

## AISLADO UN VIRUS TIPO PARVO

# Enfermedad hemorrágica del conejo

En la primavera de 1984 se detectó, en los conejos de Angora importados desde Alemania Federal a China, una enfermedad infecciosa aguda, incurable e incontrolable mediante antibióticos y sulfamidas: se supuso entonces que estaba provocada por un virus denominado provisionalmente, virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (EHC).

**Xu Wei - Yan-Du Mi Xing-Liu  
Sheng Jiang**

Departamento de Microbiología  
Veterinaria de la Universidad de  
Agricultura de Pekin (China).

**E**xiste en China desde 1984 una nueva enfermedad infecciosa de los conejos. Unas partículas virales, de reducidas dimensiones, halladas en extractos de tejidos de conejos infectados, podían reproducir la enfermedad si se inoculaban experimentalmente a conejos sensibilizados, de los que había sido aislado el mismo virus.

Debido a ello, se ha confirmado que el agente causante es un virus, denominado provisionalmente virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV), correlativamente a la denominación de la enfermedad, esto es, enfermedad viral hemorrágica del conejo o RVHD.

La unidad vírica es de 32-43 nm. (nanómetros de diámetro, con simetría icosaédrica y sin envoltorio (cápsula). Su densidad de flotación en CsCl es de 1.36-1.38 g/cm<sup>3</sup> y el coeficiente de sedimentación, de 116 S. El ácido nucleico es DNA (monocatenario) con un peso molecular de 2.4 x 10<sup>6</sup> d. El virus puede aglutinar los eritrocitos humanos, resiste al tratamiento de cloroformo y éter, y es estable a un Ph de 3,0 y a 50° C durante una hora. En las

células hepáticas, renales y en el encéfalo se han encontrado inclusiones nucleares. Por estos resultados se ha pronosticado la pertenencia de este virus a una nueva especie, cuyas propiedades son fundamentalmente análogas a las de los Parvovirus.



**La penetración de la enfermedad hemorrágica viral en China coincidió con la importación, en 1984, de conejos de raza Angora de la República Federal de Alemania.**

## Descripción de la enfermedad

La enfermedad ataca a conejos con más de dos meses de edad y no se da nunca en los de edad inferior o en lactancia, sin distinción de sexo o raza. En tales crianzas, la mortalidad supera al 80 por 100, si bien algunos son bastante resistentes. La infección experimental señala que el período de incubación es muy breve, principalmente de uno a dos días, en ocasiones de tres. El virus penetra en el huésped a través de pequeñas lesiones en la piel y por las vías respiratorias y digestivas. La enfermedad típica puede reproducirse por inoculación oral, intramuscular e interperitoneal de suspensión del tejido infectado. En los casos espontáneos hiperagudos no se observan síntomas clínicos. Muchos conejos que se muestran normales por lo que se refiere a apetito y aspecto, mueren de improviso después de unas horas. La muerte viene precedida por la emisión de gemidos.

En las infecciones experimentales, se ha notado una subida térmica de 1-1,5° C tras un período de doce a veinticuatro horas desde la inoculación, después de lo cual la temperatura decae rápidamente.

**Lesiones anatomopatológicas**

La piel que rodea las narices se mancha de sangre coagulada y se observan en los pulmones hemorragias petequiales de dimensiones diversas, desde una cabeza de alfiler hasta el de una alubia.

La tráquea, los bronquios y los bronquiolos se llenan de líquido espumoso: en las mucosas se notan petequias y hemorragias difusas. El hígado aparece muy hinchado, de color rojo tendente a marrón, y frágil. La vesícula se muestra repleta de bilis y parte de su mucosa se desprende. El bazo y los riñones duplican o incluso triplican sus dimensiones y se tornan frágiles, con congestiones y hemorragias de consideración. También muchos ganglios linfáticos aparecen inflamados y se presentan petequias hemorrágicas en distintos sitios. En cuanto a la membrana de la mucosa gastrointestinal, se producen petequias y hemorragias diversas y una mucosidad que se adhiere a la membrana.

Las muestras de tejidos extraídos de los conejos infectados vienen a continuación teñidas con eosina azul de metileno. Se han detectado cuerpos de color rojo oscuro y redondos en el interior del núcleo de las células del hígado, así como en el citoplasma de alguna de ellas. Se han encontrado también en los ganglios linfáticos del brazo, en las células epiteliales de los pulmones, riñones y en los neurocitos cerebrales.

**Hemoaglutinación**

Muchos tejidos de conejos infectados pueden dar hemoaglutinación con glóbulos rojos humanos, sin diferencias en cuanto a grupo sanguíneo. Los índices alcanzan los  $10 \times 2^{10}$  y  $2^{10}$ , e incluso más, en el hígado, en el suero y en el bazo (ver fig. 1).

Los eritrocitos de pollo, oca y oveja, pueden aglutinarse con grados más bajos ( $10 \times 2^{2-4}$ ), mientras que los de otros animales (bovinos, caprinos, porcino, conejos, ratones, cobayas, patos y codornices), no se aglutinan. La hemoaglutinación se inhibe por el suero específico.

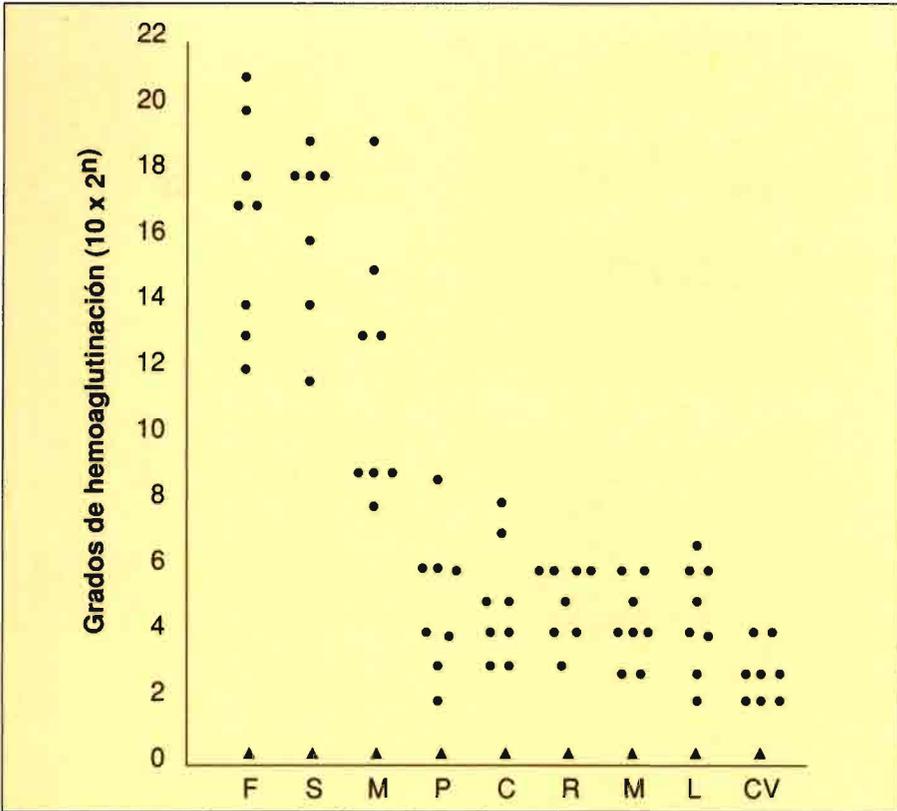


Fig. 1. Grado de hemoaglutinación de los diversos tejidos. (Leyenda: HA = hemoaglutinación (actividad de); F = hígado; S = sangre; M = bazo; P = pulmones; C = corazón; R = riñones; M = músculos; L = linfa; CV = cerebro).

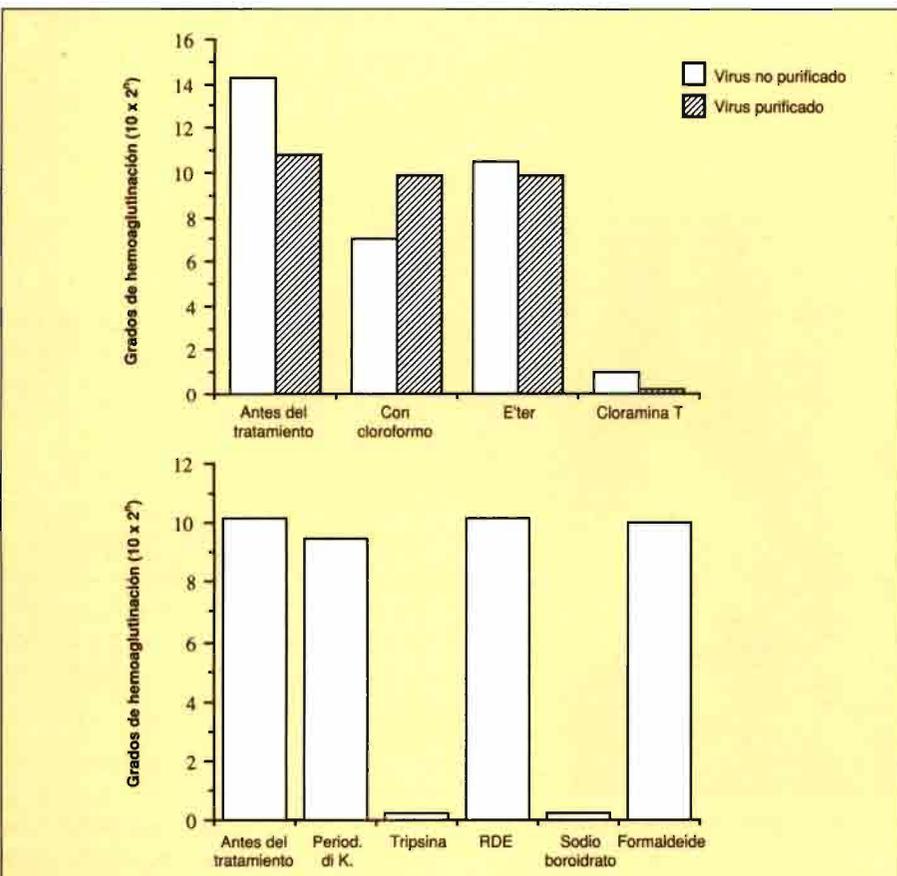


Fig. 2. Incidencia de los distintos componentes químicos en la actividad de hemoaglutinación del RHDV.

La hemoaglutinación no se ve afectada, en manera significativa, por los cambios de temperatura (de 4 a 37° C). El valor de Ph no es extremo, siendo el óptimo de 6-7.2. El virus se libera por los glóbulos rojos aglutinados con un ph de 9.2.

La actividad hemoaglutinante se destruye con la tripsina al 0,5 por 100, borohidrato de sodio al 2 por 100 o cloramina T, pero no con el R. D. E. (Receptor Destroying Enzime) o por formaldehído.

La adición de peryodato de potasio 0,1 M, cloroformo y éter, puede rebajar el grado hemoaglutinante de las muestras que contienen virus no purificados (ver fig. 2).

La actividad hemoaglutinante es bastante estable al calor. Cuando el tejido infectado se mantiene a 4° C y a 15° C durante tres meses, los grados de Ha (actividad hemoaglutinante) descienden un 2<sup>2</sup>-2<sup>4</sup> y 2<sup>4</sup>-2<sup>5</sup>, respectivamente.

Se somete al baño María a 56° C durante veinticuatro horas, el grado desciende en 2<sup>4</sup>-2<sup>6</sup>.

Después de centrifugar la emulsión de tejido infectado a 145.000 xg durante hora y media horas, no puede constatare actividad Ha en el centrifugado; mientras que la de la suspensión de las partículas aumenta a más de 10 x 2<sup>20</sup>. Esto indica que la hemoaglutinación está en conexión con la cápsula de la unidad vírica.

**Resistencia**

Las emulsiones de hígado de conejos infectados se someten al tratamiento siguiente:

1. a 50° C durante sesenta minutos;
2. en MgCl<sub>2</sub> 1M a 50° C durante sesenta minutos;
3. en solución de Hanzs de Ph 3,0 a temperatura ambiente durante treinta minutos;
4. mezclados con 20 por 100 de éter durante una noche a 4° C.

Los cuatro grupos de conejos sensibilizados pueden resistir al tratamiento de las muestras mencionadas, mientras



**Hígado de conejo atacado por MEV (enfermedad hemorrágica viral): el órgano aparece hinchado, descompuesto, cubierto de hemorragias o muy oscuro. (Material fotográfico procedente del Instituto Zooprofiláctico Experimental de la Lombardia y de la Emilia, sección de Bolonia).**

que los conejos de control, a los que se les inyectan muestras sin tratar, mueren en su totalidad. Un experimento parecido se realiza con formalina al 1 por 100, que desactiva rápidamente el virus tras una incubación de dieciséis a dieciocho horas.

**Unidad vírica**

En el microscopio electrónico se examinan secciones finas de tejidos infectados sometidos a coloración negativa. La forma del virus es icosaédrica, de 32-34 nm. de diámetro y desprovista de envoltorio. La cápsula se compone de 32 capsomeros de 5-6 nm. de diámetro. El núcleo tiene un diámetro de 19-20 nm. En solución de CsCl, el virus se desenvuelve con una densidad de flotación de 1.36-1.38 g/ml, el coeficiente de sedimentación del virus es de 116 S, calculado por medio de centrifugación en un gradiente de sacarosa, simultáneamente a un análisis con rayos ultravioletas.

**El ácido nucleico del virus**

Aplicando el método Sds-proteína-K-fenol, el ácido nucleico se extrae de los tejidos infectados y se purifica. Muestra una típica curva espectral de-

terminada mediante espectrometría de rayos ultravioletas. La proporción de absorción 260 nm/280 nm. es de 2:1 y el máximo de absorción se constata a 261 nm.

Los resultados de la electroforesis en gel de poliacrilamida y en agar demuestran que el ácido nucleico viral no es segmentado. Se tiñe de azul en el test de difenilamina y de verde en el de orceína. Se degrada completamente por DNAsas I y no por RNAsas. A.

El DNAsas si lo degrada completamente, y resiste al Alu I no se destruye por el calor, como se demuestra por la espectrometría mediante rayos ultravioletas. Se tiñe de rojo con coloración naranja intensa y la micrografía electrónica del ácido nucleico es parecida a la de una "masa colapsada". El ácido nucleico del virus altamente purificado por medio de electroforesis-electrodiálisis, se degrada con el ácido fórmico y se analiza en su composición de sus bases mediante Hplc (cromatografía líquida a alto rendimiento).

Con base al tiempo de retención, los cuatro niveles máximos de la citosina (c), guanina (G), tiamina (T) y adenina (A), aparecen en cadena por el ácido nucleico del Rhdv, como en el caso del DNA tímico del ternero, pero distinto

del Rna de la levadura, en el que la uridina (U) aparece cercana a la citosina y la tiamina no aparece (fig. 3).

Los porcentajes de los moles de las cuatro bases del ácido nucleico viral RHDV son:

$$C = 28,76 = 20,5 \quad T = 31,9 \quad A = 24 \quad Y \\ G + C = 44,2$$

El valor de C se separa de manera significativa de G, y asimismo T de A. El resultado sugiere que el ácido nucleico RHDV es semejante al DNA monocatenario de los Parvovirus (6).

Los datos obtenidos de la electroforesis en gel de agar y en la electroforesis en gel de poliácridamina urea desnaturada (page) señalan que el peso molecular del ácido nucleico es de aproximadamente  $2,4 \times 16$  dalton.

**Los polipéptidos virales**

Los virus purificados y los polipéptidos de referencia, cuyos pesos moleculares son conocidos, se someten al Sds-Page y las cadenas que se forman se tiñen con nitrato de plata. Se identifican tres polipéptidos virales, denominados Vp1, Vp2 y Vp3, con peso molecular, respectivamente, de 76.000, 62.000 y 52.000, que son semejantes al de los Parvovirus (7).

**Aislamiento y cultivo**

Se han inoculado muestras de órganos de conejos infectados (bazo, hígado,

pulmones) al 10 por 100 en diferentes cultivos celulares, incluidas las células primarias del conejo (riñones, hígado, pulmones y testículos), líneas celulares (PK-15, BHK-21, MA-104, IBRS-2, Hela y Vero) y en un tronco de células diploides (riñones de conejo). En efecto, se han realizado ensayos repetidos y cada ensayo, controlado por actividad hemoaglutinante y efecto citopático.

Ninguno de los cultivos celulares puede verse infectado, a excepción del tallo de células diploides de riñones de conejo, que denotan una CPE treinta y seis cuarenta y ocho horas después de la inoculación.

La infección se confirma por medio de Sandwich Elisa y por el test de hemoaglutinación pasiva, a pesar de la ausencia de hemoaglutinación.

Los cultivos del quinto y séptimo ensayo se inoculan respectivamente a tres conejos sensibilizados. Si bien no se obtienen señales clínicas, se observa hemoaglutinación tres días después, con valores de  $2^5$ - $2^7$ , y anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación dieciocho días después de la inoculación, con valores de  $2^8$ - $2^9$ . Estos seis conejos son capaces de resistir al tratamiento con virus fuertes, mientras que los seis de control mueren en tres días con síntomas típicos.

Tras muchos fracasos se ha abandonado el propósito de infectar a diversos roedores de laboratorio.

Suspensiones de hígado infectado, inoculadas en huevos embrionados por diversos métodos, no han señalado evidencia alguna del crecimiento del virus (7).

**Diagnosís**

Aún hoy, la hemoaglutinación y el test de inhibición de la hemoaglutinación se emplean masivamente debido a su sensibilidad, especificidad y simplicidad. La difusión en gel de agar, elisa y el test de hemoaglutinación pasiva se han empleado para poner de manifiesto el antígeno en cultivo de tejidos, y pueden utilizarse anticuerpos de enzimas para detectar el virus intracelular en las secciones de tejido y en cultivos celulares (1.4.).

**Control**

La enfermedad se transmite por contacto directo e indirecto. En ningún otro animal además de los conejos adultos y, a excepción de las liebres, se ha verificado la infección: las liebres murieron tras la infección experimental (comunicación personal), si bien no se detectaron casos de infecciones naturales. No se ha detectado transmisión vertical. La enzoótica puede controlarse inmediatamente con la descuartización y una rigurosa cuarentena acompañada de vacunación. Se ha creado una vacuna eficaz, formalinizada. Produce una fuerte inmunidad cinco días después de la inoculación, y dura no menos de seis meses. La duración de la inmunización es tan larga que raramente se coteja con otras vacunas desactivadas. Algunos datos llevan a pensar que la interferona puede tener algo que ver con esto.

**Discusión**

Con base en las manifestaciones epidemiológicas, de síntomas clínicos y alteraciones patológicas, se ha demostrado que el RHD (enfermedad hemorrágica del conejo) es una nueva enfermedad viral, jamás aparecida en China ni en otros países. Si bien detectada por primera vez en conejos de

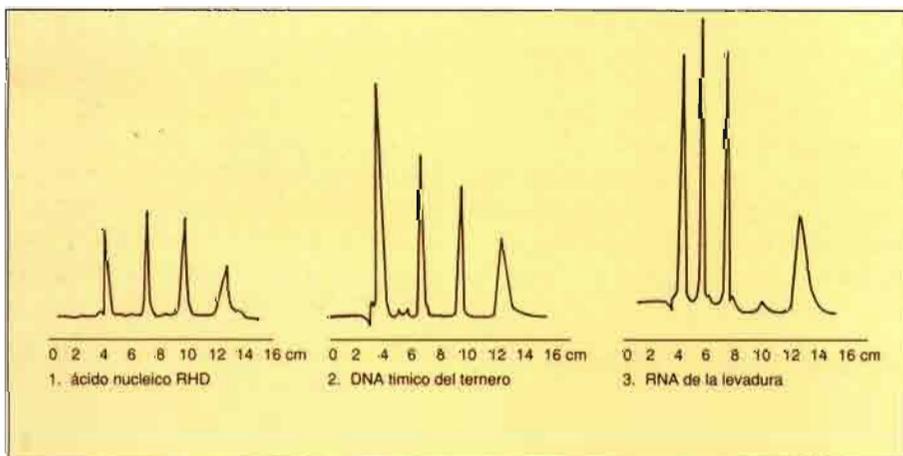


Fig. 3. Cromatograma líquido a elevado rendimiento de hidrólisis de ácido nucleico RHDV, Dna tímico del ternero y Rna de la levadura.

Angora importados de Alemania Federal, no está aún claro el origen de su agente causal. La suspensión de hígado y bazo de conejos infectados puede hemoaglutinar los glóbulos rojos de tipo humano, con valores hemoaglutinantes mucho más elevados respecto de otros virus hemoaglutinantes: la actividad hemoaglutinante asociada a la actividad viral se destruye a 50° C y Ph 3,0, pero la patogenicidad del virus no decrece en igual medida. Estas peculiares propiedades precisan de ulteriores explicaciones.

El ácido nucleico del virus es sensible al DNasa, pero resistente al RNasa; positivo al test de difenilamina pero negativo al de orceína. Esto demuestra que se trata de Dna.

Se degrada completamente con la enzima de inhibición ALU I, no se desnaturaliza con el calor, y es semejante al fagocito lambda Dna en micrografía electrónica.

Estos hechos sugieren que el ácido nucleico del Rhd (virus de la enferme-



La enfermedad se transmite por contacto directo e indirecto. En ningún otro animal, además de los conejos adultos y, a excepción de las liebres se ha verificado la infección.

dad hemorrágica del conejo) es monocatenario.

La composición base del Rhdv-Dna es muy semejante a la del Parvovirus,

pero el peso molecular es mayor (9).

En cualquier caso, se sugiere que el RHDV puede ser una nueva especie perteneciente a los Parvovirus.

## 118 FIRA DE SANT JOSEP

16 – 20 de marzo 1990

# XI CONCURSO DE INNOVACIONES EN MAQUINARIA

En el Concurso podrán presentarse todos aquellos avances tecnológicos que no hayan sido premiados en otros concursos de ámbito nacional o internacional, relacionados con la actividad agrícola-ganadera y de aplicación directa en los trabajos de explotación.

El prestigio de este Concurso incrementa, año tras año, el número y la calidad de las novedades presentadas. En esta convocatoria se han constituido los siguientes premios:

- Primer premio: Placa de Honor y 300.000 pta
- Segundo premio: Placa de Honor y 200.000 pta
- Tercer premio: Placa de Honor y 100.000 pta
- Premio Comarcal: Placa de Honor y 50.000 pta

ORGANIZACION-INFORMACION



PATRONAT  
FIRES  
DE  
MOLLERUSSA

Avgda. Canal, s/n. 2.ª planta — Xamfrà D. Cardenal — Apartat 72  
Telèfons (973) 60 07 99 – 60 34 91 — Telefax (973) 60 15 84  
25230 MOLLERUSSA (Lleida)