

ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS Y LABORATORIALES DE LA ENFERMEDAD HEMORRAGICA DEL CONEJO (R.H.D.) EN ESPAÑA.

A. Pagès Manté
Laboratorios HIPRA, S.A.
17170 Amer (Girona)

INTRODUCCION.

La enfermedad hemorrágica del conejo (R.H.D.) fue descrita por primera vez a nivel mundial por Liu S.J., Xue H.P., Pu B.Q., Quian N.H. (1), como un proceso agudo que apareció durante la primavera y verano de 1984 en la provincia China de Jiangsu. El agente causal era un virus de morfología icosaédrica de 28 a 33 nm, con nucleocápside de 20 nm. Al microscopio electrónico se pueden observar viriones vacíos, evidenciándose solamente la periferia. El ácido nucleico era de cadena simple y R.N.A. El virus presentaba propiedades aglutinantes sobre los eritrocitos de oveja, aves y humanos. El período de incubación era corto, de 224-48 horas y el poder hemoaglutinante se perdía por procesos de congelación y descongelación continuos. Se inactivaba con formol al 0,4%. Los síntomas principales eran de epistaxis y hemorragias generalizadas en pulmón, tráquea, músculo cardíaco, hígado, bazo, aparato digestivo y riñones.

Una vacuna confeccionada con macerados de tejidos inactivados por formol al 0,4% dió resultados esperanzadores para su control.

Anteriormente a la cita bibliográfica nº 1, Fennestat K.L., Mansa B., Larsen S., en 1981 (2) habían citado en Dinamarca un proceso que llamaban Pleural Effusion Disease (P.E.D.) (Derrame Pleural en Conejos).

Este proceso se transmitía por los conejos lactantes de madres afectadas a conejas que compartían la misma explotación, pero no a sus camadas, citándose que después del período de lactación, los conejos contactos con otros en fase virémica, permanecían libres de enfermedad entre 60 y 150 días. En 1982, los investigadores Osterhaus, A.D. M.E.; Teppema, J.S. y Sttenis, G. Van (3) determinaron el agente responsable del P.E.D. como un Coronalike.

A título informativo, estos agentes víricos se habían enunciado por Pagès 1986 (4) durante el Cursillo de Cunicultura celebrado



El Sr. Pagès durante la conferencia

en el Colegio de Veterinarios de Tarragona, así como en otras ocasiones al hablar de virus que afectan el aparato respiratorio del conejo.

Recientemente, en el año 1988, aparecieron en diferentes países europeos procesos similares a los descritos por Liu, S.J. y cols. en (1), haciendo sospechar la presencia de este tipo de virus. La ponencia del Dr. Xu, W.; Du, N.W. y Liu, S.J. (5) durante el Congreso Mundial de Cunicultura celebrado en Budapest, fue el detonante que aclaró este proceso a los que hasta el momento no estaban situados en la cuestión, creándose una psicosis de enfermedad ante cualquier proceso patológico, lejos de la realidad y con nefastas consecuencias para el sector cunícola.

Los trabajos de investigación plasmados en nuestro país durante 1988 por Pagès A. (6), Argüello, J.L. y cols. (7) y otros realizados por diferentes centros de investigación y facultades de veterinaria, determinaron la presencia de esta enfermedad en España durante principios de verano de 1988.

Su aparición repentina en conejos de monte hizo sospechar primeramente en un proceso de tipo tóxico, dada la agudeza del caso. La presencia de anticuerpos frente a *Mixomatosis* y las vacunaciones con virus homólogo contra esta enfermedad que se realizaban en algunas zonas afectadas, hizo pensar en un proceso de otra índole, pero la afección de un pequeño número de granjas minifundistas enclavadas en estas áreas, sin posibilidad de relación con los agentes sospechosos mencionados, nos indujo a pensar en el R.H.D.

Actualmente, los trabajos de Cancelotti, F.M.; Villeri, C.; Renzi, M.; Monfredini, R. (8) y P.S. Marcato; C. Benazzi; G. Vecchi; L. Della Salda; P. Simoni; P. Aiello; G. Tumino (9) hablan de esta enfermedad en Italia, así como Morisse, J.P. (10) y Löliger, J.C. y cols. (11) determinan esta enfermedad en Francia y Rep. Federal de Alemania, respectivamente.

Según los datos de Xu, W. y cols. en (5), esta enfermedad se introdujo en China a través de una importación de conejos de Angora procedentes de la República Federal de Alemania. Esto induciría a pensar que este virus

haya podido estar latente en Europa desde hace mucho tiempo, y que quizá han existido brotes no diagnosticados que hayan precedido a los actuales, determinando cierta resistencia a poblaciones de conejos como bien hemos podido constatar, dada la evolución de la enfermedad.

Vistas estas consideraciones históricas de la enfermedad hemorrágica del conejo, que-remos hacer mención de algunas características epidemiológicas, clínicas y laboratoriales de los agentes víricos de la R.H.D. aislados de conejos de monte, una granja minifundista y otra complementaria de nuestro país, que afortunadamente han sido muy localizadas y de poca magnitud hasta el momento.

MATERIAL Y METODOS.

Para realizar este estudio, se ha partido de tres tipos de muestras, referenciadas como 3.116, 3.662 y 3.824, procedentes de conejos de monte, explotación minifundista y explotación complementaria, respectivamente, todas ellas pertenecientes a tres focos distintos de R.H.D., y alejadas varios cientos de kilómetros entre ellas.

La metodología empleada fue la siguiente, para cada referencia:

A) Necropsia con anotación de las lesiones macroscópicas existentes.

B) Recogida de muestras de cerebro, tráquea, pulmón, hígado, bazo y riñón, que se trituraron separadamente en un aparato Virtis, se diluyeron con PBS al 1:10 y 1:100, clarificándose mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes, así como el producto de la filtración por 0,2 m de la dilución 1:100 se utilizaron para evidenciar su poder hemoaglutinante frente a glóbulos rojos de aves y humanos tipo 0. Se observó también la persistencia en estos substratos del poder hemoaglutinante tras la congelación y descongelación continua de los mismos.

C) Se recogieron muestras de cerebro, tráquea, pulmón, hígado, bazo, riñón, intesti-

CUADRO N° 1

Ref ^a .	Cerebro	Tráquea	Pulmón	Hígado	Riñón	Bazo	Intestino	Corazón
3.116	Congestivo	Hemorrágico	Hemorrágico total	Congestivo	Hemorrágico	Congestivo	Placas linfoides hemorrágicas	Hemorrágico
3.662	Normal	Hemorrágico	Hemorrágico parcial	Grande y friable	Normal	Agrandado	Normal	Normal
3.824	Normal	Hemorrágico	Hemorrágico parcial	Congestivo	Normal	Congestivo	Normal	Normal

no y ganglios, que se introdujeron en frascos con formol al 10% para procesarse histológicamente.

D) Se efectuaron macerados de hígado y bazo, principalmente, filtrados a 0,2 m e inoculados a monocapas de células Vero y RK₁₃ sitas en Falcons.

E) Se efectuaron inoculaciones experimentales a animales de laboratorio, tales como conejo joven, conejo adulto, ratón blanco tipo Balb, cobayo albino, pollo SPF y embrión de pollo por vías vitelina, membrana vitelina y líquido alantoideo.

F) Se inactivaron sobrenadantes procedentes de la centrifugación de un 10% de órganos macerados en PBS, con formol al 0,4% durante 24 horas a 37° C. Estos sobrenadantes se inocularon a razón de 1 ml por vía subcutánea e intramuscular a conejos adultos, para evidenciar la inocuidad y potencia del producto frente a un "challenge" homólogo y heterólogo. La dosis del "challenge" consistió en 0,5 ml de macerado de órganos, sin inactivar. En todo momento se mantuvieron animales testigo.

CUADRO N° 2

Organo	Dilución	Filtración	U.H.A. medias	
			G.R. ave	G.R. humanos
Cerebro	1/10	0,2m	4	6
	1/100		2	3
Tráquea	1/10	0,2m	2	5
	1/100		-	3
Pulmón	1/10	0,2m	-	8
	1/100		-	7
Hígado	1/10	0,2m	5	12
	1/100		2	11
Bazo	1/10	0,2m	4	12
	1/100		2	12
Riñón	1/10	0,2m	-	9
	1/100		-	6
			-	5

CUADRO N° 3

Organo	Resultado
Cerebro	Sin alteraciones observables.
Tráquea	Congestión vasos, edema, hemorragias focales.
Pulmón	Congestión, microtrombos.
Hígado	Necrosis hepática extensa y multifocal. Tumefacción celular cariorrexis.
Bazo	Deplección linfocitaria, congestión, neutrófilos infiltrados, cariorrexis y cuerpos de inclusión intranucleares.
Riñón	Microtrombos.
Intestino	Hemorragias mucosa.
Ganglios	Necrosis linfoide, cuerpos inclusión intranuclear, infiltrados de neutrófilos.

G) Se realizaron, tanto en los conejos experimentales como en los sobrevivientes de casas campo, testajes serológicos mediante la técnica B de inhibición de hemoaglutinación, utilizando 4 U.H.A. de antígeno y como indicador un 0,6% de glóbulos rojos humanos tipo 0, para observar la cinética de anticuerpos frente a R.H.D. Con el fin de evitar reacciones inespecíficas, todos los sueros testados se diluyeron v/v previamente con Caolín al 12% con PBS centrifugándose antes de su uso.

CUADRO N° 4

Refª.	E.C. Vero pases			E.C. RK ₁₃ pases			Hemoaglu- tinación
	1	2	3	1	2	3	
3.116	-	+	+	+	+	-	1/2
3.662	+	-	+	+	+	-	1/4
3.824	-	-	-	-	+	-	1/4

Tal como puede observarse en el Cuadro n° 1, las lesiones más persistentes están enclavadas en tráquea, pulmón, hígado y bazo. Experimentalmente, las más constantes son las del hígado.

CUADRO N° 5
Animales laboratorio

Refª.	Conejo <40 días	Conejo >70 días	Ratón blanco Balb	Cobayo albino	Pollo SPF 21 días	Embrión pollo SPF		
						S.V.	M.V.	L.AI.
3.116	Sin efecto	+ 48 horas	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	-	-	-
3.662	Sin efecto	+ 96 horas	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	-	-	-
3.824	Sin efecto	+ 72 horas	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	-	-	-

RESULTADOS.

Los resultados obtenidos se expresan en los siguientes cuadros:

Cuadro n° 1. En este cuadro se mencionan las lesiones macroscópicas observadas en las referencias 3.116, 3.662 y 3.824.

CUADRO N° 6

Refª. vacuna	Virus "challenge"			Inocuidad 15 días post-inoculación
	3.116	3.662	3.824	
3.116	0/5*	2/5	1/5	restos vacunas 4/5 ligero encapsulamiento fibroso vacuna 2/5 fibrina y congestión punto inoculación 3/5
3.662	1/5	0/5	0/5	
3.824	0/5	1/5	0/5	
Testigos	5/5	5/5	4/5	--

* número de afectados / número inoculados

Cuadro n° 2. En este cuadro se expresa la cuantificación del poder hemoaglutinante de diferentes macerados y filtrados frente a eritrocitos de ave y humanos. Para facilitar la lectura del mismo, se expresan estos resultados como medias de las tres referencias y su logaritmo en base 2 de la inversa de la dilución del virus.

Tal como se desprende de este cuadro, los órganos con mayor poder hemoaglutinante son hígado, bazo y pulmón, manteniéndose estos baremos a pesar de la filtración.

Referente a la congelación y descongelación continua, existe una disminución marcada del título hemoaglutinante, para llegar a ser negativo si este proceso se realiza muchas veces.

CUADRO N° 7

Referencia	N°. Sueros	Media U.I.H. Virus homólogo	Media U.I.H. Virus heterólogo	Standard* chino
3.116	6	1.024	128	10 x 512*
3.662	3	512	n.t.	10 x 32
3.824	2	128	64	10 x 16
Contacto experimental	2	64	n.t.	n.t.
Contacto exp. + challenge	2	2.048	512	n.t.
Vacuna exper. 15 días	1	128	64	n.t.
Vacuna exp. + challenge 20 días	2	64	n.t.	n.t.
Vacuna exp. + challenge 30 días	3	512	128	n.t.
Conejos resistentes challenge 0 días	5	32	n.t.	n.t.
Conejos resistentes challenge 20 días	5	1.024	512	n.t.

U.I.H. = Unidades inhibitoras hemoaglutinación

* = Facilitados por Dr. Xu, W.

Cuadro n° 3. En este cuadro se expresan los resultados histológicos en diferentes órganos, amablemente facilitados por el Servicio de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad Veterinaria de Barcelona.

Cuadro n° 4. En este cuadro se expresan los resultados obtenidos tras diferentes pases de macerados estériles de hígado y bazo en monocapas de células Vero y RK13 sitas en Falcons en cuanto a su efecto citopático (E.C.) y hemoaglutinación.

Tal como puede observarse, existe efecto citopático inconstante y hemoaglutinación débil, lo que indicaría una falta de replicación vírica de una manera constante y alta en estos cultivos.

Cuadro n° 5. En este cuadro se facilitan los resultados obtenidos tras la inoculación experimental a animales de laboratorio, de las refs. 3.116, 3.662 y 3.824, tras una observación de 10 días.

Tal como puede desprenderse del Cuadro n° 5, este virus afecta únicamente a conejos adultos, no observándose ningún efecto patológico en el resto de animales testados.

Cuadro n° 6. En este cuadro se reflejan los resultados obtenidos tras la vacunación experimental con 1 ml de macerado de órganos previamente inactivados, inoculados por vía subcutánea. Se pone énfasis en la protección tras el "challenge" homólogo y heterólogo, y en la inocuidad del producto, tras 15 días de observación.

En estos resultados, podemos observar una protección total en los "challenge" homólogos y una protección ligeramente menor con "challenge" heterólogos. Es importante para replicar estos resultados el obtener una población de conejos susceptible.

Respecto a la inocuidad a los 15 días post-vacunación, existen restos de vacuna en el punto de inoculación, acompañada de ligera reacción tisular.

Cuadro n° 7. En este cuadro se expresan los resultados obtenidos mediante la téc-

nica B de inhibición de la hemoaglutinación (IH) sobre diferentes sueros extraídos de conejos en diferentes circunstancias respecto al RHD. Algunos de ellos fueron contrastados por el Dr. Xu W. (12) con el virus standard chino como prueba de identidad de la enfermedad.

Tal como se desprende de estos resultados las referencias testadas presentan tanto al testaje homólogo como heterólogo tasas de suero conversión al virus de la RHD notorias. Estas tasas se han contrastado con el virus standard chino y tal como se observa coinciden sus resultados, lo que indica una prueba evidente de identidad vírica.

Los conejos contacto con otros que sucumbieron afectados por RHD presentan también una tasa de anticuerpos específicos notoria, 1/64.

Los conejos contacto a nivel experimental y que además han sufrido un "challenge" presentan una tasa muy alta de anticuerpos, 1/2048.

Los conejos testados vacunados experimentalmente determinaron a los 15 días post-vacunación tasas que oscilan en 1/128. Si estos conejos sufren un "challenge", su tasa inmunitaria disminuye uno o dos logaritmos hasta los 20 días para luego emprender un efecto boosting hasta un título de 1/512.

Los animales encontrados resistentes al challenge pueden tener tasas sólo de 1/32 incrementándose estas tasas por efecto del mismo hasta 1/1024.

CONCLUSIONES.

A la vista de estos resultados obtenidos, podemos concluir en lo siguiente:

1. Dada la variación de las características de replicación y multiplicación a niveles altos, del virus de la RHD, en cultivos celulares es difícil aún su correcta tipificación. Las características morfológicas al M.E. y el polimorfismo de los viriones observados podrían

enclavarlo en un Calicivirus o un virus helper, asociado.

2. Las características clínicas son variables, siendo el órgano más frecuentemente afectado el hígado. Con ello, ante cualquier sospecha de enfermedad se hace imprescindible un diagnóstico laboratorial complementario.

3. Histológicamente existen lesiones en animales afectados naturalmente en hígado, bazo, riñón, ganglios, pulmón, tráquea, etc. A nivel experimental las lesiones más persistentes son las que afectan al hígado.

4. Para el testaje del poder hemoaglutinante de diferentes macerados de órganos frente a eritrocitos humanos es recomendable la dilución al 1/100 en PBS del macerado, su centrifugación si es preciso y el filtrado a 0,2 m, para evitar interpretaciones erróneas.

5. Los órganos con mayor poder hemoaglutinante son hígado, bazo, riñón, pulmón y tráquea, siendo el hígado el más recomendable, dado que es el más constantemente afectado.

6. Aunque experimentalmente existen ligeras variaciones entre un challenge homólogo y heterólogo es evidente una naturaleza etiológica única del RHD, tal como la constata la identidad del virus español con el virus chino.

7. La técnica B de inhibición de la hemoaglutinación es la más adecuada para evaluar animales resistentes, contactos, portadores o bien animales inmunizados experimentalmente.

8. La inoculación de macerados de órganos inactivados por formol, induce resistencia alta al challenge homólogo y ligeramente inferior al heterólogo, a nivel experimental.

9. El período de tiempo entre la vacunación y el contacto con el agente vírico debe ser como mínimo de 6 días.

10. Este virus solamente afecta a conejos adultos no existiendo ningún efecto para

conejos jóvenes, cobayos, ratones y embriones de pollo. En ningún país afectado por esta enfermedad se citan efectos nocivos para el hombre.

11. La difusión del virus por contacto y los factores predisponentes son los responsables mayores del afincamiento del RHD en una granja.

12. Hasta la fecha las granjas minifundistas con problemas de manejo, Pasteurellosis crónica, Mixomatosis crónica, parasitadas han sido las más predisuestas a enfermar.

13. Una política sanitaria que evite el contacto y difusión del virus y que a la vez disminuye los factores predisponentes mencionados, creemos que puede ser la más adecuada para el control de la enfermedad, en espera de una política profiláctica estudiada profundamente y eficaz si la difusión del R.H.D. es mayor.

BIBLIOGRAFIA.

1.-Liu, S.J., Xue, H.P., Pu, B.Q., Quian, N.H.: *A New viral disease in rabbits. Animal Husbandry and Veterinary Medicine* 16, 6, 1984, 253-255.

2.-Fennestat, K.L., Mansa, B., Larsen, S.: *Pleural effusion disease in rabbits. Observations on viraemia immunity and transmissibility. Archives of Virology* 70, 1, 1981, 11-19.

3.-Osterhaus, A.D.M.E., Teppema, J.S., Steenis, G. Van.: *Coronavirus-like particles in laboratory rabbits with different syndroms in the Netherlands. Laboratory Animal Science* 32, 6, 1982, 663-665.

4.-Pagès, A: *Problemática respiratoria del conejo y terapéutica. Cursillo cunicultura. Colegio Oficial Veterinarios Tarragona. 24 de Enero de 1986.*

5.-Xu, W., Du, N.W. and Liu, S.J.: *A new virus isolated from Haemorrhagic in Rabbits. Cuarto Congreso Mundial de Cunicultura. Budapest (Hungría). Octubre 10-14, 1988, 456-461.*

6.-Pagès, A.: *Trabajos de investigación sobre la Enfermedad Hemorrágica Vídica del conejo en la*

zona Murciana. Consejería de Agricultura de Murcia. 20 de Diciembre 1988.

7.-Argüello, J.L., Llanos Pellitero, A., Pérez-Ordoyo, García, L.I.: *Enfermedad vírica hemorrágica del conejo en España. Medicina Veterinaria* Vol. 5. N° 12, 1988, 645-650.

8.-Cancelotti, F.M., Villeri, C., Renzi, M., Monfredini, R.: *Le insidie della malattia x del coniglio. Revista de conigliocultura* n° 9, 1988, 41-46.

9.-Marcato, P.S., Benazzi, C., Vecchi, G., Della Salda, L., Simoni, P., Aiello, P., Tumino, G.: *L'epatite necrótica infettiva del coniglio. Profilo*

patogenetico di una nuova malattia emorragica. Revista de conigliocultura n° 9, 1988, 59-64.

10.-Morisse, J.P.: *Le syndrome "septicémie hémorragique chez le lapin: Premières observations en France. Le Point Vétérinaire* N° 20, 117. Novembre 1988, 79-83.

11.-Lölinger, J.C., Matthes, S., Liess, B.: *Über das auftreten einer infektiösen hämorrhagischen Erkrankung bei Hauskaninchen in der Bundesrepublik Deutschland. Tierärzti Umschau* 44, 1989, 22-25.

12.-Xu, W.: Carta personal. 29 de Enero de 1989.



Explotación Cunicola

Granjas de Selección



Producto del proyecto de mejora iniciado en 1982,
les ofrecemos nuestros reproductores "HC",
así como nuestra colaboración y experiencia.

Técnicas Cunicolas, S.A.
CAN LLOPART

Afuera, s/n
Tel. 772 56 89
08783 MASQUEFA (Barcelona)