

Enfermedad hemorrágica del conejo: Primer diagnóstico en el Uruguay

Capano, F.¹; Paullier, C.¹; Easton, M.C.¹; Guarino, M.H.²; Pereyra, E.³; Fernández, A.³; Aguirre, O.³; Días, L.E.³; Seoane, L.³

RESUMEN

Se estudia la aparición de una epidemia en conejos de criaderos familiares, hasta ahora desconocida en el país. Los casos clínicos presentan un período de incubación muy corto y una evolución rápida con muerte entre 24 y 48 horas. Se procesan animales enviados a la DILAVE para su diagnóstico provenientes de dos departamentos (Montevideo y Canelones), así también especímenes inoculados experimentalmente. Los síntomas y lesiones macro y microscópicas observados son compatibles con EHC, la cual es confirmada por estudios virológicos (DILAVE y Centro de Referencia para EHC en Brescia, Italia).

El presente trabajo tiene por finalidad comunicar la presencia de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo (EHC) por primera vez en Uruguay.

Palabras Clave: *Lepóridos, Enfermedades causadas por Calicivirus, EHC.*

SUMMARY

An epidemic disease in rabbits unknown in the country is studied. Clinical cases shows very short incubation period and sudden death between 24 - 48 hrs. Rabbits from two regions (Montevideo, Canelones) sent to DILAVE for diagnosis, and animals from experimental inoculation was carried out. Based on clinical and pathological findings RHD was suspected. The disease was confirmed by laboratory studies at DILAVE and RHD/OIE Reference Laboratory, Brescia, Italy.

The objective of this paper is to notify the presence of RHD for the first time in Uruguay.

Key Words: *Leporids, Calicivirus diseases, RHD.*

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Hemorrágica del Conejo (EHC) es causada por un calicivirus específico (Familia *Caliciviridae*, Género *Lagovirus*). Si bien al principio se aislan varias cepas de un mismo serotipo, es a partir de 1998 en Italia (4,5,10) y en 1999 en Alemania (10,11) que se diagnostican cepas antigénicamente consideradas como variantes (RHDVa).

Es una enfermedad altamente contagiosa, aguda y de alta mortalidad del conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) cuando se introduce por primera vez en una población susceptible (10).

Se diagnostica por primera vez en la República Popular China en 1984 (8), expandiéndose luego a Corea y otros países de Asia, reconociéndose posteriormente en Italia y otros planteles cunícolas del continente europeo (1988-1998). Del mismo modo, se detecta en diversos países africanos y Oceanía. Cabe señalar que es introducida por el hombre en

Australia y Nueva Zelanda con la finalidad de controlar los daños ocasionados por conejos silvestres (6,10).

Con respecto al continente americano, se evidencia en Cuba en varias oportunidades (la última en 2004), México (1988, 1990) y EUA en el año 2000 (5). En América del Sur hasta la presente comunicación es considerada una enfermedad exótica, no habiendo sido reportada por ningún país.

El presente trabajo tiene por finalidad comunicar la presencia de la EHC por primera vez en Uruguay (7).

MATERIALES Y MÉTODOS

Datos epidemiológicos

El caso índice se presentó en el Laboratorio de Diagnóstico el día 16/11/04 en horas de la mañana. En el mismo día se presentan otros tres casos clínicos similares de una zona aledaña a la primer consulta. Los casos llegados al laboratorio

provenían de criaderos familiares y en ninguna oportunidad procedían de establecimientos industriales.

El motivo de consulta fue la súbita mortandad de animales y la forma clínica sobreaguda o aguda que presentaban.

En la anamnesis no se encontró datos comunes a saber: alimentación, suplementación, tipos y formas de tratamiento médicos efectuados. Los casos clínicos provenían de dos zonas del Departamento de Montevideo (Paso de la Arena, Lezica) y posteriormente se extendieron a otros barrios del Departamento y al Departamento vecino (Canelones).

Síntomas/Signos

Los animales recibidos en el laboratorio, presentaban la forma clínica sobreaguda o aguda que se caracterizaba por anorexia, depresión del sensorio, astenia y conjuntivitis sero-mucosa (discreto corrimiento). Con respecto a los signos neurológicos se destacaban las convul-

¹ Departamento de Patobiología, DILAVE "M.C. Rubino" (MGAP), Ruta 8, km 17.500, 12100 - Montevideo, Uruguay. E-mail: meta@adinet.com.uy

² Unidad de Biotecnología Molecular; DILAVE "M.C. Rubino" (MGAP).

³ División de Sanidad Animal. (MGAP).

Recibido: 02/05/05

Aprobado: 08/06/05

siones repentinas, opistótonos, ataxia, ataxia, paresia y parálisis locomotriz. Relativo a los signos respiratorios se pudo observar disnea, epistaxis, conjuntamente con una cianosis de mucosas aparentes y en ocasiones, rectorragia al final del curso evolutivo de la enfermedad.

Asimismo, en casi todos los casos clínicos vistos, la muerte ocurría emitiendo los animales afectados un fuerte "chillido" terminal.

El período de incubación (P.I.) variaba entre 24 y 72 horas y la mayoría de los conejos adultos morían en 24-48 horas después del comienzo de los síntomas (período de presntencia).

En los focos iniciales no se afectaban gazapos ni ejemplares de menos de 2 meses de edad (se verificaron pocas excepciones a este comportamiento epidemiológico).

Anatomía patológica

Se efectuaron necropsias de conejos enviados al Departamento de Patobiología y los animales inoculados según técnicas clásicas.

Estudios histopatológicos

Para realizar los estudios histopatológicos se fijaron en formol bufferado al 10% muestras representativas de hígado, pulmón, timo, corazón, bazo y riñón. Luego las piezas fueron incluidas en parafina y cortadas a 3 micras de espesor. Todos los cortes fueron teñidos con la técnica de rutina de Hematoxilina y Eosina (H-E).

Por este método se estudiaron muestras provenientes de 10 animales de casos de campo y 2 animales en los que se había realizado la inoculación experimental.

Diagnóstico diferencial

En primera instancia se realizaron pruebas bacteriológicas para descartar Pasteurellosis, Enterotoxemia y Salmonelosis de forma clínica aguda (Departamento de Bacteriología).

Del mismo modo, se descartó Mixomatosis en su forma clásica clínicamente, teniendo en cuenta la presentación de los casos reportados en nuestro medio (1974-2004)(1) (Casuística de la DILAVE "M.C.Rubino").

Así también se realizaron estudios toxicológicos para descartar muertes súbitas debidas a Micotoxicosis (Sección Toxicología).

Reproducción experimental de la enfermedad

Animales: Se inocularon 2 conejos (macho y hembra) pertenecientes al plantel de la DILAVE con una edad de 8 meses y un peso superior a los 4 kg. Dichos animales fueron inspeccionados y manejados de acuerdo con los protocolos sanitarios de la Institución. Como testigos o controles sanos, se dejó una camada de 8 conejos de la misma edad y peso aproximados, mantenidos en las mismas condiciones ambientales.

Inóculo: Se efectuó un triturado al 10 % de hígado y bazo de los animales con síntomas y recientemente muertos remitidos al laboratorio (No 4164 y 4172). Para la realización del inóculo se empleó un diluyente universal (PBS) más el agregado de antibióticos (Pen./Est.), dejándolos actuar por una hora a 4-8° C. Posteriormente la muestra fue centrifugada y procesada según técnica de referencia (10).

Vías y dosis: La dosis empleada fue de 1.0 ml dividida en 3 vías a saber: subcutánea (0.5 ml), instilación nasal (0.25 ml) y oral (agua de bebida, 0.25 ml).

Estudios virológicos - (DILAVE)

Técnica de Hemoaglutinación: Para identificación del agente se utilizó la técnica de hemoaglutinación (HA) de acuerdo a las recomendaciones de la OIE (Manual of Standards)(10).

Se utilizó sangre tipo O extraída con solución de Alsevers y lavada con 0.85% de PBS a pH 6.5. Los eritrocitos lavados fueron suspendidos al 0.8 % en PBS para ser utilizados en la técnica. Diluciones crecientes de un homogeneizado al 10% de hígado de animales que presentaron la sintomatología descrita, fueron realizadas en microplacas de fondo en U, en duplicado en base 10. Las diluciones fueron enfrentadas con igual volumen de la suspensión de eritrocitos, y cada placa fue incubada a diferente temperatura, una a 4° C y otra a 25° C. El tiempo de incubación quedó determinado cuando la sedimentación de eritrocitos fue completa en el pocillo control.

Estudios virológicos - (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Brescia- Italia)

Muestras: Se enviaron 4 muestras de hígado y bazo y 6 sueros para diagnóstico, pertenecientes a 2 criaderos afectados por la presunta EHC.

a) Detección de antígeno viral - Con los materiales sólidos se emplearon la técnica de ELISA sandwich (estándar) específica para el virus de EHC en primera instancia, y un posterior ELISA sandwich con un panel de 14 Anticuerpos monoclonales (Acm). (5,10).

b) Detección de anticuepos - Con los 6 sueros enviados, se realizaron la técnica de ELISA de competición (estándar) para la detección de Ig antiviral de la EHC (10) y un ELISA indirecto para poner de manifiesto la presencia de cada clase de Ig -IgG, IgM e IgA (5).

RESULTADOS

Macroscopía

En el estudio macroscópico se destacaron las lesiones a nivel hepático (hepatomegalia, coloración ocre y/o pálida del órgano y un aspecto reticulado en nuez moscada) (Fig. 1). Se observaron petequias y equimosis en el timo, tráquea, miocardio, riñón y pulmón (Fig 2). El timo además presentaba severa hipertrofia. Se observó una esplenomegalia marcada y coloración oscura del órgano.

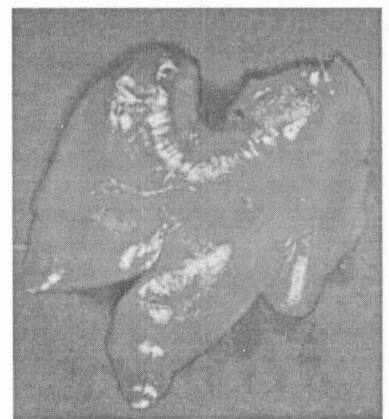


Figura 1. Hígado: se observa una hepatomegalia y cambio de coloración (ocre) con aspecto reticulado.

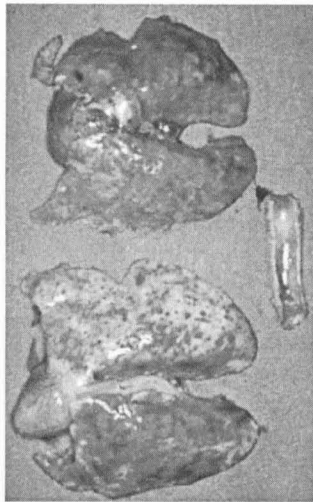


Figura 2. Pulmón y tráquea: En ambos pulmones y en la tráquea se observan petequias y hemorragias difusas.

Histopatología

Al estudio histopatológico se observó en pulmón edema y congestión alveolar, proliferación del epitelio bronquial e hiperplasia de la capa media de arteriolas. A nivel hepático se destacó severa necrosis hepatocítica con distribución difusa (Fig 3), proliferación canalicular y moderada infiltración centroacinar. En las muestras de bazo se observaron necrosis focal y depleción linfocitaria. El riñón presentó en algunos animales necrosis y degeneración hialina de glomérulos y túbulos.

En el Cuadro 1 se esquematiza la frecuencia de las citadas lesiones en los casos de estudiados.

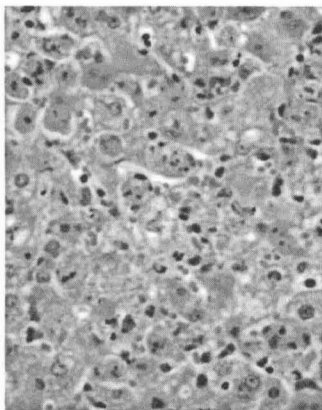


Figura 3. Histopatología de Hígado: Hepatitis caracterizada por necrosis hepatocítica difusa.

Cuadro 1. Frecuencia de lesiones observadas por órgano estudiados según n° de ficha.

Ficha	Hígado	Pulmón	Riñón	Bazo	Timo
4164- A	X	X	X		X
4164- B	X	X	X	X	X
4172 -A	X	X		X	
4172- B	X	X			
4184	X	X		X	
4185	X	X		X	
4310- A	X	X		X	
4310- B	X	X			
4310- C	X	X			
4584	X				
4430 Exp A	X	X	X		
4430 Exp B	X	X	X	X	

*Exp = Inoculación experimental.

En base a los estudios efectuados en el Departamento de Bacteriología de la DILAVE se descartaron patologías causadas por bacterias de género *Pasterurella* y *Salmonella*.

El estudio Toxicológico de las raciones fue negativo a la presencia de Micotoxinas.

Reproducción experimental de la enfermedad

Los conejos inoculados murieron en un lapso de 18-20 horas PI presentando epistaxis, astasia, ataxia y convulsiones repentinas.

Con respecto a la anatomía patológica macroscópica e histopatología, se evidenciaron las mismas lesiones que en los animales de campo ya descritas.

Estudios virológicos – DILAVE

Técnica de Hemoaglutinación : En la placa incubada a 4° C se observó el punto final (dilución mayor en la que se observa la HA) en 10⁻⁴, mientras que en la incubada a temperatura ambiente fue de 10⁻³. De acuerdo a estándares internacionales (10) se consideran positivos aquellos títulos mayores a 1/160. Los resultados positivos deberían ser confirmados por otras técnicas como ELISA o microscopía electrónica.

Estudios virológicos - (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Brescia- Italia). (Figura 4).

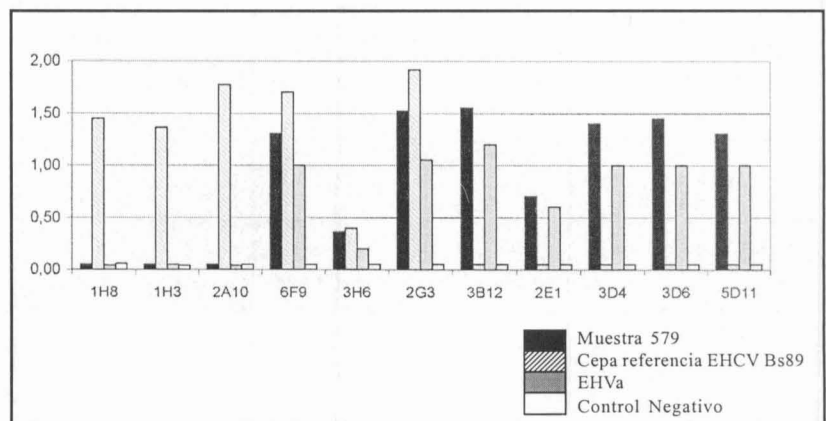


Figura 4. Resultados de la prueba de ELISA sandwich con el panel de anticuerpos monoclonales (Mabs) producidos contra el virus de EHC (RHDV Bs89) y virus variante (RHDVa).

Los sueros son considerados positivos para el ELISA estándar cuando poseen un título $\geq 1/10$.

Para los otros ELISAs, son considerados positivos cuando el título es $\geq 1/40$. (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

En Uruguay dentro de las enfermedades de notificación obligatoria a la OIE, solamente hasta el 2004, se reportaba la Mixomatosis con aparición muy esporádica (1), si bien ya en 1992, se manifestaba el alerta sanitario de dos afecciones en lepóridos en otras latitudes, incluida la EHC (2).

Los resultados obtenidos a partir de los animales estudiados confirman la presencia del virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo. Las muestras de hígado estudiadas por la prueba de ELISA y enfrentadas a un panel de anticuerpos confirman la presencia de la variante denominada RHDVa, siendo diferente a la cepa clásica de RHDV (RHDVBs89). La cepa variante RHDVa fue aislada por primera vez en Europa en 1997 (4,5,11) y ha remplazado a la cepa original en algunas regiones de Italia. Este subtipo fue aislado también en Estados Unidos en el año 2000 (5).

Los resultados obtenidos por el análisis serológico confirman la presencia de anticuerpos específicos en todas las muestras enviadas al Laboratorio de referencia. Los títulos de anticuerpos IgM y IgA deben ser considerados indicativos, porque también dependen por razones técnicas de la concentración total de IgM y IgA en cada suero que es desconocida. La presencia de IgM indica que los cone-

Cuadro 2. Resultados de los sueros procesados según técnica de ELISA utilizada.

	Nº1	Nº2	Nº3	Nº4	Nº 11	Nº 22
Standard ELISA	1/160	1/160	1/160	1/320	1/80	1/640
IgG ELISA	>1/40960	>1/40960	>1/40960	>1/40960	>1/40960	>1/40960
IgM ELISA*	1/640	1/40	1/2560	1/2560	1/640	1/2560
IgA ELISA*	1/640	1/160	1/640	1/640	1/640	1/640

jos estuvieron en contacto con el virus no más de uno a dos meses antes de la toma de muestras. La presencia de IgA en los sueros sugiere que la respuesta inmunológica específica se origina por una infección y no por una vacunación (5).

Hasta la fecha, no se ha podido determinar cual fue el origen de esta enfermedad. En base a lo acontecido en otros países, a la bibliografía consultada y las características de nuestro territorio nacional, existirían varias hipótesis para considerar: introducción de ejemplares vivos o embriones en forma ilícita provenientes de países que han sido afectados por la EHC, ingreso en la cadena alimentaria de los establecimientos cunícolas, a través de alimentos contaminados provenientes del exterior, visita a los criaderos de personas que estuvieron en contacto con animales infectados o fomites contaminados, importación de productos o subproductos de zonas endémicas (cueros, pelo, carne), exaltación de la virulencia de cepas "hipovirulentas" en la región.(9).

CONCLUSIÓN

Se confirma la presencia de la EHC en Uruguay en base a datos epidemiológicos, clínicos, patológicos, diagnóstico de laboratorio y reproducción experimental con la cepa aislada.

De los análisis virológicos efectuados se concluye además, que la cepa actuante pertenece a un subtipo variante (RHDVa)(5).

Se ha demostrado la capacidad de la DILAVE "M.C. Rubino" para realizar un diagnóstico primario de EHC tanto desde el punto de vista clínico, histopatológico y virológico.

Agradecimientos

Al Dr. Lorenzo Capucci del Centro de Referencia de la OIE para la EHC (IZSLER - Brescia, Italia) por los estudios virológicos y serológicos efectuados, sin los cuales no se hubiera llegado a un diagnóstico etiológico.

Al Director de la DILAVE, Dr. Victor Lyford-Pike por su apoyo y colaboración para el envío de los materiales al exterior.

A la Sra. Daisy Piñeiro por el procesamiento de los cortes histopatológicos.

Referencias Bibliográficas

1. Capano, F.; Repiso, M.V. (1992). La mixomatosis en el Uruguay: su diagnóstico predial y de laboratorio. 5º Congreso Nacional de Veterinaria. Montevideo, 11-13/11/92 (Uruguay).
2. Capano, F.; Repiso, M.V. (1992). Exportación de lepóridos: Alerta sanitaria y posibles dificultades en el diagnóstico ante la presencia de nuevas enfermedades. 5º Congreso

Nacional de Veterinaria. Montevideo, 11-13/11/92 (Uruguay).

3. Capucci, L.; Nardin, A.; Lavazza, A. (1997). Seroconversion in an industrial unit of rabbits infected with a non-pathogenic rabbit Haemorrhagic disease-like virus. Vet. Rec. June 21, 140 (25): 647-650.
4. Capucci, L.; Fallacara, F.; Grazioli, S.; Lavazza, A.; Pacciarini,

M.L.; Brocchi, E. (1998). A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant. Virus Res., Nov., 58 (1-2): 115-126. Vet. Rec. June 21, 140 (25): 647-650.

5. Capucci, L. Informes del Centro de Referencia para la EHC (RHD OIE Reference Laboratory. Comunicación personal

-
6. **Cooke, B.D.; Robinson, A.J.; Merchant, J.C.; Nardin, A.; Capucci, L.** (2000). Use of ELISA in field studies of rabbit haemorrhagic disease (RHD) in Australia. *Epidemiol. Infect.* June, 124 (3) : 563-576.
 7. **Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo.** (2004). Cartilla de Divulgación. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.- DGSD – DSA.
 8. **Liu, S.J.; Xue, H.P.; Pu, B.Q. & Quian, N.H.** (1984). A new viral disease in rabbits. *Anim. Hub. Vet. Med.* 16: 253-255.
 9. **Lucidi, Pia.** (1990-91). La malattia emorragica virale dei leporidi. Tesi di laurea. Università degli Studi di Bologna.
 10. **OIE Manual** (2000). Chapter 2.8.3. Rabbit Haemorrhagic Disease. Paris, Office International des Epizooties, pp. 762-776.
 11. **Schirraier, H.; Reimann, I.; Kollner, B. & Granzow, H.** (1999). Pathogenic, antigenic and molecular properties of Rabbit Hemorrhage Disease Virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants. *Arch. Virol.* 144 (4) : 719-735.