

ENFERMEDAD VIRICA HEMORRAGICA DEL CONEJO: NUEVOS ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS. (I)

Muguruza, R., Simón, M.C., Alonso, J.L., Muzquiz, J.L., Gironés, O. Sánchez, J. y Ortega, C.
Unidad de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

En 1984 se describió por primera vez una enfermedad epidémica en conejos domésticos de la provincia de Nanjing de la República Popular China (16), que causó una alta mortalidad (470.000 conejos). En Europa se describió por primera vez en Italia en 1986 (2). A lo largo de dos años siguientes, la mayoría de países europeos describieron sucesivamente la misma enfermedad (1, 13, 17, 21, 33, 34), en 1988 la EVH apareció en México donde con unas fuertes medidas sanitarias se la consiguió controlar en los dos años siguientes (13). En España apareció en 1988, y fué descrita por Argüello y col. en las provincias de León y Asturias (1).

La denominación de la enfermedad se mantiene como Enfermedad Virica Hemorrágica (EVH) o Enfermedad Hemorrágica del conejo en la mayoría de los países, aunque en ocasiones se utilicen las siglas de las denominaciones en inglés (VHD y RHD respectivamente).

ASPECTOS ETIOLÓGICOS

En la epidemia china, el virus observado fué descrito como un parvovirus (16, 36), pero los autores europeos comprobaron que se trataba de un calicivirus (7, 10, 24, 26, 27).

Los autores chinos, tras unos años de dudas, han llegado a reconocer que el virus que observó Liu en 1984 es idéntico al virus que causó la epidemia en los conejos europeos y que este virus es un ARN perteneciente a la familia de los calicivirus. Se trata de un virus

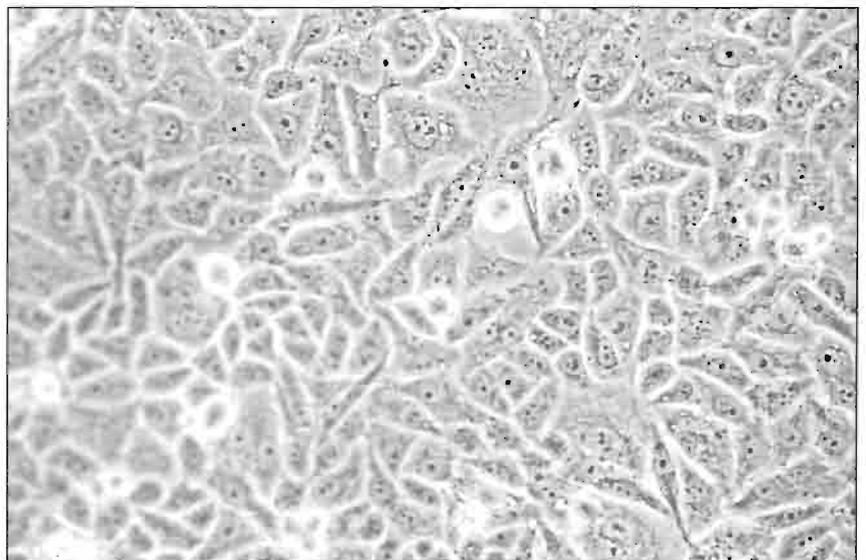
esférico, sin envoltura y muy pequeño (23 a 35 nm), con poder hemoaglutinante sobre hematíes humanos.

El aislamiento del virus fué intentado por diferentes autores sin éxito (4, 6, 12, 14). Sin embargo algunos investigadores chinos afirmaron haberlo conseguido en una línea celular establecida preparada por ellos (15).

En nuestro laboratorio hemos realizado la inoculación en cultivos celulares primarios y en líneas continuas (Vero, de epitelio renal de mono verde y Chang-liver, de hígado de conejo), con un extracto preparado a partir de hígado de conejo infectado de EVH. También hemos realizado el cultivo directo de macrófagos pulmonares y explantes primarios de pulmón, hígado, bazo y

riñón de conejos infectados con el virus de la EVH. En estos estudios, hemos variado las condiciones de cultivo con la finalidad de encontrar un método adecuado de aislamiento. Los cultivos se examinaban diariamente y mediante las pruebas de hemaglutinación (HA), inmunofluorescencia (IF), inmunoperoxidasa (IPO) y ELISA se comprobaba si los antígenos víricos se detectaban en la células o en el líquido de cultivo (Tabla 1).

En estudios paralelos hemos intentado detectar la relación antigénica y/o patogénica que pudiera existir entre el virus de la EVH el del parvovirus canino, felino y el calicivirus felino tanto «in vitro» como «in vivo» mediante la inoculación de conejos y perros. Los resul-



Cultivo celular Chang-liver, (hígado de conejo), tras 66 horas de la inoculación de un extracto hepático de conejo muerto de EVH.

Tabla 1.- Diferentes métodos de cultivo y subcultivo en las líneas celulares VERO y CHANG LIVER inoculadas con virus de la EVH.

VERO	inóculo	absorción	pases ciegos
suspensión	ExH	simultáneo	tripsinización
50 % confluyente	ExH	1 h/37° C	tripsinización
100 % confluyente	ExH	1 h/37° C	cong/descong
100 % confluyente	ExH-Glu	1 h/37° C	cong/descong
100 % confluyente	ExH	1h/37°C/500 r	cong/descong
CHANG-LIVER	inóculo	absorción	pases ciegos
50 % confluyente	ExH	1h/37° C	cong/descong
100 % confluyente	ExH	1h/37° C	cong/descong

ExH: extracto hepático infectado con EVH, diluido a 1/100 en Minimum Essential Med.; ExH-Glu: ExH con 10 % de glucosa; Cong/descong: congelación- descongelación.

tados fueron en todos los casos negativos. Esto indica que, al menos en nuestras experiencias, no se manifestó ningún tipo de relación, ni en la composición antigénica y en su poder patógeno, entre el parvovirus canino y felino con el virus de la EVH (Tabla 2).

El calcivirus atenuado felino ha sido testado por medio de técnicas de HA e IHA (inhibición de la hemaglutinación), y ELISA con anticuerpos monoclonales 1H8 y 6G2 frente a epitopos internos y externos al virus de la EVH. No hemos encontrado relación antigénica entre los dos calcivirus (felino y de la EVH), en las pruebas realizadas en laboratorio.

Por otro lado, hemos realizado la infección experimental de conejos con el calcivirus atenuado felino (FCV): la experiencia se realizó en once conejos de raza Neozelandesa de 3 meses de edad. Nueve de ellos fueron inoculados con FCV por vía intranasal y dos conejos no inoculados se utilizaban como control.

Se tomaron muestras de suero de los conejos en los días 0, 7, 14 y 30 post-inoculación, en este último día se realizó una segunda inoculación de FCV. Una semana más tarde se procedió a infectar 6 conejos por la vía i.m. con el virus virulento de la EVH.

Tabla 2.- Evolución clínica y del estado inmune de los conejos inoculados con calcivirus atenuado felino.

nº	Calcivirus	IHA 0, 7, 14, 29 d	Calcivirus 28 d	Desafío EVH/IM 35 d evolución
1	IN	0	NO	M 6º d
2	IN	0	NO	M 2º d
3	IN	0	NO	M 5º d
4	IN	0	IN	M 7º d
5	IN	0	IN	M 7º d
6	IN	0	IN	M 4º d
7	IN	0	IN	M 7º d
8	IN	0	IN	M 7º d
9	IN	0	IN	V/4096, IHA
10	-	0	-	M 4º d
11	-	0	-	M 4º d

IN: intranasal; -: Testigo; M: muerte y día post-inoculación; V: vivo; d: días respecto a la primera inoculación; NO: no inoculado.

Los conejos eran observados diariamente y en los mismos animales que morían o tras el sacrificio, se procedió a la realización de la técnica de HA para detectar la presencia del virus en los órganos internos. Las muestras de suero tomadas se estudiaban mediante IHA y ELISA.

Los resultados de esta experiencia ponían de manifiesto que los conejos inoculados con el FCV no desarrollaban ningún tipo de respuesta inmune frente al virus de la EVH, y que cuando eran desafiados con virus virulento de la EVH no estaban protegidos frente a la infección.

Por otro lado, el FCV no mostró ningún tipo de acción patógena sobre los conejos inoculados, que no mostraron ningún tipo de sintomatología durante la experiencia. En consecuencia, creemos que el calcivirus felino y el de la EVH no muestran similitud antigénica y son específicos para la especie habitual de la que proceden.

ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS

La epidemiología de la EVH ha resultado especialmente interesante en cuanto a que presenta aspectos peculiares difíciles de explicar.

RESPECTO A LAS ESPECIES AFECTADAS

Hasta el momento presente la EVH solamente ha afectado a conejos domésticos y salvajes (*Oryctolagus cuniculus*). Diferentes investigadores han intentado la reproducción experimental de la EVH en caballo, mulo, asno, vaca, búfalo, cabra, cerdo, perro, gato, chinchillas, cobayo, hamster, oca, pollo, pato, rata, ratón, topo y mono, sin ningún resultado positivo (5, 18, 23, 25, 28, 32, 37).

Nosotros hemos realizado un estudio de detección del virus EVH en zorros salvajes, como principales representantes de los carnívoros salvajes que se alimentan habitualmente de conejos. También hemos intentado la reproducción experimental de la infección por el virus de la EVH en *perros domésticos* para conocer si estos carnívoros son sensibles o el tipo de papel que juegan en la epidemiología de la enfermedad.

Tabla 3. - Evolución de los tipos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación tras la inoculación del virus de la EVH.

Día post-inoculación	cachorro nº 1*	cachorro nº 2**
3	20	0
7	160	20
14	80	20
21	80	20
28	160	320
34	160	320

* Inoculado por vía intravenosa; ** segunda inoculación por vía intravenosa.

El estudio se llevó a cabo sobre 75 hígados de zorros, utilizando la técnica de Hemoaglutinación, Inmunofluorescencia directa y ELISA. Todos los zorros dieron reacción negativa con cualquiera de las técnicas empleadas en el estudio, de modo que podemos pensar que los zorros encontrados muertos en el campo, en zonas en las que existe la EVH en los conejos salvajes no mueren a causa de esta enfermedad ni presentan indicio alguno de infección por este virus.

Paralelamente se realizó la inoculación de dos cachorros de perro con extracto hepático de conejo muerto de EVH, utilizando la vía intraocular e intravenosa. Estos cachorros fueron observados diariamente y se les tomaban muestras de orina, heces y suero para comprobar la presencia del virus de la EVH, utilizando las mismas técnicas. Ninguno de ellos desarrolló ningún síntoma de enfermedad, solamente un ligero aumento de la tasa de anticuerpos específicos. Este aspecto coincide con la observación realizada en los zorros, ya que cuando los cachorros murieron, tampoco fué posible demostrar la presencia del virus EVH en órganos internos (Tabla 3).

El tercer aspecto del estudio fué realizado alimentando cachorros de perro con hígados provenientes de conejos muertos de EVH. Posteriormente las heces de estos perros fueron inoculadas en conejos sensibles por la vía i.m. mientras que en otro grupo de conejos un extracto preparado con estas mismas heces de perros, se impregnó en un algodón y se dejó en proximidad del alimento de los conejos. Como resultado, los conejos desarrollaron la

enfermedad, o demostraron su reacción al contacto con el virus mediante la elevación de las tasas de anticuerpos séricos específicos (Tabla 4).

Como conclusión de esta parte de nuestro estudio, se deduce que los perros pueden ser portadores asintomáticos del virus de la EVH en sus heces. Si los carnívoros salvajes pueden actuar del mismo modo que los perros, podrían ser considerados como una parte importante en la difusión de la EVH en la naturaleza.

RESPECTO A LA EDAD DE LOS ANIMALES

Otra particularidad de las características epidemiológicas de la EVH es el hecho de que los gazapos menores de 6 semanas no la padecen en condiciones naturales (3, 8, 14, 37), aunque experimentalmente por inoculación

intramuscular algunos autores la consiguieron reproducir a los 27 días de edad (19). En contrapartida, la mortalidad aumenta progresivamente de modo que cuando los conejos alcanzan 9 - 10 semanas de edad la mortalidad asciende a un 70 % (20).

Este extraño comportamiento patógeno del virus de la EVH también ha sido objeto de estudio por nuestra parte. Algunos autores han hipotetizado sobre su posible relación con la baja presencia de enzimas hepáticas en los gazapos, ya que la enfermedad parecía manifestarse cuando los gazapos comienzan a habituarse a los alimentos sólidos coincidiendo con el aumento de las enzimas transferasas hepáticas (20). Aunque para otros investigadores, este comportamiento tendría que estar relacionado con la transferencia de inmunidad pasiva a partir de las madres (14).

En la experiencia diseñada y realizada en nuestro laboratorio trabajamos con siete camadas de gazapos cada una de las cuales tenía 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 semanas de edad. Todos los gazapos fueron inoculados con el virus de la EVH para determinar el grado de susceptibilidad a la infección según la edad (Tabla 5), mientras que paralelamente, procedimos a estimular de forma artificial la actividad enzimática hepática por ver si realmente esto facilitaba el desarrollo de la infección en los animales de edades inferiores a las 8 semanas de vida (Tabla 6).



Imagen característica de un gazapo muerto de EVH tras la inoculación experimental por vía intragástrica con un extracto hepático virulento.

☎ 93-899 51 02

C/. J. J. Rafols, 4
08775 Torrelavit
(Barcelona)

GRANJA

L'OREIG

- Venta de reproductores de selección con la garantía de 12 años de mejora.
- Razas puras, Neozelandés y California, en Ambiente Natural.

ENVIOS A TODA ESPAÑA. PIDA INFORMACION SIN COMPROMISO

GRANJA EQUIPADA CON JAULAS Y ACCESORIOS  GARANTIA DE BUEN MANEJO, HIGIENE, Y SANIDAD.

FINVIRUS: El desinfectante eficaz con mayor experiencia para saneamiento de las granjas cunícolas. Acción enérgica y penetrante.

- * *Máxima actividad: el mejor y más activo frente a restos de materia orgánica.*
- * *Activo a todas las temperaturas y condiciones climáticas.*
- * *Germicida rápido que no se inactiva en presencia de aguas duras o salobres.*
- * *Producto totalmente estable física y químicamente, tanto puro como diluido.*
- * *Amplio espectro de acción (bacterias, virus, hongos). Repele insectos y roedores.*
- * *Acción residual con efecto germicida prolongado sobre las superficies tratadas.*

J. Uriach & Cia., S.A. (División Veterinaria) C. Degà Bahí, 59 - 67.
08026 BARCELONA Tel. 93 - 347 15 11



CUNICULTOR

¿Sabe lo que es el **TRIPLE GALVANIZADO** en jaulas para cunicultura?

Antes de equipar, renovar o ampliar su granja consulte a **EXTRONA**, sus jaulas le durarán 3 veces y al mismo precio.

Infórmese: **EXTRONA, S.A.**
08232 VILADECAVALLS (Barcelona)
Tel. (93) 788 58 66
Fax. (93) 789 26 19

Tabla 4. - Evolución de los conejos inoculados con las heces de perros alimentados con hígados de conejos muertos de EVH.

conejo	inóculo	evoluc.	IHA/0º	IHA/7º	IHA/14º	HA ►
1	HC/IM	M/5º d	0	-	-	+
2	HC/IM	M/7º d	0	-	-	+
3	HC/IM	sano	0	5.120	5.120	sano
4	HC/IM	sano	0	20.480	20.480	sano
5	HC/IM	sano	0	10.240	20.480	sano
6	HC/cont	M/5º d	0	-	-	+
7	HC/cont	sano	0	-	-*	+
8	HC/cont	sano	0	160	1.280	sano
9	HI/IM	sano	0	0	0	
10	HI/IM	sano	0	0	0	
11	hig/IM	M/2º d	0	-	-	+
12	hig/IM	Ef/sano	0	5.120	40.960	

*: momento de la inoculación del virus de la EVH; ► : hígado estudiado por la técnica de HA tras la muerte; cont: por contacto; evoluc.: evolución clínica tras la inoculación; hígado: hígado de conejo infectado; HC: heces de perro tras la ingestión del hígado virulento; HI: heces de perro antes de la ingestión del hígado infectado; IM: intramuscular; M: muerte y día de la muerte; Ef: enfermo.



Preparación de los hematíes humanos para la realización de la Técnica de Hemoaglutinación / Inhibición de la Hemoaglutinación.

En una experiencia paralela, realizamos un tratamiento del virus EVH con el contenido del estómago y leucocitos de conejos adultos sanos, antes de la inoculación con la finalidad de comprobar

si la composición del contenido del estómago o la actividad de los leucocitos sobre el virus producían algún tipo de alteración estructural o química en el virus EVH que le facilitara la reproducción de la enfermedad clínica en los gazapos.

Nosotros hemos comprobado que aunque no se ha reproducido la EVH en forma clínica en los gazapos de edades inferiores a las 7 semanas, sí son sensibles a la infección, en el sentido de que fueron capaces de permanecer como portadores asintomáticos y pudieron transmitir la infección a conejos adultos sensibles que vivían próximos a ellos.

Por otro lado, no hemos encontrado ninguna influencia del aumento de la actividad hepática inducida experimentalmente o del tratamiento con contenido de estómago y leucocitos de conejos adultos con la capacidad del virus para provocar formas clínicas de la infección en gazapos.

En consecuencia, nuestros resultados no nos permiten desvelar el tipo de mecanismo implicado en la resistencia natural de los gazapos a la enfermedad clínica, si bien nos han permitido conocer la capacidad de los gazapos clínicamente sanos para mantener y

transmitir el virus ya que previamente a la realización de estos estudios no se conocía la existencia de este tipo de portadores asintomáticos de la EVH. Mientras que la inmunidad adquirida tras este contacto con el virus en las primeras semanas de vida les mantenía resistentes a la infección por lo menos hasta las 16 - 20 semanas de edad.

Esto podría explicar el hecho observado por algunos investigadores (3, 19), de que en condiciones naturales algunas madres morían después de adoptar gazapos procedentes de otras madres infectadas.

LA TRANSMISION.

Se sabe que la transmisión de la EVH dentro de una explotación puede ocurrir por mecanismo directo -introducción de animales infectados-, o indirecto -hombre, utensilios, aire, alimentos contaminados...-, a pesar de que las vías de entrada del virus en los animales, y las fuentes de virus han tardado en ser conocidas.

Con la finalidad de conocer las materias que resultan virulentas en los animales infectados, hemos estudiado las secreciones oro-respiratorias, la orina y las heces de los conejos infectados

Tabla 5.- Evolución de las camadas de gazapos de diferentes edades tras la inoculación del virus de la EVH.

Edad	Conejo	Evoluc	IHA/7	IHA/14	IHA/21	IHA/28	IHA/35
1ª sem	1	sano	0	0	0	256	256
	2	sano	0	2	32	256	128
	C-3	sano	0	0	0	64	64
	Md-4	M/21 p.i	-	-	-	-	-
2ª sem	5	sano	0	0	0	0	32
	6	sano	0	0	0	256	256
	C-7	sano	0	0	0	0	8
	C-8	sano	0	0	0	8	16
3ª sem	9	sano	0	32	512	256	512
	10	sano	0	32	128	512	512
	C-11	sano	0	0	4	16	32
4ª sem	12	sano	0	64	512	512	512
	13	sano	0	32	256	512	512
	C-14	sano	0	0	4	16	16
5ª sem	15	sano	0	64	256	256	256
	16	sano	0	256	2.048	2.048	2.048
	C-17	sano	0	0	0	8	16
6ª sem	18	sano	0	2	4	4	-
	19	sano	0	512	4.096	4.096	-
	C-20	sano	0	0	4	64	-
7ª sem	21	M/5 p.i	-	-	-	-	-
	22	M/5 p.i	-	-	-	-	-
	C-23	M/5 p.i	-	-	-	-	-

C: control; *: evolución clínica; M: muerte/día p.i en que ocurre y título HA del hígado; IHA: resultados del test IHA expresado en U. inhibitoras de la H.A.; Md: madre.

Tabla 6.-Evolución de los gazapos tras provocar inmunosupresión e inocularles con el virus EVH.

Conejo	7º d-1	17º d-1	IHA 13º -28º dpi	IHA 43 dpi	IHA 58 dpi
1	Ispr*	EVH	0	10.240	10.240
2	Ispr*	EVH	0	10.240	10.480
3	Ispr*	EVH	0	40.960	40.960
4	Ispr*	C-F	0	20.480	10.240
5	-	EVH	0	10.240	10.240
6	-	EVH	0	20.480	40.960
7	-	C-v	0	20.480	1.280
madre	-	-	0	-	-

* inmunosupresión con fenobarbital administrado vía i.p.; C-F: control de la acción del fenobarbital; C-C: control de la camada; d-v: días de vida; IHA: test de inhibición de hemaglutinación (U); p.i.: día post inoculación; EVH: desafío por la vía intramuscular con el virus EVH.

Tabla 7.- Evolución de los conejos inoculados con heces y orina de conejos infectados de EVH.

Conejo	2º p.i	3º p.i	4º p.i	5º p.i	14º p.i	15º p.i
H/IM 1 2 3	M				10.240 10.240	
H/Ct 4 5 6		M	M		640	
H/C 7 8 9						sano sano sano
O/IM 10 11 12				M M		M
O/C 13 14 15						sano sano sano

C: controles; Ct: en contacto; H: heces; IM: intramuscular; M: muerte; O: orina; p.i: día post-inoculación; *: Unidades IHA.

experimentalmente con el virus de la EVH para comprobar si tenían el virus y eran capaces de reproducir la infección en conejos sensibles, utilizando técnicas de HA y ELISA para detectarlo.

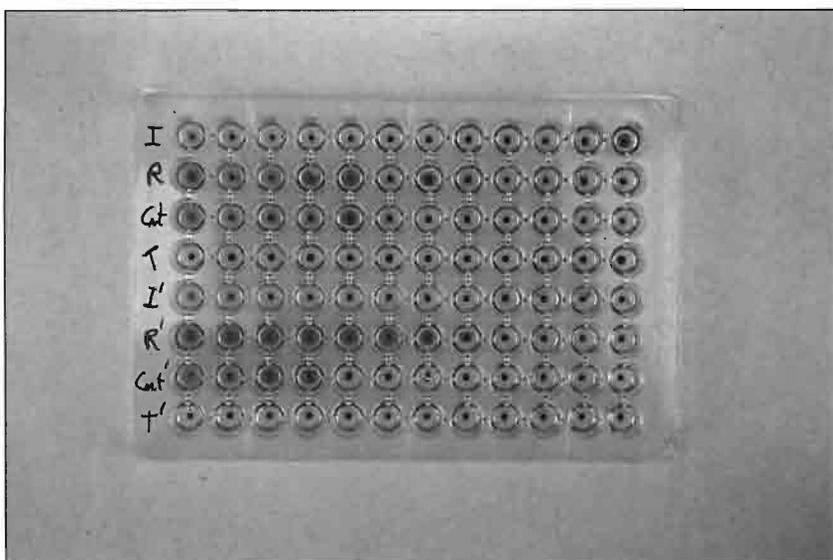
Parte de las muestras oralespiratorias dieron resultado positivo con ambas técnicas mientras que la orina y heces fueron negativas.

A pesar de los resultados negativos se realizó la inoculación experimental a conejos sensibles con extractos preparados a partir de estas mismas heces y de la orina, y se logró reproducir la EVH con similares características a las que presenta en la infección natural (Tabla 7).

En consecuencia hemos demostrado la importancia de las secreciones oralespiratorias, de la orina y de las heces en la transmisión de la EVH. Llama la atención el hecho de que las técnicas habituales de estudio no hayan sido capaces de detectar la presencia del virus. Nosotros creemos que esto puede ser debido a que el virus se encuentra en muy bajos títulos en las heces de los conejos infectados. Sin embargo, estos títulos son suficientes para provocar la infección en los conejos sensibles, ya que como pudimos comprobar en una experiencia anterior (22), la dosis mínima necesaria para la reproducción experimental de la EVH por vía aerosol o i.m. es muy baja (valores de 8 y 4 unidades hemoaglutinantes respectivamente).

Otro aspecto importante en la transmisión es la vía de entrada del virus en los conejos sanos. La observación de casos de infección natural permitían deducir que la vía aerógena o respiratoria sería un modo de transmisión predominante en explotaciones intensivas (30). Sin embargo, también se ha sospechado que la transmisión se puede producir a través del alimento contaminado con secreciones o excreciones procedentes de conejos infectados (21).

En este sentido otra de nuestras experiencias se planteó con el objetivo de determinar si la vía digestiva reproduce la EVH de modo consistente. Con esta finalidad realizamos la inoculación intragástrica (I.G.) en diez conejos mediante una suspensión obtenida a partir de un extracto de hígado de conejo infectado con el virus de la EVH (Tabla 8).



Microplaca conteniendo diversas diluciones de extractos orgánicos estudiadas mediante la técnica de Hemoaglutinación.



**Alimentos de calidad.
Menos coste y mejor conversión.**



Agropecuària de Guissona, S. Coop. Ltda.
Avda. Verge del Claustre, 32 25210 Guissona (Lleida) Tel. 973 - 55 00 00 Fax 973 - 55 08 82

Juntos para la eficacia

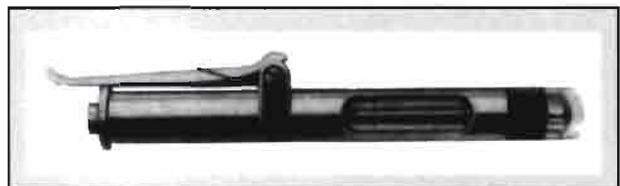


DERMOJET[®]

JERINGAS AUTOMÁTICAS SIN AGUJA PARA INYECCIONES INTRADERMICAS



Para vacunaciones seriadas



Para vacunaciones individuales

Masalles

Masalles Comercial. s.a.

C/. Balmes, 25 - Teléfono (93) 580 41 93*

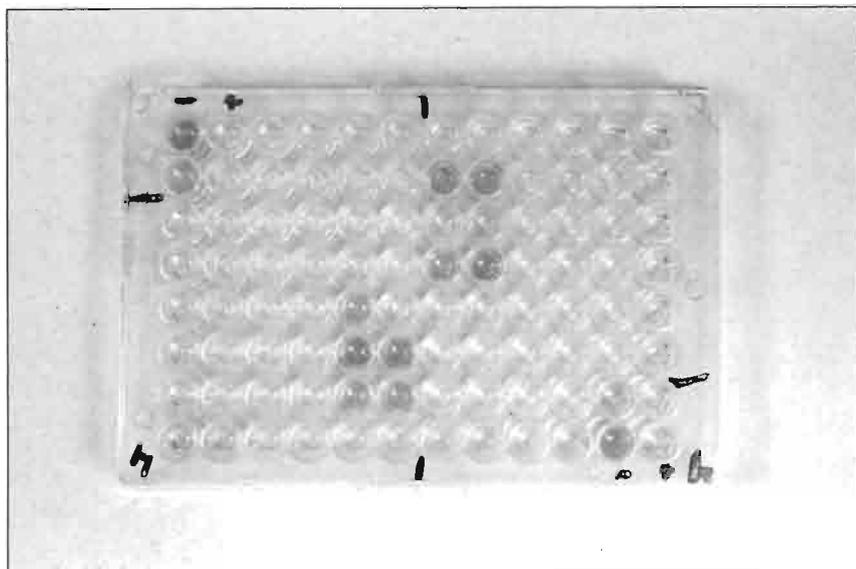
Fax: (93) 580 97 55

Apartado de Correos, 63 - 08291 RIPOLLET (Barcelona)

Tabla 8.- Evolución de los conejos inoculados por vía intragástrica con virus de la EVH.

Conejos	1º p.i	2º p.i	3º p.i	4º p.i	7º p.i.	14 p.i
1	M					
2		M				
3		M				
4		M				
5		M				
6		M				
7			M			
8				M		
9	hepatitis					10.240
10						20.480
CD-1		M				
CD-2		M				
C-1		M				
C-2						sano

C-1 y C-2: conejos no inoculados en proximidad a inoculados; CD-1 y CD-2: control del virus de desafío; UIHA: unidades inhibitoras de la HA. M: muerte; p.i: día post-inoculación.



Microplaca ELISA indirecto con muestras de suero de los conejos vacunados de EVH.

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

Paralelamente se realizó extracción de sangre los días 0, 7 y 14 post inoculación (p.i.), para posterior análisis del

suero por IHA; de los 10 conejos inoculados por vía I.G., uno murió con un cuadro sobreagudo de EVH a las 24 horas p.i., 5 murieron a las 48 horas p.i., otros dos fallecieron un cuadro agudo a las 72 horas y 92 horas p.i.; y de los restantes uno desarrolló una hepatitis sub-aguda, con inapetencia, tristeza y sin defecación, de la que se recuperó al

7º día, cuando al día siguiente la orina carecía de bilirrubina, se apreció anemia y se recuperó totalmente, pese a los altos niveles de anticuerpos (IHA y ELISA), mientras el restante no manifestó sintomatología alguna pese a los altos anticuerpos a los 14 días de la inoculación I.G. (título 20.480 UI HA).

El conejo testigo próximo al que desarrolló la forma de hepatitis sub-aguda murió al 2º día con un cuadro agudo de EVH. El segundo conejo testigo había permanecido en jaula aislada, en proximidad al resto de los conejos inoculados; presentó síntomas de EVH al 5º día de permanencia junto a los conejos inoculados, y murió a las 48 horas.

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

En los primeros años tras la aparición de la EVH (9, 11) se realizaron estudios epidemiológicos en Italia sobre la evolución que había tenido al enfermedad en una explotación y llegaba 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. Nosotros, en nuestra experiencia hemos confirmado experimentalmente esta sospecha, si bien creemos que una vez la EVH se ha presentado en una explotación industrial, la vía más efectiva en la difusión de la EVH es el contacto aerógeno por aerosol.

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

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la EVH se basó inicialmente en la prueba de la hemaglutinación (HA) con glóbulos rojos humanos y en la observación de la partícula vírica mediante inmunomicroscopía electrónica (35).

Tabla 9.- Título hemaglutinante de vacna completa, sedimento y líquido de suspensión, tras someterlos a diferentes tratamientos.

Tratamiento	Sedimento	Sobrenadante
Sin tratar (completa)	32	32
Sonicada (completa)	32	32
Congelada/descongelada (id)	32	32
Centrifugada	128	0
Congelada/descongelada/centrifugada	256	0
Sonicada/centrifugada	512	0
Centrifugada+ congelada/descongelada	256	0
Congelada/descongelada+ sonicada+ cetrifugada	1.024	0

congelada/descongelada 3 veces

Posteriormente se han utilizado técnicas más sencillas, rápidas y de alta fiabilidad -principalmente ELISA- (3, 29). la detección de la respuesta inmune de los animales, ya sea frente a la infección o frente a la inoculación de una vacuna también se comenzó con la utilización de la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) aunque actualmente ha quedado sustituida por la técnica ELISA en método indirecto (3). Dentro del conjunto de nuestras experiencias hemos realizado una comparación de la fiabilidad de los resultados de las técnicas de inmunofluorescencia directa (IFD), HA, ELISA (tanto directo como indirecto) e IHA.

La técnica IFD resultó más sensible y menos específica que la HA, aunque ambas mostraron un valor elevado (> 90 %).

Tanto la técnica IHA como ELISA fueron capaces de detectar positividad en todos los conejos vacunados, sin embargo mostraron una baja correlación en cuanto a los títulos alcanzados por los sueros en cada una de las técnicas. Sin embargo en animales infectados de forma natural, la técnica de IHA se ha mostrado menos sensible que la ELISA (3, 12).

ASPECTOS PROFILACTICOS

A la hora de prevenir la aparición de la EVH las principales medidas se han basado en la desinfección y aislamiento de las explotaciones afectadas, y en el

uso de la vacuna elaborada a partir de extractos de órganos de conejos muertos de EVH inactivados. Esta vacuna fué desarrollada inicialmente por los investigadores chinos (16), y posteriormente por otros equipos, entre los que se encuentran los españoles (1).

La inactivación se consigue mediante formaldehído o beta-propiolactona, y se han combinado con adyuvantes como el hidróxido de aluminio o el aceite mineral. Cualquiera de estas vacunas resultaron eficaces, dando protección desde la primera semana post-vacunación, y manteniendo dicha inmunidad al menos durante 8 ó 10 meses.

En los primeros momentos tras la aparición de la EVH en España la utilización masiva de la vacuna se realizó como una medida de urgencia de modo que el producto vacunal empleado fué poco estudiado, es por eso que aún sabiendo que la vacuna ayudaba de forma efectiva a controlar la enfermedad, se conocían pocos datos sobre sus posibles efectos secundarios o sobre la duración real de la inmunidad.

Hemos realizado una serie de tratamientos físicos de la vacuna inactivada con la finalidad de comprobar si el producto vacunal era inocuo, ya que sabemos que las vacunas inactivadas de EVH presentan un título hemaglutinante residual.

Sometíamos la vacuna a un proceso de separación por centrifugación, a congelación-descongelación y/o sonicación, de este modo obteníamos por un

lado el aumento del título HA y por otro lado quedaba por saber si ese aumento tenía lugar en forma de partículas infectantes (Tabla 9).

Para demostrarlo inoculamos por vía i.m. la suspensión de los extractos vacunales en conejos sensibles a los que se les realizó un seguimiento clínico y serológico.

Tanto la sonicación como la congelación-descongelación no produjeron variación alguna del título hemaglutinante, que únicamente aumentó al centrifugar, debido a la concentración que se produce en este tratamiento.

A continuación se inocularon dos conejos con el sedimento de la vacuna congelada/descongelada tres veces, sonicada y centrifugada y se dejó un testigo sin inocular. Ninguno de ellos manifestó síntomas de la enfermedad en los 14 días siguientes a la inoculación y presentaron un importante aumento del título IHA (10.240 y 20.480), en los dos conejos inoculados mientras que el testigo permanecía negativo. Estos resultados indican que el título de partículas hemoaglutinantes que se detectan en la vacuna, incluidas las partículas que se encontraban ocultas, -probablemente en células del órgano con en que se elabora-, carecen de efecto patógeno sobre los conejos sensibles.

También hemos realizado un estudio, que fué motivo de una publicación anterior (31), en el que se demostraba que la vacuna inactivada confería pro-

tección a las conejas desde títulos séricos > 20 UIHA, con una media de persistencia de los anticuerpos de 7 meses. Asimismo, se observó que los títulos inferiores podían dar lugar a la aparición de formas crónicas y que el contacto posterior al virus de los conejos vacunados con el virus virulento aumentaba de modo importante la duración de la inmunidad.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Argüello, J.L., Llanos, A y Pérez-Ordoyo, L.I. (1988) *Med. Vet.* 5: 645-650.
- 2.- Cancellotti, F.M., Villeri, C., Renzi, M. y Monfredini, R. (1987). *Riv. di Coniglicoltura*, 25 (9): 41-46.
- 3.- Capucci, L. Scicluna, M.T. y Lavazza, A. (1990) *Riv. di Coniglicoltura*, 28 (9): 36-37.
- 4.- Capucci, L. Scicluna, M.T., Lavazza, A. y Brocchi, E. (1990). *Selezione Veterinaria*, 30: 301-312.
- 5.- Caracappa, S., Vitale, F. y Di Belle, C. (1989). *Atti Soc Ital. Sci. Vet.* 43: 889-893.
- 6.- Di Modugno, G. y Nasty, R. (1990) *Riv. di Coniglicoltura*, 28 (1): 25-32.
- 7.- Du, N.X. (1991) *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 10: 325-336.
- 8.- Du, N.X., Xe, W.Y., Liu, S.J., Xu, F.N., Yu, Y.R. y Li, R.J. (1991) *Science Agricultural Sinica*, 24 (1): 1-10.
- 9.- Fiore, G.L. y Lavazza, A. (1989) *Progr. Vet.* 44: 414-416.
- 10.- Galazzi, D. *Riv. di Coniglicoltura*, 29 (5): 34-40.
- 11.- Galazzi, D., Semprini, P., Di Emidio, P. y Nucci, D. (1989) *Riv. di Coniglicoltura*, 27 (9): 43-47.
- 12.- Gavier-Winden, D y Mörrner, T. (1991) *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 10: 453-458.
- 13.- Gregg D.A., House, C., Meyers, R.F. y Berninger, M. (1991) *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 10: 433-451.
- 14.- House, C. Gregg, A.D., Meyers, R.F., Wilson, T.M., Yedlousching, R.J., House, J.A. y Mebus, C.A. (1990) *J. Appl. Rabbit Res.* 13: 133-137.
- 15.- Ji, Ch.Y., Du, N.X., Wu, W.Y. (1991) *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 10: 253-255.
- 16.- Liu, S.J., Xue, H.P., Pu, B.Q., Quiab, N.H. (1984) *Animal Husbandry and Vet. Med.* 16: 253-255.
- 17.- Marcato, P.E. (1988) *Riv. di Coniglicoltura*, 25 (9): 59-64.
- 18.- Mizak, B., Gorski, J. y Kozacynski, W. (1991) *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 34: 37-44.
- 19.- Mocsari, E., meder, M., Glavits, R., ratz, F. y Sztojokov, V. (1991) *Magyar Allatorv. Lapja*, 46 (6): 351-355.
- 20.- Morisse, J.P. (1990) *Cuniculture*, 17 (2): 86-95.
- 21.- Morisse, J.P. (1988) *Le Point Vétérinaire*, 20: 79-83.
- 22.- Muguruza, R. Simon, M.C., Gironés, O., Muzquiz, J.L., García, J., Ortega, C. y Alonso, J.L. (1993) *Med. Vet.* 10 (3): 163-168.
- 23.- Ohlinger, V.S., Haas, B. y Thiel, H.J. (1993) *Vet. Res. Commun.* 24: 103-116.
- 24.- Ohlinger, V.S. y Thiel, H.J. (1991) *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 10: 311-323.
- 25.- Pagés Manté, A. (1989) *Boletín de Cunicultura*, 12 (1) 10-15.
- 26.- Park, J.H., Kida, H., Veda, K., Ochiai, K., Goryo, M. y Itakura, C. (1991) *J. Veterinary Medicine Serie B*, 38: 749-754.
- 27.- Parra, F. y Prieto, M. (1990) *J. Virol.*, 64: 4.013-4.015.
- 28.- Rodak, L., Smid, B. y Valicek, L. (1991) *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 10: 513-524.
- 29.- Rodak, L., Smid, B., Valicek, L., Vesely, T., Stephanel, J., Hampl, J. y Jurak, E. (1990) *Journal General Virology*, 71: 1.075-1.080.
- 30.- Rosell, J.M., Badiola, J.I. y Badiola, J.J. (1990) *Cuniculture*, 17 (1): 21-26.
- 31.- Simón, M.C., Gironés, O., Alonso, J.L., Muzquiz, J.L., García, J., Ortega, C. y Muguruza, R. (1993) *Med. Vet.* 10 (1): 44-48.
- 32.- Smid, B., Valicev, L., Rodak, L., Stephaneck, J. y Jurak, E. (1991). *Vet. Microbiology*, 26: 77-85.
- 33.- Smid, B., Valicev, Stephaneck, J. L., Jurak E. y Rodak, L. (1989) *J. Vet. Med. Ser. B*, 26: 237-240.
- 34.- Soike, D., Wilfe, I., Tutte, B., Stropp, M., Rösler, D., Rummmler, H.J., Richter, W., Werdier, H., Schlüter, H., Böhme, R., (1989) *Monat. Veterinaermed.* 44: 376-378.
- 35.- Valicek, L., Smid, B., Rodak, L. y Kudrna, J. (1990) *Archives Virology*, 11 (2): 271-275.
- 36.- Xu, W.Y., Du, M.X., Liu, S.J. (1989) *Riv. di Coniglicoltura*, 26: 25-29.
- 37.- Xy, W.Y. (1991) *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 10: 393-408.

RESPUESTA A LA ENCUESTA CUNÍCOLA bC nº 79 (pag. 72-73)

1	a	5	b	9	b	13	a	17	b	21	b	25	a
2	b	6	b	10	a	14	b	18	b	22	a	26	b
3	b	7	a	11	b	15	b	19	a	23	b	27	b
4	a	8	b	12	b	16	a	20	b	24	b	28	a