativos al CCV hasta el desafío, y a su vez los del grupo vacunado con vacuna monovalente de CCV se mantuvieron negativos a Distemper y a Parainfluenza. (Tabla 4)

### Excreción viral

La Tabla 5 muestra la reducción en la replicación intestinal del CCV empleado

en el desafío en aquellos perros vacunados con CCV-VVM comparados con los perros no vacunados.

Especialmente importante fue que no se logró detectar en las muestras fecales de ninguno de los perros vacunados con vacuna monovalente de CCV-VVM excreción del virus empleado en el desafío, por otro lado el virus fue excretado por el 86% de los animales no vacunados con CCV-VVM.

**TABLA 5: Evaluación del desafío de una vacuna de Coronavirus Canino con Virus Vivo Modificado**

GRUPO	# de perros	# con evidencias de infección por CCV	# con excreción en heces de CCV	Intestino delgado (10 secciones / perro)	
				Aislamiento de CCV	Detección de AF para CCV
Vacuna de CC monovalente	7	1/7 (14%)	0/7 (0%)	8.6%	2.9%
DAPIp/LCI Control	7	6/7 (86%)	6/7 (86%)	68.6%	28.6%

(D) Distemper(A2) Adenovirus tipo 2 (CCV) Coronavirus Canino (Pi) Parainfluenza (CPV) Parvovirus (AF) Anticuerpos fluorescentes (LCI) Bacterina Leptospira canicola - icterohaemorrhagiae

**Eficacia** – Con respecto a los aislamientos de muestras individuales de intestino delgado, el grupo control tuvo 69% de infección. La eficacia verdadera o Fracción Prevenible (FP), fue calculada de la siguiente manera:

$$FP = \frac{\text{(incidencia de infección en controles - incidencia de infección en vacunados)}}{\text{Incidencia de infección en controles}}$$

Al aplicar esta fórmula el resultado de eficacia para la vacuna monovalente de CCV-VVM fue de 88 %

## Discusión

Dos resultados de investigaciones recientes indican que el impacto de CCV en la población canina ha sido subestimado. El primero fue descubrir que el Coronavirus Canino contribuye en una forma importante como agente sinérgico en las infecciones entéricas, para que las infecciones por múltiples microorganismos sean

significativamente más severas.<sup>2,3</sup>

El segundo es esta investigación que confirma que la infección asintomática de la infección de Coronavirus produce daño al epitelio del intestino en perros de cualquier edad. Aún en esta forma clínica inaparente, el CCV virulento puede excretarse vía fecal. Esta nueva vacuna a Virus Vivo Modificado es la única vacuna de Coronavirus Canino para la cual las investigaciones han mostrado tanto protección contra la forma asintomática como contra la forma clínica de la enfermedad de CCV.

Ambas formas de la enfermedad de Coronavirus canino son altamente contagiosas. A diferencia de las actuales vacunas de Coronavirus producidas con virus muerto, la vacuna de Merial elaborada con VVM es la primera y única vacuna de Coronavirus que ha sido documentada para proteger actualmente en contra del daño intestinal y prevenir la excreción viral en un 88 % de los animales vacunados, por lo tanto es capaz de detener la diseminación de esta enfermedad.

La protección incompleta de vacunas con Coronavirus muerto puede ser inherente a la naturaleza de la inmunidad que estas vacunas producen. Debido a que el virus de CCV provoca una infección superficial en la mucosa del intestino, la inmunidad generada de tipo local y mediada por células puede esperarse que sea más efectiva que una respuesta humoral en contra de CCV. Asimismo, los anticuerpos secretores (IgAs) deben de ser más importantes que una respuesta sistémica en la cual los anticuerpos están circulando en la sangre. Las vacunas con virus muertos en general producen poca o nula respuesta de anticuerpos secretores,<sup>6</sup> pero las vacunas elaboradas con VVM si estimulan anticuerpos secretores y promueven la inmunidad mediada por células (IMC).

## Inmunoprofilaxis en contra de CCV

Este trabajo mostró una correlación entre el título de anticuerpos neutralizantes en suero y la protección en contra del desafío oronasal cuando se comparó con perros controles seronegativos.

## Excreción Viral

Los perros infectados oronasalmente excretan Coronavirus patógeno en las heces hasta por 2 semanas después de la infección.<sup>7</sup> Ninguna vacuna con virus muerto ha demostrado hacer más que simplemente reducir el grado de replicación viral en el tracto gastrointestinal,<sup>6</sup> y aún perros vacunados con virus muerto de CCV continúan excretando virus patógeno.

En el estudio reportado aquí, ningún perro vacunado con esta vacuna de CCV - VVM excretó el virus patógeno después de que fue administrado oronasalmente, indicando que no ocurrió replicación viral.

**Inmunoprofilaxis en contra de CCV**

Este trabajo mostró una correlación entre el título de anticuerpos neutralizantes en suero y la protección en contra del desafío oronasal cuando se comparó con perros controles seronegativos.

**Excreción Viral**

Los perros infectados oronasalmente excretan Coronavirus patógeno en las heces hasta por 2 semanas después de la infección.<sup>7</sup> Ninguna vacuna con virus muerto ha demostrado hacer más que simplemente reducir el grado de replicación viral a través del tracto gastrointestinal,<sup>6</sup> y aún perros vacunados con virus muerto de CCV continúan excretando virus patógeno. En el estudio reportado aquí, ningún perro vacunado con esta vacuna de CCV - VVM excretó el virus patógeno después de que fue administrado oronasalmente, indicando que no ocurrió replicación viral.

**Referencias**

- 1.- Pollock RVH. Infectious diseases – canine viral enteritis. In: Kirk RW, (ed.) Current Veterinary Therapy, 8th ed., 1983; 1292-1299.
- 2.- Evermann JD, McKeirnan AJ, Eugster AK, et al. Update on canine coronavirus infections and interactions with other enteric pathogens of the dog. Companion Anim Pract 1989; 19 (2): 6 – 12.
- 3.- Tennant BJ, Gaskell RM, Kelly DF, et al. Studies on the epidemiology of canine coronavirus. Vet Rec, 1993; 132: 7 – 11
- 4.- Martin ML. Canine coronavirus enteritis and a recent outbreak following modified live virus vaccination. Compend Contin Educ Pract Vet, 1985; 7 (12): 1012.
- 5.- Wilson RB, Holladay A, Cave JS. A neurologic syndrome associated with use of a canine coronavirus – parvovirus vaccine in dogs. Compend Cont Educ Pract Vet, 1986; 8:117 – 124.
- 6.- Greene CE (ed.). Immunoprophylaxis and immunotherapy. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 1990; 35– 36.
- 7.- Tennant BJ, Gaskell RM, Kelly DF, et al. Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. Res Vet Sci, 1991; 51: 11 – 18.
- 8.- Binn LN, Lazar EC, Keenan KP, et al. Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. Proceedings, 78th Ann Mtg US Anim Health Assoc, 1974; 359 – 366.
- 9.- Keenan KP, Jervis HR, Marchwicki RH, et al. Intestinal infection of neonatal dogs with CCV-1-71. AJVR, 1976; 37: 247 – 256.
- 10.- Appel MJG. Canine coronavirus. In: Virus Diseases of Carnivores. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publ, 1987; 115 – 122.

**TABLA 6: Comparación entre vacunas actuales de Coronavirus Canino con virus vivo modificado y virus muerto**

Criterio	Coronavirus Canino Virus Vivo Modificado	Coronavirus Canino Virus Muerto
Previene el daño en mucosa intestinal	Si – No hay lesiones	No hay reportes
Previene excreción de virus patógeno	Si – No hubo excreción en 90% de los vacunados; reducido en el 10% restante	No – Los vacunados continúan excretando virus patógeno
Ausencia de virus en el intestino después del desafío	Si – No se aisló virus en el 90%	No hay reportes

**Signos clínicos y hallazgos a la necropsia**

Signos moderados de enteritis canina por Coronavirus Canino se han inducido experimentalmente en perros neonatos,<sup>8,9</sup> pero ha sido difícil reproducir signos claros en forma experimental.<sup>10</sup> Este estudio fue conducido en perros seronegativos a CCV de 12 a 20 semanas de edad para reproducir la enfermedad de forma mas parecida a la natural. Un importante hallazgo en este estudio fue que aún en la forma asintomática de infección de CC, se observaron notables lesiones (Fig. 1) en la necropsia de los perros controles después del desafío virulento, indicando daño viral al intestino.

**La vacuna de Coronavirus Canino con Virus Vivo Modificado de Merial protege a los perros en contra de:**

- INFECCIÓN
- SIGNOS CLÍNICOS
- REPLICACIÓN VIRAL
- DAÑO A LAS PAREDES DEL INTESTINO
- EXCRECIÓN VIRAL

**Conclusión**

En el desarrollo de cualquier vacuna, el objetivo científico principal es proteger en contra de la infección. Para un patógeno entérico como es el

Coronavirus Canino, los criterios prácticos más importantes para evaluar el progreso hacia el objetivo son:  
 1) Prevenir el daño intestinal.  
 2) Prevenir la excreción viral post-desafío.  
 3) Ausencia de virus patógeno en el intestino después de un desafío.  
 La información presentada aquí indica que esta nueva vacuna conteniendo Coronavirus Canino Vivo Modificado cumple con estos criterios de selección (Tabla 6). Para las vacunas a virus muerto, en contraste, no hay reportes disponibles de datos en cuanto a daño intestinal o aislamiento viral. Además , la excreción continua del virus patógeno en perros vacunados con vacunas conteniendo virus muerto, es un fenómeno bien establecido.

La vacuna de Coronavirus Canino con VVM de Merial proporciona seguridad y protección eficaz en contra de la enfermedad por Coronavirus Canino. Produce una fuerte respuesta serológica al CCV y protege efectivamente a los perros contra desafíos de CCV. En adición, protege contra la infección y su diseminación, medida por la ausencia de excreción del virus de desafío. Esta nueva vacuna claramente ofrece una marcada ventaja sobre las vacunas comerciales actuales con Coronavirus muerto.