

Impacto de la mixomatosis en la cunicultura industrial española: análisis de las causas y propuesta de actuaciones

Kevin P. Dalton*, **Franziska Ringleb** y **Francisco Parra**

Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Edificio Santiago Gascón, Campus El Cristo. Universidad
de Oviedo, 33006 Oviedo, España.

*daltonkevin@uniovi.es

La mixomatosis es una enfermedad altamente contagiosa que afecta al conejo europeo doméstico y de monte (Russell *et al.*, 2000). A pesar de la existencia de programas de vacunación, esta enfermedad sigue siendo uno de los principales problemas sanitarios de la cunicultura española. Debido a la importancia de la enfermedad y a sus repercusiones, es actualmente obligatorio declarar los nuevos brotes del virus mixoma (MV). La gravedad del problema ha llevado también a la implantación de normas para la ordenación de las explotaciones cunícolas (Real decreto 1547/2004) las cuales deberán llevar a cabo un programa sanitario encaminado al control de la mixomatosis, estableciendo así mismo procedimientos para la calificación sanitaria de las mismas con respecto a esta enfermedad. Sin embargo, actualmente no es técnicamente posible diferenciar los animales vacunados de los infectados con MV, debido a la naturaleza de las vacunas comerciales utilizadas, dificultando la calificación de las explotaciones como libres de la enfermedad.

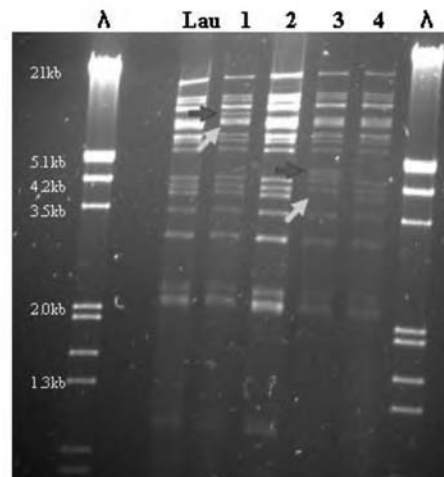
El agente causal de esta enfermedad es el virus mixoma (género *Leporipoxvirus* de la familia *Poxviridae*). Los virus de esta familia son muy complejos, antigénicamente y genómicamente. Esta complejidad justifica la existencia de multitud de cepas con distintos niveles de virulencia. Este proyecto de investigación que estamos iniciando tiene como objetivo principal estudiar el impacto de la mixomatosis en la cunicultura industrial española, hacer un análisis de las causas de los brotes y formular una propuesta de actuaciones para mejorar el control de esta enfermedad en las granjas españolas. Para alcanzar estos objetivos hemos empezado por desarrollar los instrumentos necesarios para aislar y caracterizar molecularmente los virus mixoma circulantes en nuestro país así como para diferenciarlos de las cepas vacunales utilizadas más comúnmente.

Para obtener datos sobre la prevalencia de la mixomatosis y ayudar a identificar las cepas de los virus que están circu-

lando en la actualidad estamos organizando una red de técnicos colaboradores, representativa de toda España, para la toma de muestras de conejos de granja con signos de mixomatosis así como de animales silvestres de las inmediaciones de las granjas afectadas. Paralelamente, estamos estudiado la supervivencia del virus en distintas condiciones (procedimiento y tipo de muestra, temperatura de almacenamiento etc..) para dar instrucciones claras a nuestros colaboradores en el campo a la hora de la toma de muestras. También hemos definido las mejores condiciones para el almacenaje, cultivo y aislamiento eficaz del virus a su llegada al laboratorio. Para acompañar a la toma de muestras, hemos elaborado un formulario en el que se incluyen no solo los datos de la muestra sino también sobre el manejo, las pautas de vacunación utilizadas y el tipo y estado general de la granja, con el fin de entender mejor otros posibles factores que contribuyen a la aparición de brotes.

Para investigar las causas de los brotes de mixoma y realizar la identificación de las cepas responsables de los mismos, es fundamental ser capaz de diferenciar distintas cepas de este virus mediante su caracterización genética (polimorfismos RFLP) ó antigénica. Para desarrollar las

Figura 1. Perfil electroforético (RFLP) de DNA genómico purificado a partir de viriones de MV digerido con EcoRI. Las flechas muestran varios RFLPs identificados en las cepas 1 y 3 con respecto a la cepa de referencia Lausanne (Lau) (λ) Marcadores de tamaño del DNA.



metodologías necesarias estamos analizando actualmente nueve cepas de virus mixoma aisladas en España entre los años 1992 y 1995, y que habían sido previamente caracterizadas y clasificadas en base a su grado de virulencia (Barcena *et al.*, 2000).

En primer lugar hemos puesto a punto los protocolos para el análisis inicial de muestras en el laboratorio, (la confirmación de la presencia del virus por PCR el aislamiento del virus en cultivo y su detección mediante inmunofluorescencia). Estos análisis nos han llevado a establecer una primera manera de diferenciar algunas de las cepas mediante la observación de los distintos tipos de efecto citopático que producen en cultivos de células RK13.

Para llevar a cabo la caracterización molecular del virus y desarrollar análisis diferenciales estamos usando los aislados de campo mencionados anteriormente y las tres principales cepas vacunales que se usan en España. Esta caracterización requiere el cultivo y purificación de viriones así como la identificación de polimorfismos mediante análisis RFLP (restriction fragment length polymorphism) presentes en sus genomas.

Para realizar esta caracterización molecular estamos usando técnicas cuya adecuación y eficacia para diferenciar cepas ha sido previamente demostrada (Saint *et al.*, 2001). Sin embargo, dichas técnicas son laboriosas y requieren el cultivo de grandes cantidades de virus. Por ello, hemos optimizado estos protocolos y reducido el tiempo necesario para el análisis de cada muestra. De esta forma, usando como referencia el genoma de la cepa Lausanne del MV, hemos identificado mutaciones genómicas que nos permiten distinguir muchas de las cepas de campo incluidas en este estudio. En la **Figura 1** se muestra resultado representativo de este tipo de análisis.

El tamaño del genoma de MV no permite el análisis mediante secuenciación del genoma completo de todas las cepas aisladas. Sin embargo, quizás sea posible identificar genes ó regiones del genoma que contienen mutaciones que permiten diferenciar las cepas. Por ello, también estamos investigando la posibilidad de usar PCR y secuenciación no solo para confirmar la presencia de MV sino también para realizar la identificación de mutaciones que puedan facilitar la diferenciación entre cepas. Usando este tipo de análisis hemos identificado mutaciones que se pueden usar para distinguir algunas de las cepas aunque su papel en el nivel de virulencia de las mismas todavía se desconoce. La **Figura 2** muestra un ejemplo de este tipo de análisis.

Por otro lado, la aplicación de estos métodos moleculares al análisis de las cepas vacunales utilizadas normalmente en nuestro país debería permitir encontrar alteraciones que posibiliten el diseño de diagnósticos para diferenciar animales infectados de modo natural de aquellos que han sido vacunados. A este respecto hemos confirmado que dos de estas cepas vacunales contienen deleciones importantes en distintas regiones de sus genomas (Guerin *et al.*, 1998). En la actualidad estamos investigando el genoma de la tercera cepa vacunal, todavía no caracterizada a este nivel. De existir diferencias adecuadas, estos métodos permitirían el diseño de diagnósticos diferenciales y la calificación sanitaria de las explotaciones cunícolas así como la investigación de la eficacia de las pautas vacunales utilizadas.

Referencias

Barcena, J. et al., (2000) Arch. Virol. 146: 759-771.

Saint, K.M. et al., (2001) Arch. Virol. 146: 1105-1123.

Rosell, J.M., et al., (2000) En : Enfermedades del conejo. Capítulo XVIII Enfermedades víricas 301-353. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa.

Guerin, J-L. et al., (1998) *7^{èmes Journ. Rech. Cunicole Fr.}*, Lyon 53-56.

Figura 2. Análisis de la secuencia nucleotídica del gen M121R del virus de mixoma. La flecha indica una mutación en la cepa 5 por comparación con la cepa Lausanne

