

ENFERMEDAD VÍRICA HEMORRÁGICA DEL CONEJO (RHD: MATERIAS INFECTANTES Y MODOS DE TRASMISIÓN

SIMÓN, M.C.*, MUGURUZA, R.*, ALONSO J.L.*, GIRONES O.*, ORTEGA C.*, MUZQUIZ J.L.*, GARCÍA J.*

Unidad de Enfermedades Infecciosas y Epidemiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177. Zaragoza 50013

Resumen: Se ha realizado un estudio de detección del virus de la RHD mediante las técnicas de Hemoaglutinación y ELISA en secreciones oro-respiratorias y excrecciones (orina y heces), procedentes de animales infectados experimentalmente. Parte de las muestras oro-respiratorias han resultado positivas con ambas técnicas mientras que la orina y heces fueron negativas.

Cuando se realizó la inoculación experimental extractos preparados a partir de estas mismas heces y orina en conejos sensibles se logró reproducir la Enfermedad Vírica Hemorrágica con similares características a las que presenta en la infección natural.

Paralelamente se realizó una inoculación intragástrica en diez conejos mediante una suspensión obtenida a partir de un extracto de hígado procedente de conejo infectado con el virus de la Enfermedad Vírica Hemorrágica. Los conejos así inoculados han presentado el mismo cuadro clínico que se observa en la forma natural de la enfermedad y han transmitido la infección por aerosol a conejos testigo colocados próximos a ellos.

Estos resultados demuestran la importancia de las secreciones oro-respiratorias, de la orina y de las heces en la transmisión de la RHD así como la efectividad de la vía digestiva en su reproducción.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Vírica Hemorrágica del Conejo (RHD) es una de las últimas enfermedades infecciosas aparecidas dentro de la patología animal. Es una enfermedad extraordinariamente difusible, puesto que en pocos años se ha extendido por cuatro continentes: Asia, Europa, América y África. La primera descripción fue hecha en 1984 en China (13), en Europa se observó por primera vez en 1986 y en los años siguientes se describió en la mayoría de los países (2, 10, 15, 16, 25, 26). En España se diagnosticó por primera vez en 1988 (1).

Su etiología ha sido ampliamente discutida desde los primeros momentos de su aparición en Europa. En un principio, para algunos autores se trataba de una carencia de tipo nutricional o de intoxicación por metales pesados procedentes de vertidos industriales o pesticidas (2,16), también se ha considerado la posibilidad de que la enfermedad existiese en Europa desde mucho antes a lo descrito, y hubiese pasado desapercibida por haberse enmascarado su diagnóstico achacándolo a otros procesos (2, 22). La RHD está producida por un virus esférico, de simetría icosaédrica y desprovisto de envoltura (6) la mayoría de los autores observan un diámetro externo de 30-35 nm, presenta en su superficie formaciones en forma de cálices (4, 6, 11, 17, 20) y posee una fuerte capacidad hemoaglutinante para hematies humanos (13, 21).

Su clasificación ha sido controvertida, ya que los autores chinos han defendido reiteradamente que se trataba de un parvovirus (10, 27), mientras que en Europa se le ha considerado un Calicivirus (4, 17, 20, 25). En recientes estudios, los autores chinos han reconocido que se trata de un Calicivirus, (19).

La RHD mantiene todavía muchos aspectos desconocidos tanto en lo que se refiere a su origen, agente etiológico, características epidemiológicas y patogenia. El modo de transmisión, las materias infectantes o las vías de entrada del virus de la RHD son aspectos epidemiológicos desconocidos que deben de ser desvelados para conseguir mejorar los resultados de la aplicación de las medidas profilácticas que conduzcan al control de la enfermedad en los conejos. La observación de casos de infección natural inducen a pensar que la vía aerógena o respiratoria sería un modo de transmisión predominante en explotaciones

intensivas (23). sin embargo tambien se ha sospechado que la transmisión se puede producir a través del alimento contaminado con secreciones o excrecciones procedentes de conejos infectado (16).

Nuestras experiencias tienen como objetivo el determinar si la secreciones oro-respiratorias, la orina y las heces de los animales infectados contienen el virus de la RHD y si son capaces de reproducir la infección en animales sensibles, así como comprobar si la vía digestiva permite reproducir la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Hemos utilizado 37 conejos de raza Neozelandés, (*Oryctolagus cuniculus*), de 12 semanas de edad, procedentes de una explotación cunícola convencional. Todos los conejos carecían de anticuerpos frente al virus de la Enfermedad Vírica Hemorrágica (RHD), demostrado por la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación, (IHA).

Virus

El virus virulento utilizado para la inoculación por vía intragástrica se obtuvo a partir de conejos infectados experimentalmente de RHD. Se utilizó el hígado como fuente de virus dado su alto título hemoaglutinante. Para la elaboración del inóculo se hizo un triturado de una suspensión del órgano en tampón fosfato (PBS, pH=7,2), que posteriormente fue sonicado (1 minuto a 30 W de potencia) y centrifugado a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos, el sobrenadante fue filtrado a través de membrana de 22 μ , titulado por Hemoaglutinación (HA) diluyéndose en PBS para obtener 64 Unidades Hemoaglutinantes (UHA).

Técnicas empleadas:

Técnica de Hemoaglutinación, (HA), (21): Las muestras (hígado, bazo u otras), fueron diluidos en la proporción 1/3 (p/v) con PBS de pH 7,2 y triturados. Posteriormente se sonicó durante 1 minuto a 30 W de potencia en baño de hielo. Tras el centrifugado de la muestra (3.000 rpm durante 10 minutos), el sobrenadante se utilizó para el diagnóstico. Se han utilizado hematíes del grupo 0 humanos diluidos al 1% en PBS, con un 0,1% de seroalbúmina bovina. A 50 μ l de cada una de las diluciones del extracto se añadían 50 μ l de los hematíes al 1%. La incubación se efectuaba a 4^o C durante al menos 2 horas. La inversa de la última dilución positiva es el título en Unidades Hemoaglutinantes (UHA).

La técnica de *Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA)* se realizó con diluciones seriadas del suero enfrentadas al antígeno obtenido de extracto hepático conteniendo 8 UHA/50 μ l.

Técnica ELISA, (5): Se utilizó suero hiperinmune frente a virus RHD para el tapizado de la placa y anticuerpos monoclonales, (1H8 y 6G2 frente a epitopos externos e internos del virus de la RHD), unidos a la enzima peroxidasa de modo que la reacción se revela seguidamente por la adición del substrato orto-phenilen-diamina. Las muestras positivas mostraban densidades ópticas alrededor de 0,8 tras la lectura en espectrofotómetro Flow a una longitud de onda de 492 nm.

Esquema de la Experiencia

Se utilizaron 7 conejos adultos inoculados experimentalmente con virus de la RHD por la vía intramuscular (IM). Se recogieron muestras de la secreción nasal, (N) y orofaríngea, (OF), diariamente, desde el día de la inoculación (día 0^o) hasta el día 14^o post-inoculación, empleando para ello hisopos estériles. Tras la muerte de los conejos se procedió a la toma de muestras de exudado traqueal. Las muestras fueron mantenidas en refrigeración en tubos estériles con 0,5 ml. de un tampón PBS 1 M (pH=7,2) adicionado con antibióticos, hasta su estudio por HA y ELISA.

Las muestras de orina y heces procedían de conejos inoculados experimentalmente. Las heces fueron diluidas en PBS 1M (pH=7,2) al 50% trituradas y sonicadas durante 1 minuto a 30 W de potencia y se centrifugaron 30 minutos a 10.000 g, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,22 μ . La orina fue centrifugada durante 30 minutos a 4.000 r.p.m., y el sobrenadante fue posteriormente filtrado por membrana de 0,22 μ .

Inoculación experimental:

1) *A partir de suspensión de heces:* Tres conejos adultos situados en jaulas individuales y aisladas entre sí fueron inoculados por vía intramuscular con 1 ml de la suspensión de heces. Tres conejos más fueron inoculados con suspensión de heces de conejo sano preparadas de igual modo que las heces anteriores, como testigos de las heces por sí mismas. Otros 3 conejos se colocaron en proximidad de algodones embebidos en la suspensión de heces situadas junto al pienso, sin que pudiera ser ingerido por los animales.

2) *A partir de suspensión de orina:* 3 conejos en condiciones similares a las anteriores fueron inoculados con la orina de conejos infectados por la vía intramuscular y otros 3 conejos con orina procedente de animales sanos tratada de igual forma.

3) *Inoculación vía intragástrica:* Diez conejos fueron inoculados con 1 ml de la suspensión de virus RHD que contenía 64 UHA vía intragástrica (inyección directa del inóculo en cavidad gástrica, IG). Se dispusieron dos conejos testigo sin inocular en jaulas independientes separadas pero próximos a los conejos inoculados.

Otros dos conejos fueron desafiados vía intramuscular con 1 ml del mismo inóculo utilizado anteriormente, para comprobar su virulencia.

Se realizó la observación clínica diaria tras la inoculación. Los conejos que sobrevivieron más de 14 días post-inoculación fueron sacrificados. En todos los conejos se recogió el hígado para su diagnóstico por HA.

Paralelamente se realizaba una extracción de sangre los días 0º, 7º y 14º p.i., para realizar posteriormente el análisis serológico mediante la prueba de IHA.

RESULTADOS

Estudio de exudados nasales, orofaríngeos y traqueales mediante las técnicas de HA y ELISA.

Mediante la prueba de HA no se ha observado ningún orden en la aparición de las muestras nasales positivas ya que hemos encontrado muestras positivas en el día 0º (día de la inoculación), 2º y 8º postinoculación, (pi), mientras que las muestras positivas de exudados orofaríngeos, (OF), se han observado entre el 1º y 5º día pi., (Tabla 1). Ocho de las muestras OF y N diagnosticadas inicialmente mediante HA, se consideraron con reacción inespecífica al realizar la técnica ELISA.

Mediante la técnica ELISA la muestra orofaríngea del conejo nº 6 ha dado reacción positiva frente a los dos monoclonales, las del nº 3, 4 y 8 dieron reacción negativa aunque hubieran dado reacción positiva en HA. En sentido contrario, todas las muestras de tráquea estudiadas en ELISA han dado reacción positiva aunque hubieran dado negativo en HA, (conejos nº 1 y nº 2), los conejos nº 7 y 8 no fueron estudiados por esta técnica puesto que permanecieron vivos más allá de los 14 días pi, (Tabla 2.), El conejo nº 6 murió a los 20 días pi y su tráquea dió reacción positiva.

Las muestras de exudados nasales dieron reacción negativa en ELISA.

En ninguna de las muestras de orina y heces se observó positividad mediante la técnica de HA y ELISA.

Inoculación de suspensión de heces procedentes de conejos infectados experimentalmente de RHD

La inoculación por vía IM, de 3 conejos con el extracto filtrado de heces que habían dado HA y ELISA negativo, provocó la muerte de uno de ellos en el 2º día pi, con cuadro típico agudo de RHD. La HA de hígado y bazo del conejo resultó positiva, (4096 UHA). El 2º y 3º conejo inoculados por vía IM desarrollaron una alta respuesta en anticuerpos detectados por IHA (10240 UIHA), (Tabla 3).

De los conejos que vivieron en proximidad del algodón impregnado con la suspensión de heces dos de ellos desarrollaron el cuadro típico agudo que le ocasionó la muerte al 3º y 4º día de exposición. El conejo que no murió presentó respuesta en anticuerpos frente a RHD (Título 640 UIHA), (Tabla 3).

Inoculación de suspensión de orina de conejos infectados experimentalmente de RHD

La orina negativa en HA y ELISA inoculada por vía IM en 3 conejos, provocó la muerte de dos de ellos con el cuadro clínico típico de RHD al 5º día p.i., el tercero murió a los 15 días p.i.. Los títulos detectados en el extracto hepático de los tres conejos fue igual o superior a 4096 UHA, (tabla 3).

Inoculación de suspensión de hígado de conejos infectados experimentalmente de RHD por vía Intragástrica (IG), (Tabla 4).

De los 10 conejos inoculados por vía IG, 1 murió con un cuadro sobreagudo de RHD a las 24 h pi, 5 murieron a las 48 h pi, el séptimo murió con cuadro agudo a las 72 h y un octavo a las 96 h pi. el noveno de ellos desarrolló una forma clínica de hepatitis subaguda, a las 24 h pi dejó de comer, estaba triste y apenas defecaba. Esta situación la mantuvo durante una semana, su orina presentó bilirrubina y hemoglobina. Al séptimo día comenzó una recuperación clínica comenzando a comer y beber y aumentando el número y cantidad de deyecciones y la micción. El 8º día post-inoculación mejoró, la orina no presentaba bilirrubina y solo se detectaron bajos niveles de hemoglobina. a partir de ese momento la recuperación clínica fue total y presentaban una alta tasa de anticuerpos IHA.

El último de los 10 conejos no manifestó sintomatología y desarrolló una alta tasa de anticuerpos a los 14 días de la inoculación IG (título 20480 UIHA).

Los dos conejos inoculados por la vía IM con el mismo inóculo desarrollaron cuadros sobreagudos y murieron dentro de las 48 h post-inoculación.

El conejo testigo próximo al que desarrolló la forma de hepatitis subaguda murió al 2º día con un cuadro agudo de RHD. El segundo conejo testigo presentó síntomas de RHD al 5º día de permanencia junto a los conejos inoculados y murió a las 48 h..

DISCUSIÓN

Hemos observado que el virus de la RHD es excretado con las secreciones oro-respiratorias y ha sido detectado mediante Hemoaglutinación y ELISA. El hecho de no detectarlo de forma constante podría ser debido a que la excreción es intermitente, a que la toma de muestras no es la más adecuada para conseguir cantidades apreciables de virus, o a una especial labilidad del virus en ese tipo de excrecciones. Nosotros consideramos que estas dos últimas opciones parecen las más probables, e incluso el hecho de que la técnica de ELISA solo detecte positividad con el monoclonal 6G2 en algunas de estas muestras, podría indicar que se puede estar produciendo un proceso más o menos rápido de degradación del virus en esas muestras, hecho que ha sido sospechado por algunos investigadores, (5).

Estas excrecciones puede ser la principal fuente de virus en una explotación industrial, en la que la ventilación forzada produce el movimiento de aire continuo, y por otra parte los conejos conviven hacinados, por lo que se ve muy favorecida la transmisión vía aerógena con la respiración, estornudos, etc.. Anteriormente a nuestra experiencia, la vía aerógena ha sido observada en numerosas ocasiones, tanto de forma experimental como en casos de infección natural (3, 17, 24, 28), aunque no se había realizado ningún estudio de demostración de la presencia del virus en la secrecciones respiratorias.

A pesar de que el virus de la RHD no ha sido detectado en las heces ni en la orina por las técnicas de HA y ELISA, hemos comprobado que está presente en ambas dado que es posible reproducir la enfermedad en conejos sensibles a partir de ellas. Estos resultados nos hacen pensar en la posibilidad de que las partículas víricas de RHD contenidas en las heces y orina o bien se encuentran en concentraciones muy bajas, o bien han sufrido un proceso de degradación que impide su detección por HA y ELISA. Sin embargo, y aunque las técnicas "in vitro" no los detecten, los hechos nos indican que ambos tipos de excrecciones contienen el virus de la RHD con capacidad infectante, esta sospecha derivada de la observación de la infección natural no había sido demostrada con anterioridad a nuestra experiencia, (3, 7, 12, 14, 18, 24, 28).

Otro dato que se deduce de la experiencia es que las heces y la orina provocan la infección por vías parenterales, pero también hemos observado que la proximidad a suspensiones de las heces virulentas producen la infección por contacto directo o por aerosol. Esta modalidad de infección podría tener un papel importante en la transmisión de la RHD entre los conejos silvestres y conejos domésticos de explotaciones rurales con yacijas permanente. Sin embargo, en explotaciones industriales en las que los conejos no pueden

tener contacto con las excreciones puesto que caen al foso de deyecciones, estas fuentes no representan un riesgo grave de trasmisión. Este hecho lo hemos comprobado al mantener a un conejo sano en una jaula elevada sobre deyecciones procedentes de otros conejos que excretaban el virus en las heces. También es posible que las heces secas no transmitan el virus con facilidad

Respecto a la vía intragástrica, hemos observado que resulta eficaz para reproducir la enfermedad, lo que indica que el virus de la RHD mantiene su viabilidad después del proceso de la digestión.

En los primeros años tras la aparición de la RHD, Fiore (8) y Galassi (9) realizaron un estudio epidemiológico sobre la evolución que había tenido la enfermedad en una explotación y llegaban a la conclusión de que la única vía de entrada de la infección en la explotación tenía que haber sido a través del forraje contaminado, en esas publicaciones solamente se pudo suponer que la vía digestiva podría haber intervenido en el desarrollo del proceso, sin embargo no se pudo demostrar fehacientemente. En nuestra experiencia hemos confirmado experimentalmente esta sospecha, si bien creemos que una vez que la RHD se ha presentado en una explotación industrial, la vía más efectiva en la difusión de la RHD es por aerosol.

Por el contrario, en condiciones de vida silvestre o en pequeñas explotaciones familiares pensamos que tanto la vía aerosol como la vía digestiva pueden tener similar importancia en la difusión y transmisión de la RHD.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los fondos del proyecto GAN89/0168 concedido por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. Agradecemos al Dr. L. Capucci, A. Lavazza y De Simone pertenecientes al Istituto Zooprofilattico Sperimentale de Brescia (Italia), la ayuda material y técnica prestada mediante la cesión desinteresada de los reactivos para la realización de la técnica ELISA. Agradecemos al Laboratorio Regional Pecuario de Zaragoza su colaboración en el mantenimiento y alojamiento de los animales dedicados a las inoculaciones experimentales.

Referencias

1. Arragüello, J.L., Llanos, A., Perez-Ordoyo, L.I. Enfermedad vírica hemorrágica del conejo en España. *Med. Vet.* 5, (12): 645-650, 1988.
2. Cancelloti, F.M., Villeri, C., Renzi, M., Monfredini, R. La Malattia "X" nel Coniglio. *Rivista di Coniglicoltura*, 25, (9), 41-46, 1987.
3. Cancelloti, F.M., Renzi, M. Epidemiology and current Situation of Viral Haemorrhagic Disease of Rabbits and the European Brown Hare Syndrome. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 10, (21): 409-421, 1991.
4. Capucci, L., Scicluna, M.T., A. Lavazza, A. Brocchi, E. Purification and characterization of the causative agent of Viral Haemorrhagic Disease of Rabbits. *Selezione Veterinaria*, 30, (3): 301-312, 1990.
5. Capucci, L., Scicluna, M.T., Lavazza, A. : Diagnosis of Viral Haemorrhagic Disease Virus of Rabbits and the European Brown Hare Syndrome. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 10, (2): 347-370, 1991.
6. Deng, R.F., Xu, W., Du, N. Characteristic of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2: 110-114, 1987.
7. Du, N.X. Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) a new disease and its viral etiology. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 97: 114-116, 1990.
8. Fiore, G.L., Lavazza, A. Malattia Virale Emorragica del Coniglio. Situazione sanitaria e ricerca nei paesi membri C.E.E. *Progr. Vet.* 44: 414-416, 1989.
9. Galassi, D., Semprini, P., Di Emidio, P., Nucci, D. Malattia Emorragica Virale del Coniglio : Epidemiologia e Diagnosi. *Rivista di Coniglicoltura*. 9: 43-47, 1989.
10. Gregg, D.A., House, C. Necrotic Hepatitis of Rabbits in Mexico: A parvovirus. *Vet. Rec.*, 125: 603-604, 1989.
11. Kim, B.H., Lee, J.B., Song, J.Y., An, S.H., Chung, J.S., Cho, Y.J. : Studies on Picornavirus haemorrhagic fever (tentative name) in rabbits, 2. Development of inactivated vaccine. *Res. Rep. Rural Dev. Adm. (Suweon)*, 31, (1): 7-11, 1989.

12. Lavazza, A., Scicluna, M.T., Corradini, L. Barigazzi, G., Cammi, G., Cappuci, L. Diagnostic procedures for european brown hare syndrome (EBHS): application in epidemiological surveys in two italian regions. *International Conference on Wildlife Diseases*, Berlin, G.D.R. 6-11 August, 1990.
13. Liu, S.J., Xue, H.P., Pu, B.Q., Quian, N.H. A new viral disease in rabbits. *Animal Husbandry and Vet. Med.*, 16, (6): 253-255, 1984.
14. Loliger, H.C., Eskens, U. Incidence, epizootiology and control of Viral Haemorrhagic Disease of Rabbits and the European Brown Hare Syndrome in Germany. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 10, (2): 423-434, 1991.
15. Marcato, P.E. Hepatitis Necrotica Infeccciosa del Conejo : perfil patógenico de una nueva enfermedad. *Rivista di Coniglicoltura*, 25, (9), 59-64, 1988.
16. Morisse, J.P. Le syndrome Septicémie Hemorragique chez le lapin: premières observations en France. *Le Point Vétérinaire*. 20, (117): 79-83, 1988.
17. Ohlinger, V.F., Haas, B., Meyers, G., Weiland, F. Thiel, H.J. Identification of the virus causing Rabbit Haemorrhagic Disease. *J. Virol.*, 64 (7): 3331-3336, 1990.
18. Ohlinger, V.F., Haas, B., Thiel, H.J. Rabbit Haemorrhagic Disease, (RHD): Characterization of the causative Calicivirus. *Vet. Res. Commun.*, 24: 103-116, 1993.
19. ParK, J.H., Ochiai, K., Itakura, C. Aetiology of rabbit haemorrhagic disease in China. *Vet. Rec*, 133: 67-69, 1993
20. Parra, F., Prieto, M. Purification and characterization of a Calicivirus as the causative agent of a lethal haemorrhagic disease in rabbits. *J. Virol.*, 64 (8): 4013-4015, 1990.
21. Pu, B.Q., Quian, N.H., Lui, S.J. Micro HA and HI test for the detection of antibody titres to so-called haemorrhagic pneumonie iun rabbits. *Chinese Journal of Veterinary Medecine*, 11, (10): 16-17, 1985.
22. Rodak, L., Smid, B., Valicek, L., Vesely, T., Stephanek, J., Hampl, J., Jurak, E. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of antibodies to Rabbit Haemorrhagic Disease virus and determination of its major structural proteins. *J. Gen. Virol.*, 71: 1075-1080, 1990.
23. Rosell, J.M., Badiola, J.I., Badiola, J.J. Maladie Hémorragique Virale (VHD) du lapin. Epidemiologie et Contrôle. *Cuniculture*, 17 (1): 21-26, 1990.
24. Schirrmeier, H., Granzow, H., Bergmann, H. Schülter, H. Experimentelle Untersuchungen zur hämorrhagischen Septikämie der Kaninchen. *Monatsh. Veterinärmed.*, 45: 193-197, 1990.
25. Smid, B., Valicec, L. Stepanek, J., Jurak, E. Rodak, L. Experimental transmission and Electron Microscopic demonstration of the virus of Haemorrhagic Disease of Rabbits in Czechoslovakia. *J. Vet. Med. Ser.B*, 36, (3): 237-240, 1989.
26. Soike, D., Wilfe, I., Tutte, B., Stropp, M. Rösler, D., Rummeler, H.J., Richter, W., Werdier, H., Schlüter, H. Böhme, R. : Erste Einfahrungen bei der Diagnostik und Bekämpfung der Hämorrhagischen Septikämie der Kaninchen im Bezirk Potsdam. *Monatsh. Veterinärmed.*, 44: 376-378, 1989.
27. Xu, W.Y., Du, M.X., Liu, S.J. Un virus parvo-like isolato delle Malattia Emorragica del Coniglio. *Rivista di Coniglicoltura*, 26 (9): 25-29, 1989.
28. Xu, W.Y., : Viral Haemorrhagisc Disease of Rabbits in the Peoples's Republic of China: epidemiology and virus characterization. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 10 (2): 393-408, 1991.

Tabla 1: Resultados de la HA de muestras nasales, orofaríngeas y traqueales de conejos inoculados experimentalmente con virus de la RHD.

Nº	0º pi	1º pi	2º pi	5º pi	6º pi	8º pi	9º pi	15º pi
1	-	#TR-						
2	N+ OF-	#TR-						
3	N+OF-	N-OF+ #TR+						
4	-	N-OF+?	#TR+					
5	-	-	-	-	-	-	-	-**
6	-	N-OF+	N-OF+	N-OF+	-	-	-	-*
7	-	N-OF+	N+ OF+?	N-OF+	-	N-OF+?	N-OF+?	N- OF+?*
8	-	-	N-OF+?	N-OF+	N-OF+?	N+OF+?	-	-*

#: Día de la muerte; *: vivieron más de 14 días tras la infección; **: No desarrolló la infección tras la inoculación; ?: reacción inespecífica; N: nasal; OF: orofaríngea; TR: traqueal.

Tabla 2: Secreciones positivas en la prueba ELISA

Nº y muestra	1H8*	6G2*
1/OF	-	+
5/OF	-	+
6/OF	+	++
7/OF	-	++
1/TR	+	++
2/TR	-	++
3/TR	+	++
4/TR	+	++
6/TR	+	++

OF: exudado orofaríngeo; **TR:** exudado traqueal; *****: resultado expresado como porcentaje de reacción respecto a la D.O. del control positivo.

Table 3: Evolución de los conejos inoculados con heces y orina de conejos infectados de RHD.

Conejo	2ºpi	3ºpi	4ºpi	5ºpi	14ºpi	15ºpi
H/IM						
1	M					
2					10240*	
3					10240*	
H/Ct.						
4		M				
5			M			
6					640*	
H/C						
7						Sano
8						Sano
9						Sano
O/IM						
10				M		
11				M		
12						M
O/C						
13						Sano
14						Sano
15						Sano

C: controles; Ct.: en contacto; H: heces; IM: intramuscular; M: Muerte; O: orina; pi: día postinoculación; *: Unidades Inhibidoras de la Hemoaglutinación.

Table 4: Evolución de los conejos inoculados por vía intragástrica con virus de la RHD.

Conejos	1ºpi	2ºpi	3ºpi	4ºpi	7ºpi	14ºpi
1	M					
2		M				
3		M				
4		M				
5		M				
6		M				
7			M			
8				M		
9	Hepatitis					10240 UIHA
10						20480 UIHA
CD-1		M				
CD-2		M				
C-1		M				
C-2						Sano

C-1 and C-2: conejos no inoculados en proximidad a inoculados; CD-1 and CD-2: control del virus de desafío; UIHA: Unidades Inhibidoras de la Hemoaglutinación. M: Muerte; pi: día postinoculación.

