

ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO

RESUMEN

La enfermedad hemorrágica del conejo (EHC) es una enfermedad aguda, fatal y muy contagiosa del conejo europeo (Oryctolagus cuniculus), causada por un calicivirus. Una enfermedad similar, denominada síndrome de la liebre parda europea (SLPE) se ha descrito en la liebre (Lepus europaeus). El agente etiológico es un calicivirus diferente, relacionado desde el punto de vista antigénico con el virus de la EHC (VEHC). La EHC se caracteriza por una alta morbilidad y una alta mortalidad (40–90%), y se propaga de manera muy rápida mediante transmisión directa e indirecta. La infección puede producirse por vía nasal, conjuntival u oral. La transmisión de la EHC está facilitada por la elevada estabilidad del virus en el medio exterior. El periodo de incubación varía de 1 a 3 días, y la muerte normalmente sobreviene 12–36 horas después de la subida de la fiebre. Las manifestaciones clínicas se han descrito sobre todo en la infección aguda (síntomas nerviosos y respiratorios, apatía y anorexia). Aparecen lesiones patológicas específicas y claras, tanto globales como microscópicas. Hay una necrosis hepática primaria y una coagulopatía intravascular diseminada de forma masiva en todos los órganos y tejidos. Las lesiones más severas están presentes en el hígado, la tráquea y los pulmones. En casi todos los órganos se evidencian hemorragias petequiales y están acompañadas de una escasa coagulación sanguínea.

Identificación del agente: *El hígado contiene el título vírico más alto y es el órgano más adecuado para la identificación vírica. No se puede emplear el aislamiento in vitro ya que no se han establecido condiciones de crecimiento satisfactorias ni sustratos celulares de sensibilidad adecuada. La prueba de hemaglutinación que emplea eritrocitos humanos del grupo O fue la primera prueba aplicada en el diagnóstico rutinario de laboratorio de la EHC. Sin embargo, otras pruebas (microscopía inmunoelectrónica de tinción negativa, técnica de enzoinmunoensayo [ELISA] tipo sandwich, tinción inmunohistológica, reacción en cadena de la polimerasa y Western blot) han mostrado un nivel mayor de especificidad y sensibilidad.*

Pruebas serológicas: *La caracterización y titulación de anticuerpos específicos, que surgen de la infección natural o a partir de la inmunización, se llevan a cabo utilizando la prueba de inhibición de la hemaglutinación o la técnica ELISA, tanto en su forma de reacción indirecta como en su forma competitiva. Se preparan los siguientes reactivos: antígeno procedente de hígado de conejo infectado, suero anti-VEHC procedente de conejos convalecientes o hiperinmunizados y suero negativo de conejos plenamente sensibles a la infección por el VEHC. Se han producido anticuerpos monoclonales en diversos laboratorios. Algunos laboratorios han fabricado un antígeno recombinante, la proteína estructural VP60 expresada en baculovirus, que puede ser también empleada como reactivo para el diagnóstico de la enfermedad.*

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: *El control indirecto de la enfermedad se realiza mediante vacunación que emplea una vacuna muerta preparada a partir de suspensiones hepáticas clarificadas de conejos infectados experimentalmente a las que, con posterioridad, se inactiva y se les adiciona un adyuvante. Los animales vacunados adquieren rápidamente una sólida inmunidad frente a la infección por el VEHC (en 5–10 días) y los datos experimentales indican que la protección perdura durante un periodo prolongado de tiempo (más de 1 año)*

A. INTRODUCCIÓN

La enfermedad hemorrágica del conejo (EHC) es una enfermedad aguda, fatal y muy contagiosa de los conejos europeos, domésticos y silvestres (*Oryctolagus cuniculus*).

La EHC fue descrita por primera vez en 1984 en la República Popular de China (19); actualmente es endémica en Asia Oriental, Europa y Oceanía. Se han registrado también brotes en América Central (México, Cuba), Arabia Saudí y África occidental y septentrional. En los años 2000 y 2001 se han producido tres brotes independientes en los Estados Unidos de América.

El agente causal de la EHC es un calicivirus de 32–35 nm de diámetro que posee un polipéptido único y fundamental en la cápsida (60 kDa), un genoma de RNA de polaridad positiva de 7437 kb y un RNA de 2.2 (9, 20–22). La proteína de la cápsida (VP60) del virus de la EHC (VEHC) se pliega en dos dominios distintos que se mantienen unidos mediante una región bisagra: los residuos 200–250 del extremo N-terminal constituyen el dominio interno y los del extremo C-terminal, más allá de los residuos 200–250, constituyen el dominio prominente. En la imagen global de la cápsida, estos dominios forman la capa interna y la capa externa, respectivamente, que se caracteriza por estructuras en forma de arco. Esta estructura también se correlaciona con las características antigénicas del VEHC; de hecho los principales determinantes antigénicos se localizan en el extremo C-terminal de la VP60 (4, 5, 23, 27).

Desde 1991 se ha identificado un segundo tipo de partícula vírica como componente principal del 5% aproximadamente de las muestras VEHC-positivos, p. ej., aquéllas procedentes de conejos que presentan un curso prolongado de la enfermedad (8). Las características de esta partícula son: i) una superficie lisa y un diámetro menor que el del VEHC; ii) su proteína es de 28–30 kDa; iii) reacciona con el suero de conejo convaleciente frente al VEHC y con aquéllos anticuerpos monoclonales anti-VEHC (MAbs) que reaccionan frente al extremo N-terminal de la VP60 del VEHC; y iv) no produce hemaglutinación (HA). Esta partícula vírica más pequeña corresponde sólo a la capa interna del VEHC y se han propuesto dos hipótesis para explicar su origen. Granzow *et al.* (15) han considerado que procede del genoma truncado del VEHC o de una expresión defectiva. Sin embargo, Barbieri *et al.* (2) observaron lo siguiente: i) una absoluta correlación entre la mayor prevalencia de las partículas lisas del VEHC (I-VEHC) en los órganos y la aparición de IgM específica anti-VEHC a los 3–4 días posteriores a la infección; ii) la presencia de grandes cantidades de I-VEHC sólo en el hígado y bazo y no en el torrente sanguíneo, como sucede durante la fase virémica de la EHC aguda; iii) el descubrimiento de fragmentos de la VP60 con diferentes pesos moleculares (41–30 kDa) durante la transición de VEHC a I-VEHC. Concluyeron, por tanto, que la partícula se origina por un proceso degradativo que es probablemente consecuencia de la eliminación fisiológica de los complejos inmunológicos VEHC-IgM, formados en grandes cantidades al comienzo de la respuesta humoral. A parte de su origen, la identificación de esta segunda partícula en el hígado de un conejo puede considerarse como un marcador de la forma crónica/subaguda de la EHC, que normalmente comprende el periodo de tiempo entre los días 4 y 8 posteriores a la infección y que es seguida por la muerte del conejo o, más frecuentemente, por su recuperación (2).

Todos los aislados víricos conocidos de la EHC parecen pertenecer a un único serotipo. Se conoce la secuencia completa de las cepas de la EHC de diferente localización geográfica. Su comparación revela una estrecha homología global en términos de secuencia genómica, con pocos o ningún cambio predecible en la composición de aminoácidos (diferencias entre 2% y 5%). No obstante, se han descrito aislados que muestran diferencias en las características de la hemaglutinación que dependen de la temperatura (3), y más recientemente se ha identificado simultáneamente en Italia (4) y Alemania (23) una variante del VEHC estable antigénica y genéticamente. Esta variante del VEHC, denominada VEHCa, presenta en los aminoácidos de la región E expuesta en la superficie (aa 344–434), que contiene los epítomos antigénicos principales de los calicivirus, cambios tres veces mayores que en todos los aislados del VEHC secuenciados con anterioridad. Un grupo de MAbs relacionados que protegen de la infección por el VEHC dieron un resultado negativo cuando se probaron mediante ensayo de inmunoenzima (ELISA) frente al antígeno del VEHCa. Sin embargo, conejos vacunados experimentalmente con la vacuna VEHC disponible en la actualidad (RDHV es la referencia en inglés), resultaron protegidos frente al VEHCa, aunque con una menor eficacia (4, 23).

Se ha identificado en conejos sanos otro virus, denominado de manera provisional calicivirus de conejo (RCV) y que está relacionado con el VEHC (6, 7). Es significativamente diferente de los aislados del VEHC caracterizados hasta hoy en términos de patogenicidad, título vírico, tropismo de tejido y secuencia primaria de la proteína estructural. Es avirulento, se replica en el intestino a bajo título y presenta alrededor del 92% de semejanza genómica con el VEHC. Los resultados de los experimentos de protección cruzada parecen indicar que el nuevo virus no infectará liebres. Además, los datos antigénicos y las comparaciones de secuencia han demostrado que está más estrechamente relacionado con el VEHC que con el virus del síndrome de la liebre parda europea (EBHSV).

El VEHC es muy estable y resistente al medio exterior; la infectividad vírica no se reduce por tratamiento con éter o cloroformo y tripsina, por exposición a pH 3.0, o calentando a 50°C durante 1 hora. El virus sobrevive al menos

225 días en una suspensión orgánica mantenida a 4°C, como mínimo 105 días desecado sobre tejido a temperatura ambiente, y al menos 2 días a 60°C, tanto en suspensión orgánica como en estado desecado (24). Asimismo mantiene su capacidad infectiva a bajas temperaturas y es bastante estable durante los procesos de congelación y descongelación. El VEHC se inactiva con hidróxido sódico al 10%, con formaldehído al 1,0–1,4% y mediante beta-propiolactona al 0,2–0,5% a 4°C. Estos tratamientos no alteran la inmunogenicidad del virus.

El conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) es la única especie conocida que resulta afectada por la EHC. Ningún otro lagomorfo, tal como el conejo Volcán de México (*Romerolagus diazzi*), la liebre de California (*Lepus californicus*) o el conejo de cola de algodón (*Sylvilagus floridanus*) de Norteamérica, ha mostrado ser susceptible (16). En la liebre (*Lepus europaeus*) se ha descrito una enfermedad similar, llamada síndrome de la liebre parda europea (EBHS), pero su agente etiológico, que también es un calicivirus, es diferente del VEHC, aunque está relacionado antigénicamente. El alineamiento de las secuencias del RNA genómico del EBHSV y del VEHC muestra un 71% de identidad de nucleótidos y el alineamiento de aminoácidos muestra un 78% de identidad y un 87% de semejanza (27). No se produce infección cruzada mediante la infección experimental de conejos con el EBHSV y de liebres con el VEHC (18). Con el propósito de averiguar la susceptibilidad del conejo de cola de algodón al EBHSV recientemente se han realizado estudios que revelan una seroprevalencia difusa del virus en la población salvaje de estos conejos y la posibilidad de inducir la enfermedad clínica y la mortalidad en un número reducido de conejos de cola de algodón infectados experimentalmente (Lavazza, datos no publicados).

La EHC se caracteriza por una alta morbilidad y una tasa de mortalidad entre el 40% y el 90%. La infección se produce en conejos de todas las edades pero la enfermedad clínica se observa sólo en adultos y en animales jóvenes de más de 40–50 días. Todavía no se conoce el mecanismo patogénico de resistencia en animales jóvenes (8).

La evolución clínica de la enfermedad puede ser hiperaguda, aguda, subaguda o crónica. Las manifestaciones clínicas se han descrito sobre todo en la infección aguda, ya que habitualmente no aparecen síntomas clínicos en la forma hiperaguda mientras que la forma subaguda se caracteriza por síntomas similares pero más leves. El periodo de incubación varía entre 1 y 3 días; la muerte puede producirse 12–36 horas después de la subida de la fiebre (>40°C). Durante un brote de enfermedad, un número limitado de conejos (5–10%) puede mostrar una evolución crónica o subclínica. Estos animales a menudo mueren 1 o 2 semanas más tarde, probablemente debido a una disfunción hepática.

Las lesiones patológicas globales son variables y pueden ser sutiles. Las lesiones primarias consisten en necrosis del hígado y esplenomegalia. Sin embargo, una coagulopatía masiva es normalmente la causa de hemorragias en diversos órganos y de muerte súbita. En la enfermedad subaguda y crónica, se produce ictericia, siendo muy evidente la despigmentación de las orejas, la conjuntiva y la capa subcutánea.

Los síntomas clínicos y las lesiones globales y microscópicas observadas en liebres afectadas por el EBHS son muy parecidos a los descritos en la EHC de conejos. En la necropsia, los principales hallazgos son: edema y congestión de la mucosa traqueal con contenidos hemorrágicos espumosos, degeneración hepática, agrandamiento del bazo e ictericia generalizada (8). La enfermedad en liebres dura un poco más de tiempo y causa una tasa de mortalidad menor (alrededor del 50%) que la EHC en conejos; normalmente el pico máximo de mortalidad en liebres infectadas experimentalmente se observa entre las 60 y las 90 horas después de la infección.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

El hígado contiene el título vírico más alto (desde 10^3 LD₅₀ [dosis letal 50%] a $10^{6.5}$ LD₅₀) y es el órgano de elección para la identificación tanto del VEHC como del EBHSV. La cantidad de virus presente en otras partes del cuerpo es directamente proporcional a la vascularización; de modo que el bazo y el suero son bastante ricos en virus y pueden servir como materiales de diagnóstico alternativos. En particular, se pueden detectar niveles más altos de partículas subvídicos en el bazo que en el hígado de aquellos animales que mueren a consecuencia de la forma subaguda/crónica de la enfermedad (2). El tratamiento inicial de las muestras de diagnóstico es casi idéntico independientemente del método de diagnóstico aplicado, con la excepción de las técnicas de inmunotinción. Un fragmento de órgano se homogeniza mecánicamente en tampón fosfato salino (PBS) al 5–20% (w/v), pH 7.2, se filtra a través de una gasa y se clarifica por centrifugación a 5.000 **g** durante 5 minutos. En esta etapa, el sobrenadante puede examinarse directamente mediante la prueba HA o la técnica ELISA. Si la muestra se observa al microscopio electrónico (ME), es aconsejable realizar una segunda centrifugación a 12.000 **g** durante 15 minutos, antes de la ultracentrifugación final.

Como no se han establecido condiciones de crecimiento satisfactorias ni sustratos celulares de sensibilidad adecuada, no se puede incluir el aislamiento *in vitro* del VEHC o del EBHSV entre los posibles métodos

viroológicos. No se ha conseguido producir la enfermedad inoculando suspensiones de tejidos de conejos infectados y no se ha detectado replicación del virus mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) en 28 especies de vertebrados diferentes a los conejos (24). La inoculación de conejo, por tanto, sigue siendo la única vía de aislamiento, propagación y titulación de la capacidad infectiva del virus.

Se preparan grandes cantidades de antígeno vírico para los reactivos de diagnóstico y para producir vacunas inactivadas derivadas de tejidos. La infección experimental no es práctica como método rutinario de diagnóstico, aunque puede ser útil en el caso de muestras cuyas pruebas dan resultados equívocos (p. ej. HA negativo/ELISA positivo) o para el diagnóstico inicial de la enfermedad en países donde se desconozca la existencia de la EHC.

Para realizar ensayos experimentales con éxito, los conejos utilizados deben ser plenamente susceptibles al virus, p. ej., deberían tener más de 40–50 días y no presentar anticuerpos específicos, ni siquiera títulos bajos. La EHC puede reproducirse empleando suspensiones de hígado filtradas y tratadas con antibiótico, inoculadas por vía intramuscular, intravenosa u oro-nasal. Cuando la enfermedad es clínicamente evidente, los síntomas y las lesiones *post mortem* son similares a aquéllos descritos después de una infección natural. Se registra una elevación de la temperatura corporal entre las 18 y las 24 horas desde el inicio de la infección, seguido, en cerca del 70–90% de los casos, de la muerte, entre las 24 y las 72 horas después de la infección. Unos pocos individuos pueden sobrevivir hasta seis días después de la infección. Los animales que superan la enfermedad muestran sólo hipertermia transitoria, depresión y anorexia pero presentan una acusada seroconversión que puede detectarse fácilmente a los 4–6 días desde el inicio de la infección.

a) Prueba de hemaglutinación (HA)

La HA fue la primera prueba utilizada para el diagnóstico rutinario de laboratorio de la EHC (19). Debe realizarse con eritrocitos (RBCs) humanos del grupo O, recogidos inmediatamente, conservados durante toda la noche en solución de Alsever y lavados con PBS al 0,85% a pH 6,5 (rango 6–7.2). La HA es menos evidente o no existe cuando se emplean RBCs de otras especies. Los RBCs lavados se resuspenden en PBS al 0,75%. El sobrenadante clarificado de un homogeneizado de tejido al 10% de hígado o bazo se diluye a la mitad y se incuba con un volumen igual de RBCs lavados en una placa de microtitulación con pocillos sellados de fondo redondo, preferiblemente a 4°C. Después de 1 hora (puede variar entre 20 minutos a 2 horas) de incubación, la aglutinación a punto final a una dilución >1/160 se considerará positiva. Títulos más bajos deben ser considerados sospechosos y analizados mediante otros métodos. Alrededor del 10% de las muestras encontradas positivas por una técnica ELISA o por ME (microscopía electrónica), dan resultados negativos en HA (HA falso-negativo). Algunos aislados de la EHC pueden exhibir diferencias en las características de hemaglutinación dependiendo de la temperatura (3) y pueden mostrar actividad HA sólo cuando la prueba se realiza a 4°C. No obstante, los resultados falso-negativos en las pruebas HA se detectan principalmente en órganos de conejos que muestran una forma subaguda/crónica de la enfermedad y se deben a las características de las partículas lisas y truncadas I-VEHC.

Los órganos de liebre raramente dan un título significativo cuando se utiliza el protocolo de la prueba HA para el VEHC. Para demostrar actividad HA en órganos procedentes de conejos infectados por el EBHSV, se debe adoptar un procedimiento modificado: todas las etapas se realizan a 4°C, la suspensión del órgano se trata con un volumen igual de cloroformo, y los RBCs se emplean a un pH no mayor de 6,5 (8). Incluso utilizando este método, sólo el 50% de las muestras da resultados positivos. Esto se debe a que la enfermedad en las liebres es con frecuencia subaguda o crónica y, por tanto, el virus presenta las características antigénicas y estructurales típicas de las partículas I-VEHC (8).

Debido a la dificultad práctica de obtención y mantenimiento y el riesgo de trabajar con eritrocitos humanos del grupo O y debido también a la dificultad de obtener resultados reproducibles, esta prueba se ha reemplazado por la detección del virus mediante la técnica ELISA.

b) Microscopía electrónica (ME)

La ME de tinción negativa puede llevarse a cabo utilizando el llamado “método de la gota”. Una rejilla recubierta de formvar y fibra de carbón se coloca sobre una gota de suspensión orgánica (preparada como se describe en la Sección B.1.a.) y se deja durante 5 minutos. Después de eliminar el exceso de líquido con el borde de un pedazo de papel de filtro, la rejilla se coloca flotando sobre una gota de fosfotungstato sódico al 2% (NaPT), pH 6,8, durante 1,5 minutos. El exceso de colorante se elimina y finalmente la rejilla se observa a $\times 25.000$ aumentos.

Se recomienda ultracentrifugar la muestra para concentrar las partículas víricas debido a la baja sensibilidad del método de la gota. El precipitado obtenido después de la ultracentrifugación (al menos 100.000 *g* durante 30 minutos o, alternativamente, se utiliza una Beckman Airfuge a 21 psi durante 5 minutos) se resuspende en PBS o en agua destilada, se coloca sobre una rejilla durante unos pocos minutos y entonces

se tiñe como se ha descrito. Los viriones de la EHC se observan como partículas sin envoltura, de 32–35 nm de diámetro, que presentan una capa interna (25–27 nm de diámetro), delimitada por un borde del cual irradian diez proyecciones cortas y periféricas distribuidas de manera regular. Las partículas lisas (I-VEHC) se identifican por la pérdida completa de las porciones internas, y llegan a ser perfectamente hexagonales y más pequeñas, con sólo visible el borde de la cápsida (2, 8, 14).

Con propósitos diagnósticos y especialmente cuando otros métodos dan resultados dudosos, el mejor método de ME es una técnica de inmuno-ME (IME). Este método emplea o un suero hiperinmune anti-VEHC, obtenido de conejos o de otras especies, o Mabs específicos, que se incuban con un volumen igual de la muestra durante 1 hora a 37°C antes de la ultracentrifugación. La reacción inmunológica induce el agrupamiento de las partículas víricas en agregados que son rápida y fácilmente identificados por ME. También se pueden aplicar métodos de inmunocitoquímica con oro coloidal (inmunogold) para identificar mejor los viriones y las proteínas víricas.

El EBHSV también se puede identificar en muestras de diagnóstico mediante el examen al ME. Además, el método de IME permite identificar al EBHSV utilizando suero anti-EBHSV de convaleciente o MAb anti-EBHS específicos. Es posible diferenciar ambos virus si se emplean antisueros específicos frente al EBHSV y al VEHC.

c) Técnica de enzoinmunoensayo

La detección vírica mediante un ensayo ELISA se lleva a cabo según la técnica tipo 'sandwich' y se han descrito diversas variaciones de la misma. Un procedimiento utiliza los reactivos, soluciones, tiempos y temperaturas que se emplean en el ELISA competitivo (C-ELISA) para pruebas serológicas (véase Sección B.2.b.), excepto que la concentración de Tween 20 es del doble (0,1% [v/v]). Las microplacas usadas deben ser de alta capacidad de adherencia (p. ej. Nunc Maxisorp immunoplate). El homogeneizado de hígado consiste en una suspensión al 10% (w/v) en PBS estándar; en todas las etapas el volumen estándar utilizado es de 50 µl/pocillo. El tampón para la técnica ELISA empleado en todas las etapas es PBS con extracto de levadura al 1% (o seroalbúmina bovina [BSA]), y Tween 20 al 0,1%, pH 7,4. Todas las etapas de incubación son de 50–60 minutos a 37°C con agitación suave. Después de todas las etapas se deben realizar lavados de 3–5 minutos empleando PBS con Tween 20 al 0,05%. Como controles se deben utilizar homogeneizados de hígado de conejo EHC positivo y negativo. El conjugado a la peroxidasa de rábano picante (HRPO) puede ser IgG purificada procedente de un suero policlonal específico o MAb (véase Sección B.2.b.). En diversos laboratorios se han producido MAb anti-VEHC que pueden emplearse en lugar de sueros policlonales de conejo. Más recientemente, se ha conseguido producir MAb que reconocen epítomos específicos expresados sólo por la variante VEHCa (Capucci, datos personales).

Para caracterizar mejor la antigenicidad de los aislados de la EHC mediante un ELISA tipo sandwich, se aconseja probar cada muestra usando cuatro réplicas y posteriormente emplear cuatro diferentes conjugados a HRPO, p. ej. dos MAb que reconozcan el mismo determinante antigénico presente en la superficie vírica y expresado alternativamente por la cepa "clásica" o por la variante VEHCa, un suero policlonal hiperinmune anti-VEHC (que podría identificar una "nueva variante" potencial o un calicivirus relacionado, tal como el EBHSV) y un conjunto de MAb que reconozcan epítomos internos que puedan, de este modo, detectar tanto partículas lisas degradadas I-VEHC como el EBHSV. Se ha descrito una técnica alternativa ELISA de captura antigénica que emplea como anticuerpo de captura uno de oveja anti-VEHC y un MAb para detectar el VEHC (11).

• Procedimiento de la prueba (ejemplo)

Para las etapas que no están indicadas específicamente, véase el procedimiento de la técnica C-ELISA para pruebas serológicas (Sección B.2.b.).

- i) Se recubre la placa con suero hiperinmune anti-VEHC y con suero VEHC negativo. Éste último sirve como control de reacciones inespecíficas (muestras falso-positivas). Para cada muestra, se deben sensibilizar cuatro pocillos con el suero positivo y cuatro con el negativo.
- ii) Se diluye el extracto de hígado a dilución 1/5 y 1/30 (dos réplicas para cada dilución) en tampón para la técnica ELISA (véase antes), directamente en los pocillos de la placa (p. ej. se adicionan 45 µl de tampón en todos los pocillos de la placa, se añaden 10 µl de la muestra a los dos primeros pocillos y entonces, después de mezclar, se transfieren 9 µl a los segundos pocillos). Se tratan los controles, tanto el positivo como el negativo, de la misma manera que las muestras problema.
- iii) Después de la incubación y el lavado (véase más arriba), se incuban con el conjugado a HRPO.
- iv) Después de las últimas series de lavados, se adiciona el sustrato cromogénico. Para el desarrollo final de la reacción se debe emplear orto-fenilendiamina (OPD) como sustrato de peroxidasa. Se utiliza tampón 0,15 M citrato fosfato, pH 5,0, con 0,5 mg/ml de OPD y H₂O₂ al 0,02%. La reacción se para después de 5 minutos adicionando 50 µl de 1 M H₂SO₄.

- v) La lectura de absorbancia se realiza a 492 nm. Las muestras positivas son aquellas que presentan una diferencia de Absorbancia $>0,3$, entre los pocillos recubiertos con suero VEHC-positivo y los pocillos con suero negativo. Normalmente, a la dilución 1/30, las muestras positivas procedentes de conejos con la forma aguda clásica de la EHC dan un valor de Absorbancia $>0,8$, mientras que el valor de una muestra negativa, a la dilución 1/5, varía entre 0,1 a 0,25.

Para el diagnóstico del EBHSV, es posible utilizar la técnica ELISA tipo sandwich específica del VEHC, pero, debido a la gran diferencia antigénica existente entre ambos virus, existe el riesgo de obtener resultados falso negativos. Por consiguiente, es muy recomendable realizar un ELISA tipo sandwich específico del EBHSV, que emplee o un suero de liebre anti-EBHSV positivo y con un elevado título, o MAbs del VEHC de reacción cruzada (5, 8), o MAbs específicos del EBHSV, en vez de suero de conejo (8).

d) Inmunotinción

El tejido fijado en solución tamponada de formalina al 10% e incluido en parafina, se puede inmunotemplar empleando el método del complejo avidina-biotina (ABC) peroxidasa. Las secciones se desparafinan primero en xileno y alcohol, se contratiñen con hematoxilina durante 1 minuto y se lavan con agua corriente. Posteriormente se introducen en un baño de metanol con H_2O_2 al 3% y se lavan tres veces con PBS, durante 5 minutos cada vez. Para reducir la interferencia de fondo debida a la unión inespecífica de anticuerpos, las muestras se incuban con suero de conejo sano durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición de la biotina. Los portas se incuban durante toda la noche en una cámara húmeda a temperatura ambiente con suero biotinilado de conejo anti-VEHC o MAbs, se lavan como antes y se incuban de nuevo durante 30 minutos a 37°C con ABC peroxidasa. Entonces los portas se lavan tres veces. Se emplea amino-etil-carbazol como sustrato. Finalmente, los portas se lavan con agua corriente y se montan (25).

Es característica y específica una tinción intensa nuclear y difusa citoplasmática de las células necróticas del hígado, principalmente en las áreas periportales. También se observa la tinción positiva de los macrófagos y de las células de Kupffer, así como reacciones hepatocelulares. Las reacciones positivas se observan también en los macrófagos de los pulmones, el bazo y los ganglios linfáticos y en las células mesangiales renales (25).

Las criosecciones de tejidos fijadas en metanol pueden inmunotemplarse directamente incubándolas durante 1 hora con MAbs o suero de conejo anti-VEHC conjugados a fluoresceína. Se puede detectar fluorescencia específica en el hígado, en el bazo y en los glomérulos renales.

e) Inmunoelctrotransferencia (*Western blot*)

El análisis por inmunoelctrotransferencia es útil para determinar un diagnóstico definitivo cuando otras pruebas, como la de HA o la de ELISA, dan resultados dudosos (baja positividad) o cuando se sospecha que las muestras contienen partículas I-VEHC.

Las muestras se preparan como se ha descrito previamente y después se tratan con el fin de concentrar las partículas víricas (diez veces) mediante ultracentrifugación (100.000 *g* durante 90 minutos) a través de un colchón de sacarosa al 20% (w/w).

Tanto el sobrenadante como el precipitado se pueden examinar para detectar, respectivamente, las subunidades 6S del VEHC (5) y la proteína estructural VP60 desnaturalizada del VEHC o sus fragmentos proteolíticos, que pueden variar en tamaño desde 50 a 28 kDa. En cada ocasión deberían utilizarse como controles una muestra positiva y otra negativa.

Las proteínas se pueden detectar con anticuerpos policlonales o con MAbs. Si se utilizan MAbs, deben reconocer epítomos continuos. Para detectar el EBHSV también se pueden emplear MAbs específicos de VEHC que reconozcan epítomos internos u ocultos. Los sueros hiperinmunes de conejo anti-VEHC son menos eficaces que los MAbs para reconocer los mismos modelos de bandas (6).

Las proteínas se desnaturalizan a 100°C durante 2 minutos en presencia de 60 mM Tris, pH 6,8, dodecilsulfatosódico al 2% (SDS), beta-mercaptoetanol al 2% y glicerol al 5%, se separan mediante una SDS/PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) al 10% y después se transfieren mediante electrotransferencia a nitrocelulosa o a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno), en 25 mM Tris, 192 mM glicina pH 8,3 y metanol al 20% (v/v), a 1,5 Å durante 60 minutos con refrigeración o a 0,15 A durante toda la noche. Después de la transferencia las membranas se saturan durante 30–60 minutos con seroalbúmina bovina al 2% (BSA), disuelta en tampón fosfato, pH 7,4 y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente con el suero apropiado, diluido en tampón fosfato, pH 7,4 y BSA al 1%. Los filtros se lavan a fondo con PBS y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con las inmunoglobulinas anti-especie marcadas con fosfatasa alcalina y a la dilución predeterminada mediante la titulación. Finalmente,

los filtros se lavan de nuevo y se adiciona el sustrato cromogénico (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato nitro azul de tetrazolio).

Las muestras de las pruebas positivas y el control positivo producirán un modelo que concuerda con la reacción de proteínas de pesos moleculares de, respectivamente, 60 kDa (la proteína estructural única de VEHC) o 41–28 kDa (los fragmentos de la VP60 asociados a la transición del VEHC a I-VEHC), cuando se examina el precipitado y 6 kDa (las subunidades), cuando se examina el sobrenadante.

El análisis mediante electroinmunotransferencia también se puede utilizar para identificar el EBHSV. El procedimiento de la prueba es idéntico. El modelo detectado de bandas de proteínas es similar, ya sea con suero policlonal anti-EBHSV o con MABs anti-VEHC de reacción cruzada. Sin embargo, el porcentaje de muestras en las que se aprecia degradación vírica es mayor y, por tanto, también se observan con frecuencia diversos fragmentos de peso molecular menor, procedentes de la proteína estructural VP60.

f) Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos

La aplicación de la RT-PCR para detectar el ácido nucleico específico del VEHC se ha descrito por parte de varios autores (14, 17). Este método se lleva a cabo con muestras de órganos, orina, heces y sueros, empleando diferentes oligonucleótidos cebadores derivados de la región de la cápsida del genoma del VEHC (porción N-terminal). El cADN obtenido a partir de la reacción de la RT habitualmente se amplifica según describen Baginski *et al.* (1). Para revelar el producto de la PCR, la mezcla de reacción del ADN amplificado se somete a una electroforesis en gel de agarosa. Si es necesario, se puede determinar la especificidad del producto de la PCR mediante secuenciación o transfiriendo el gel de agarosa a un filtro de nylon que puede hibridarse finalmente con una sonda interna marcada y examinarse mediante autorradiografía.

Se ha utilizado un método similar a la RT-PCR para identificar el RCV no patogénico (4). Se emplean diversos cebadores, específicos para el gen de la RNA polimerasa del VEHC y complementarios a los genes de VP60 y ORF2, y los fragmentos se someten a análisis de tipo Southern blot.

La RT-PCR parece ser un método extremadamente sensible para detectar el VEHC, de hecho es 10^4 -veces más sensible que la técnica ELISA (17). No se considera estrictamente necesario para el diagnóstico rutinario pero es más apropiado para estudios de epidemiología molecular, para estudiar las etapas tempranas de la infección y la patogénesis del VEHC y para detectar los viriones en animales jóvenes (<40 días de edad), en hospedadores inespecíficos (otros vertebrados) y vectores (mosquitos y pulgas).

Se ha desarrollado una técnica de hibridación *in situ* que utiliza sondas de ADN, tanto cadenas con sentido como antisentido, para averiguar la presencia del VEHC en muestras tisulares (13). Este método es muy sensible y puede emplearse para el diagnóstico temprano de la EHC porque proporciona resultados positivos en tan sólo 6–8 horas después de la infección. Sin embargo, es costoso y difícil de llevar a cabo por lo que está indicado principalmente para estudios de investigación.

2. Pruebas serológicas

La infección por el VEHC puede diagnosticarse mediante la detección de una respuesta de anticuerpos específicos. Como la respuesta humoral tiene gran importancia en la protección de los animales frente a la EHC, la determinación del título de anticuerpos específicos después de la vacunación o en animales convalecientes permite predecir la capacidad de los conejos de resistir a la infección por el VEHC. Algunos datos epidemiológicos sugieren la existencia de una cepa vírica “apatogénica”, antigénicamente relacionada con el VEHC. De hecho, la presencia de los llamados anticuerpos “adquiridos de modo natural”, que confieren una protección completa frente a la infección por el VEHC, se aprecia en colonias donde no se había descrito previamente ningún brote ni se había realizado una vacunación (24). La existencia de calicivirus no patogénicos proporciona una explicación bastante probable de las discrepancias encontradas en el transcurso de las determinaciones serológicas en poblaciones de conejos tanto de países europeos como de Australia y Nueva Zelanda.

Se han aplicado tres técnicas básicas para el diagnóstico serológico del VEHC: inhibición de la hemaglutinación (HI) (19), ELISA indirecto (I-ELISA) y C-ELISA (8). Cada uno de estos métodos presenta ventajas e inconvenientes. Con respecto a la disponibilidad de los reactivos y a la complejidad técnica para llevar a cabo las pruebas, la prueba HI es el método más conveniente, seguido de la técnica I-ELISA y la C-ELISA, respectivamente. Por otra parte, ambas pruebas ELISAs son más rápidas y fáciles que la HI, particularmente cuando se ensaya un gran número de muestras a la vez. La especificidad de la C-ELISA es marcadamente superior a la alcanzada con los otros dos métodos (8). Se dispone también de una combinación de técnicas ELISA para distinguir las respuestas de anticuerpos IgA, IgM and IgG con el objeto de mejorar la interpretación serológica y la clasificación correcta del estado inmunológico de los conejos. Se ha descrito un método C-ELISA alternativo (10).

a) Inhibición de la hemaglutinación

Antígeno: El antígeno se prepara a partir de hígado de conejo infectado recogido inmediatamente después de la muerte. El hígado se homogeniza en PBS al 10% (w/v), pH 6.4 y se clarifica mediante dos centrifugaciones consecutivas a baja velocidad (500 **g** durante 20 minutos y 6.000 **g** durante 30 minutos). El sobrenadante, extraído del tubo para evitar la capa lipídica superficial, se filtra a través de un filtro de tamaño de poro de 0,22 μm , se titula mediante una prueba de HA y se divide en alícuotas, que se conservan a -70°C .

Muestras de suero: Antes de la prueba, los sueros se inactivan por incubación a 56°C durante 30 minutos. A continuación se tratan con caolín al 25% (dilución final del suero: 1/10) a 25°C durante 20 minutos y se centrifugan. A esto le sigue un segundo tratamiento con caolín, también a 25°C durante 20 minutos, esta vez con la 1/10 parte del volumen de RBCs humanos del grupo O empacados y diluidos al 50%, aproximadamente. Se recogen de inmediato, se conservan toda la noche en solución de Alsever y se lavan con PBS al 0,85%, pH 6,5. Los sueros se clarifican por centrifugación.

• **Procedimiento de la prueba**

- i) Se dispensan 50 μl de suero en el primer pocillo de una placa de microtitulación de fondo redondo y se realizan diluciones al doble en los pocillos 2–8 utilizando PBS con BSA al 0,05%.
- ii) Se añaden 25 μl de antígeno del VEHC que contienen 8 HA unidades a cada pocillo y se incuban la placa a 25°C durante 30–60 minutos.
- iii) Se añaden 25 μl de eritrocitos humanos del grupo O a una concentración del 2–3% a cada pocillo y se deja estático a 25°C durante 30–60 minutos.
- iv) Se titula el antígeno en cada prueba para asegurar que se utilizan 8 HA/ 25 μl y se incluyen controles de suero positivo y negativo.

El título del suero es la dilución a punto final que muestra inhibición de la hemaglutinación. El umbral positivo de títulos del suero se correlaciona con el título de los sueros de control negativo; habitualmente se encuentra en el rango de 1/20–1/80.

Debido a la dificultad práctica de obtener y mantener y el riesgo de trabajar con eritrocitos humanos del grupo O y debido también a la dificultad de obtener resultados reproducibles, esta prueba se está sustituyendo por la prueba serológica ELISA de detección de anticuerpos.

b) Técnica de enzimoimmunoensayo competitivo

Antígeno: todavía no se dispone de una cepa estándar a nivel internacional; sin embargo, como hasta la fecha sólo se ha identificado un serotipo en todo el mundo, se pueden conseguir resultados de gran fiabilidad a partir de diferentes laboratorios, aunque cada uno de ellos utilice su propio virus estándar. Incluso los anticuerpos inducidos por las variantes identificadas del VEHC se pueden reconocer mediante el método estándar descrito aquí. Además, la prueba puede detectar con facilidad anticuerpos originados por la infección de conejos con el RCV no patogénico debido a su alta homología genética con el VEHC (6, 7).

El antígeno se puede preparar como se ha descrito previamente para la HI (Sección B.2.a.), teniendo el cuidado de conservarlo a -20°C en presencia de glicerol al 50% (v/v) para evitar la congelación. Si fuera necesario, se puede inactivar el virus antes de adicionar el glicerol, empleando etilamina binaria (BEI) al 1,0% a 33°C durante 24 horas. Se debe pretitular el antígeno con un ensayo tipo ELISA y entonces se utiliza como reactivo limitante, p. ej., la dilución que corresponda al 60–70% de la altura de la meseta (valor de absorbancia a 492 nm en el rango 1.1–1.3).

Suero anti-VEHC: se pueden obtener por distintos medios sueros policlonales específicos anti-VEHC con un título elevado. Actualmente hay dos métodos que se emplean como se indica a continuación:

- i) Se infectan conejos con un extracto de hígado VEHC-positivo al 10% diluido 1/100 en PBS para obtener sueros de convalecientes (21–25 días) que contienen un alto nivel de IgG anti-VEHC. Debido a la elevada tasa de mortalidad asociada al VEHC, es necesario infectar al menos 10–15 conejos seronegativos o infectar conejos que estén sólo parcialmente protegidos (p. ej., 4–8 conejos infectados a partir del día 3 a 7 post-vacunación). Los conejos que sobrevivan a la infección deben ser sangrados a los 21–25 días transcurridos desde la infección para obtener los sueros de convalecientes. Alternativamente, los conejos convalecientes pueden ser re infectados 3–4 meses más tarde y sangrados 10–15 días después para conseguir sueros hiperinmunes frente al VEHC.
- ii) El VEHC se purifica a partir de hígados de conejos infectados experimentalmente que hayan muerto debido a la forma aguda de la enfermedad (entre 28 y 40 horas después de la infección), empleando alguno de los métodos publicados (5, 8, 9, 20, 22). Entonces el VEHC purificado puede utilizarse para

inmunizar ovejas o cabras de acuerdo con los protocolos clásicos que emplean adyuvantes que contienen aceite. También se puede emplear el mismo procedimiento para inocular conejos si el virus purificado se inactiva antes de la inoculación.

Se pueden utilizar MAbs anti-VEHC en lugar de sueros policlonales de conejo. La purificación de la IgG de conejo y la conjugación a HRPO puede realizarse según indican los protocolos estándar. El anticuerpo conjugado se titula en un ensayo ELISA tipo sándwich en presencia y ausencia de antígeno del VEHC (hígado de conejo negativo). Entonces se utiliza a la dilución más alta que muestre un máximo de Absorbancia (meseta superior). (Si el suero presenta un buen título anti-VEHC, el valor del conjugado a HRPO debe variar entre 1/1.000 y 1/3.000).

Sueros control: el suero negativo se obtiene a partir de conejos plenamente susceptibles a la infección por el VEHC. El suero positivo es o un suero de convaleciente diluido 1/100 en un suero negativo o un suero procedente de un animal vacunado.

• **Procedimiento de la prueba (ejemplo)**

- i) El suero de conejo anti-VEHC diluido a un título predeterminado, p. ej., 1/5.000 en tampón 0.1 M carbonato/ bicarbonato, pH 9,6, se emplea para recubrir una microplaca de alta capacidad de adsorción para ELISA (p. ej., Nunc Maxisorb Immunoplate) a 4°C durante toda la noche.
- ii) Se lava la placa tres veces durante 3–5 minutos cada una de ellas, con PBS, pH 7,4, conteniendo Tween 80 al 0,05% (PBST). Cuando las placas no se van a utilizar de inmediato, pueden almacenarse, dentro de una bolsa de plástico cerrada, durante al menos 3 meses a –20°C.
- iii) Se distribuyen 25 µl/pocillo de PBST con extracto de levadura al 1% (PBSTY) o BSA al 1% (PBST-BSA) en todos los pocillos utilizados de la placa (véase más adelante). Se añaden 7 µl de la primera muestra de suero a los dos primeros pocillos (A1 y B1), 7 µl del segundo suero a los dos segundos pocillos (C1 y D1), y se continúa con el tercero (E1 y F1) y con el cuarto (G1 y H1) suero, hasta completar la primera columna. Si se necesitan datos cualitativos (positivo/negativo), se repite la misma operación en la segunda columna con las muestras de los sueros desde el 5 al 8, y en la tercera columna con las muestras de sueros desde el 9 al 12, y así sucesivamente. Si se necesita determinar el título del suero, éste debe ser diluido posteriormente. Se agita la placa y entonces se utiliza una micropipeta de ocho canales para transferir 7 µl desde los pocillos de la columna 1 a los de la columna 2, lo que corresponde a una dilución a la cuarta de los sueros. Esta última operación se puede repetir una vez más (título 1/160), dos veces (título 1/640) o cuatro veces (título 1/10.240). Tanto en el caso de probar sueros para obtener datos cualitativos (una única dilución) como para conseguir el título final (varias diluciones), se completan las placas dejando 12 pocillos libres para los sueros control. Se añaden 7 µl de sueros positivos a los pocillos G6 y H6, y 7 µl de sueros negativos a los pocillos G9 y H9, entonces se diluyen una y dos veces (1/40–1/160).
- iv) Se añaden 25 µl/pocillo de antígeno en PBSTY a todos los pocillos de la placa, a una dilución doble a la dilución decidida, como ha quedado descrito en la sección del antígeno (véase la primera parte de la descripción del método ELISA).
- v) Se incuba la placa a 37°C en una plataforma de agitación durante 50 minutos.
- vi) Se lava la placa como se describe en la etapa (ii).
- vii) Se añaden 50 µl/pocillo de IgG de conejo anti-VEHC conjugada a HRPO a la dilución decidida, como se ha descrito anteriormente en la sección “suero anti-VEHC” (véase la primera parte de la descripción de la prueba ELISA).
- viii) Se incuba la placa a 37°C en una plataforma de agitación durante 50 minutos y se lava como se ha descrito en la etapa (ii) añadiendo un cuarto lavado de tres minutos de duración.
- ix) Se utilizan 50 µl/pocillo de OPD como donante de hidrógeno bajo las condiciones siguientes: 0,5 mg/ml de OPD en tampón 0,1 M fosfato/citrato pH 5, y H₂O₂ al 0,02%. Se para la reacción después de 5 minutos adicionando 50 µl/pocillo de 1 M H₂SO₄.
- x) Se lee la placa mediante un espectrofotómetro empleando un filtro para lectura a 492 nm.

El título del suero corresponde a la dilución que da un valor de absorbancia igual al 50% (±10) del valor del suero negativo a la dilución 1/160 (valor de referencia).

El suero se considerará negativo cuando el valor de absorbancia de la primera dilución (1/10) se reduzca menos del 20% del valor de referencia, y será positivo cuando dicho valor descienda el 30% o más. Cuando el valor de absorbancia de la dilución 1/10 se reduzca entre el 20 y el 30% del valor de referencia, los

sueros se considerarán dudosos. Se puede encontrar un amplio rango de títulos dependiendo del origen de la muestra. Valores de sueros positivos desde 1/640 a 1/10.240 en conejos convalecientes, de 1/80 a 1/640 en conejos vacunados y desde 1/10 a 1/160 en casos de infección “no patogénica”. Si se conoce el origen de la muestra se podrán seleccionar las diluciones más apropiadas. Si se prueba sólo la primera dilución dará un resultado positivo o negativo. El título se establece probando todas las diluciones, hasta la sexta.

Debido a las diferencias antigénicas significativas que existen entre el VEHC y el EBHSV (8, 27), no se pueden recomendar las técnicas serológicas descritas antes, que utilizan el VEHC como antígeno, para el diagnóstico serológico de la EBHS. Sin embargo, se puede emplear un método ELISA directo para detectar sueros de liebres positivos y negativos frente al EBHSV; de hecho, la adherencia del VEHC en la fase sólida de una placa de microtitulación de ELISA expone determinantes antigénicos de reacción cruzada. Alternativamente, se puede disponer de una prueba C-ELISA específica para el EBHSV de un modo similar utilizando reactivos específicos (antígeno y antisueros), preparados como se ha descrito anteriormente para el VEHC.

c) Técnica de enzimoimmunoensayo con isótopos(ISOELISAs)

Estos ELISAs permiten detectar y titular isótopos de las inmunoglobulinas IgA, IgM y IgG (7). Los títulos de los isótopos son críticos para la interpretación serológica de campo en cuatro áreas principales: anticuerpos de reacción cruzada, resistencia natural de conejos jóvenes, anticuerpos maternos y anticuerpos en conejos infectados previamente (12),

Para detectar la IgG específica del VEHC, se adhiere un MAb específico del VEHC a una placa Maxisorp a una concentración de 2 µg/ml mediante el método descrito anteriormente para el suero policlonal en la prueba C-ELISA (véase la anterior Sección B.2.b, etapa (i)) del procedimiento de la prueba. Se añade el virus a las placas a una concentración doble a la empleada en el C-ELISA y después de la incubación y el lavado, se adicionan los sueros y se realizan diluciones seriadas a la cuarta comenzando por la 1/40. Se emplea un MAb anti-IgG de conejo conjugado a HRPO para detectar la IgG unida al virus. La etapa final de los ISOELISAs para IgG, IgM e IgA consiste en la adición de OPD y H₂SO₄, como en la C-ELISA. Para detectar los isótopos IgM e IgA se invierten las fases de la reacción ELISA con el fin de evitar la competición con la IgG, que habitualmente es el isótopo predominante. Se adhiere a los pocillos un MAb anti-IgM de conejo o un anti-IgA de conejo y entonces los sueros se diluyen como se ha descrito anteriormente. A continuación se incuban con el antígeno y entonces se utiliza un MAb conjugado a HRPO para detectar el VEHC unido en la placa. Se considerarán positivos los sueros si el valor de OD₄₉₂ (densidad óptica) a la dilución 1/40 es más de 0,2 unidades de OD (dos desviaciones estándar) por encima del valor del suero negativo utilizado como control. El título de cada suero se considera como la última dilución que da un valor positivo. Debido a que las pruebas ISOELISA no siguen metodologías idénticas, títulos equivalentes no implican que los isótopos estén presentes en las mismas cantidades.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

En todos los países donde la EHC es endémica, se realizan controles indirectos de la enfermedad mediante vacunación empleando el tipo apropiado de vacuna, que se prepara a partir de una suspensión clarificada de hígado de conejos infectados experimentalmente y que posteriormente se inactiva y se le adiciona un adyuvante. Los métodos de inactivación (formaldehído, beta-propiolactona u otras sustancias) y los adyuvantes empleados (aceite mineral incompleto o hidróxido de aluminio), pueden variar de acuerdo con el protocolo utilizado por los diferentes fabricantes.

En los últimos diez años se han llevado a cabo diversos estudios sobre la expresión de la proteína de la cápside del VEHC en *Escherichia coli*, en el virus vaccinia y en un myxovirus atenuado (MV). Además, varios autores han demostrado que una proteína recombinante de la cápside, VP60, expresada en el sistema de expresión baculovirus/célula Sf9 se autoensambla en el interior de partículas de tipo virus (VLPs), que son idénticas desde el punto de vista estructural y antigénico a los viriones de la EHC. Mientras que la proteína de fusión expresada en *E. coli* es muy insoluble y de inmunogenicidad baja, se puede conseguir una inmunización activa con VLPs obtenidas en el sistema de baculovirus, utilizando recombinantes vaccinia, MV y canarypox, administrados por vía intramuscular u oral. En particular los conejos vacunados con el recombinante MV que expresa la proteína de la cápsida del MHDV, están protegidos frente a los virus de desafío letales del VEHC y MV. Los virus recombinantes resultantes también son capaces de transmitirse horizontalmente y proporcionar protección a los animales de contacto, lo que da la oportunidad de inmunizar a la población de conejos silvestres (26). De forma similar, la inmunogenicidad de las VLPs administradas por vía oral como alternativa a la inmunización parenteral, ofrece una forma económica y práctica de administrar una vacuna para la inmunización en masa de animales silvestres.

Más recientemente se ha expresado la proteína estructural VP60 en plantas transgénicas con un nuevo vector (PPV-NK) basado en el poxvirus de ciruela (PPV) o en plantas transgénicas de patata bajo el control del promotor

35S, modificado o no, del virus del mosaico de la coliflor. En ambos casos la inmunización de conejos con extractos de plantas *Nicotiana clevelandii* infectadas con la quimera PPV-NK VP60 y con extractos de hojas de patatas que portan el promotor 35S modificado, respectivamente, induce una respuesta inmune eficaz que protege a los animales frente a un virus letal de la EHC.

Sin embargo, hasta el presente, no se dispone comercialmente ni están todavía registradas vacunas recombinantes.

En Francia, se ha registrado y comercializado recientemente una vacuna (Dercunimix®, Merial) que es una combinación de una vacuna tradicional de la EHC derivada de hígado inactivado y una vacuna de Myxovirus viva atenuada, y que puede administrarse por vía intradérmica.

El programa habitual consiste en administrar dos veces la vacuna inactivada con un intervalo de al menos 2 semanas. Normalmente, se inocula una dosis subcutánea de 1-ml en la región del cuello. En aquellas explotaciones sin historial de enfermedad, donde la anamnesis para la EHC sea negativa, se aconseja vacunar sólo al pie de cría; la primera inyección debería administrarse a los 2–3 meses de edad. Es muy recomendable una revacunación anual para asegurar un buen nivel de protección, aunque los datos experimentales indican que la protección perdura habitualmente durante un largo intervalo de tiempo (más de 1 año). La vacunación de animales para la producción de carne no es necesaria si la enfermedad no ha tenido lugar en la granja. Después de un brote de EHC, incluso si se han adoptado medidas sanitarias y de higiene, incluyendo la limpieza y desinfección, la eliminación segura de los cadáveres y la espera de un cierto periodo de tiempo antes de la repoblación, es muy recomendable vacunar a los animales destinados al consumo de carne a los 40 días de edad porque la incidencia de la reinfección es muy alta. Se aconseja dejar de vacunar a estos animales sólo después de varios ciclos de producción. Se debería vacunar un número variable de conejos, comenzando con un pequeño grupo de animales centinela, para verificar la persistencia de la EHC infectiva dentro de la explotación.

Los animales vacunados producen rápidamente inmunidad frente a la infección por el VEHC; por tanto, la vacunación se considera efectiva en la protección de conejos no expuestos y su utilización primaria se encuentra en conejeras donde se haya diagnosticado un brote de la enfermedad; una vez confirmada la EHC en algunos conejos enfermos o muertos, los restantes animales sanos serán vacunados de inmediato.

La administración de suero inmune también es efectiva al producir una protección rápida, aunque poco duradera, frente a la infección por el VEHC.

La vacuna se debe conservar a 2–8°C y no se debería congelar ni exponer a luz intensa o altas temperaturas.

1. Control del inóculo

a) Características del inóculo

La fuente de inóculo vírico para producir vacunas de tejidos inactivados consiste en homogeneizados de hígado infectado obtenido por pases seriados en conejos que han sido inoculados con una suspensión vírica purificada de la EHC. Esta última se obtiene a partir de una suspensión de hígado diluida 1/5 en PBS (w/v) y centrifugada a 10.000 **g** durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se trata con polietilenglicol (PEG 6000) al 8% (v/v) durante toda la noche a 4°C. El precipitado se resuspende a una dilución 1/10 en PBS y, a continuación, se centrifuga a 10.000 **g** durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifuga a 80.000 **g** durante 2 horas a 4°C a través de un colchón de sacarosa al 20%. El precipitado se resuspende en PBS (1/100 del volumen inicial). A continuación, esta suspensión vírica se caracteriza mediante un examen al ME de tinción negativa, por la determinación de la reactividad en un ensayo ELISA y por la capacidad de HA a temperatura ambiente a una elución baja (el título de HA frente a RBCs humanos del grupo O superior a 1/1.280). El virus del inóculo se titula antes de usar y debe contener al menos 10⁵ LD₅₀. Se tiene que conservar congelado (–70°C) o liofilizado.

b) Método de cultivo

Hasta la fecha, la replicación del VEHC se puede realizar exclusivamente en animales susceptibles. Los conejos utilizados para la inoculación se seleccionan a partir de colonias que muestran ser susceptibles a la enfermedad mediante pruebas serológicas periódicas. Los animales (de al menos cuatro meses de edad) deben mantenerse en estricta cuarentena desde la llegada, en un área separada y criarse bajo condiciones sanitarias adecuadas (véase *Equipamiento y servicios del laboratorio animal* en el Capítulo 1.1.6.). La propagación del virus del inóculo y la producción de lotes de vacunas se basa en el mismo protocolo que la infección experimental y supone la inyección intramuscular de una dosis de al menos 100 LD₅₀.

c) Validación como vacuna

Se debe demostrar que el virus del inóculo empleado en la producción de la vacuna está libre de otros virus, bacterias, micoplasmas y hongos. El virus del inóculo se controla mediante la inoculación directa en conejos susceptibles y se continúa con la evaluación de los síntomas clínicos a lo largo del curso de la infección experimental. Un adecuado inóculo vírico debe causar la muerte del 70–80% de los conejos entre las 24–72 horas después de la inoculación, presentando las lesiones de órganos internos características de la EHC. Para validar esta prueba, debe realizarse el examen global e histopatológico de todos los conejos para excluir enfermedades intercurrentes.

2. Método de producción

Después de la inoculación de conejos susceptibles, se recogen el hígado y el bazo de los conejos que mueran entre las 24 y las 72 horas después de la inoculación. Los órganos se pican en una solución diluida 1/10 (w/v) de PBS estéril, pH 7,2–7,4 y la mezcla se homogeniza durante 10 minutos en una picadora en condiciones refrigeradas. Entonces la mezcla se trata con cloroformo al 2% (18 horas a 4°C) y posteriormente se centrifuga a 6.000 **g** durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante se recoge mediante una bomba a alta presión continua y seguidamente se inactiva. La suspensión vírica se ensaya utilizando la prueba HA y la técnica ELISA (véase Sección C.3.) y, una vez que se conozca el número de unidades de HA a partir de la titulación inicial, se añade más PBS estéril en cantidad suficiente para conseguir, después de la inactivación y de la adherencia al adyuvante, una concentración de 640–1.280 unidades de HA/dosis en el producto comercial. Varios agentes han demostrado ser efectivos para impedir la infectividad vírica. Los más frecuentemente empleados son formaldehído y beta-propiolactona, que pueden utilizarse a diferentes concentraciones y temperaturas por periodos variables de tiempo y también en combinación. Durante la inactivación, se aconseja agitar continuamente el líquido. Entonces se incorporan a la vacuna como adyuvantes hidróxido de aluminio, el adyuvante incompleto de Freund u otra emulsión de aceite. Finalmente se añade un conservante, tiomersal (mertiolato), a una dilución 1/10.000 (v/v) antes de la distribución en botellas.

3. Control interno

Contenido de antígeno: El título de la EHC se determina antes de la inactivación calculando el título de HA, que debe ser superior a 1/1.280, y la reactividad en la prueba ELISA. Ambos valores se determinan de nuevo tras la inactivación y adsorción del antígeno al adyuvante. La ME de tinción negativa confirma la identidad del virus de la EHC.

Esterilidad: Los órganos se analizan para determinar la presencia de bacterias, virus, hongos y micoplasmas viables, de acuerdo al protocolo utilizado para probar el virus del inóculo original. La solución PBS y el gel de hidróxido de aluminio se esterilizan por autoclave; la emulsión de aceite se esteriliza por calor durante 1 hora a 160°C.

Inactivación: Antes de incorporar el adyuvante debe demostrarse que el agente inactivante y el proceso de inactivación, serán eficaces bajo las condiciones de fabricación. Así, se lleva a cabo en cada lote una prueba, tanto en la etapa previa al procesamiento como en el producto final. Se inoculan cinco conejos con una dosis de 2-ml de suspensión y se mantienen cinco conejos sin vacunar como controles. Después de 10 días, se demuestra la adecuada inactivación y la falta de efectos secundarios adversos por la ausencia de síntomas clínicos y por los incrementos similares en el peso de los dos grupos. Al final de los ensayos, los animales se sacrifican y los extractos de hígado se ensayan mediante las pruebas HA, ELISA y ME.

4. Control de lotes.

Se deben llevar a cabo pruebas de esterilidad, inocuidad y potencia en cada lote de la vacuna final; deben realizarse pruebas para determinar la duración de la inmunidad una vez que se utilice un lote típico de vacuna y pruebas de estabilidad empleando tres lotes.

a) Esterilidad

Se debe probar la presencia de bacterias, virus, hongos y micoplasmas viables en cada lote de vacunas, de acuerdo con el mismo protocolo recomendado para probar el virus del inóculo original.

b) Inocuidad

Se deben inocular diez conejos por las vías recomendadas, suministrando en tres ocasiones la dosis vacunal. Los conejos se observan durante 3 semanas. No deben desarrollar ninguna reacción local ni sistémica anormal.

c) Potencia

Se vacunan diez conejos adultos seronegativos, que tengan al menos 4 meses de edad, con una dosis completa de vacuna suministrándola por la vía recomendada. Se vacunan otros dos grupos de cinco animales cada uno con una dilución 1/4 y 1/16 de la dosis completa, respectivamente. Se mantiene un cuarto grupo de diez conejos no vacunados como controles. Todos los animales se enfrentan al virus objeto de la prueba transcurridas cuatro semanas desde la vacunación mediante la inoculación intramuscular de una dosis del VEHC que contenga al menos 100 LD₅₀ o que presente un título de HA superior a 1/2560. Los conejos no vacunados deberían mostrar síntomas de infección y su tasa de mortalidad ser mayor del 70%. Entonces se determina la respuesta de anticuerpos de cada animal vacunado con referencia a los antisueros estándar titulados; la media del nivel de anticuerpos no debería ser significativamente menor al nivel registrado en la prueba de protección realizada empleando como vacuna el virus del inóculo inactivado.

d) Duración de la inmunidad

Los datos recogidos en la literatura indican una duración larga de la inmunidad inducida por una única vacunación (hasta 15 meses). Sin embargo, se aconseja llevar a cabo la siguiente prueba: 20 conejos vacunados una vez se dividen en cuatro grupos y se les realiza pruebas serológicas mensuales a lo largo de un año. Cada grupo se inocula con un VEHC virulento a los 3, 6, 9 meses o 1 año después de la vacunación (véase Sección C.4.c.). La infección con el virus de desafío objeto de la prueba debería producir una seroconversión elevada, directamente relacionada con el tiempo transcurrido desde la vacunación. La ausencia de síntomas clínicos y de mortalidad demuestra que el VEHC no se ha multiplicado.

e) Estabilidad

Deben proporcionarse evidencias que demuestren que la vacuna pasa la prueba de potencia de lotes tres meses después del periodo de validez sugerido.

f) Conservantes

Normalmente se necesita un conservante adecuado para vacunas en envases multidosis (véase Sección C.2.). Se debe probar su persistencia a lo largo del periodo de validez.

g) Precauciones (riesgos)

Cuando se preparan vacunas con emulsiones de aceite, los vacunadores deben protegerse del riesgo y consecuencias de una autoinyección accidental, que debe ser tratada urgentemente como una herida por "inyección de grasa" ('grease-gun').

5. Pruebas sobre el producto final

Las pruebas de inocuidad, potencia y esterilidad del producto final deben llevarse a cabo después del embotellado y envasado. Así, es importante que estas dos últimas etapas de producción se realicen siguiendo los adecuados procedimientos estandarizados de manufactura. Las pruebas se realizan extrayendo muestras de la vacuna a partir de un número determinado estadísticamente de contenedores multidosis (20 o 100 dosis) tomados al azar.

a) Inocuidad

Véase Sección C.4.b.

b) Potencia

Véase Sección C.4.c.

c) Esterilidad

Véase Sección C.4.a.

REFERENCIAS

1. BAGINSKI I., CHEMIN I., BOUFFARD P., HANTZ O. & TREPO C. (1991). Detection of polyadenilated RNA in hepatitis B virus infected peripheral blood mononuclear cells by polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.*, **161**, 996–1000.

2. BARBIERI I., LAVAZZA A., BROCCHI E., KONIG M. & CAPUCCI L. (1997). Morphological, structural and antigenic modifications of rabbit haemorrhagic disease virus in the course of the disease. Proceedings of the 1st Symposium on Calicivirus of the European Society of Veterinary Virology (ESVV), Reading, UK, 15–17 September 1996, 182–193.
3. CAPUCCI L., CHASEY D., LAVAZZA A. & WESTCOTT D. (1996). Preliminary characterisation of a non-haemagglutinating strain of rabbit haemorrhagic disease virus from the United Kingdom. *J. Vet. Med. [B]*, **43**, 245–250.
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.*, **58**, 115–126.
5. CAPUCCI L., FRIGOLI G., RONSHOLT L., LAVAZZA A., BROCCHI E. & ROSSI C. (1995). Antigenicity of the rabbit hemorrhagic disease virus studied by its reactivity with monoclonal antibodies. *Virus Res.*, **37**, 221–238.
6. CAPUCCI L., FUSI P., LAVAZZA A., PACCIARINI M.L. & ROSSI C. (1996). Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J. Virol.*, **70**, 8614–8623.
7. 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.*, **140**, 647–650.
8. CAPUCCI L., SCICLUNA M.T. & LAVAZZA A. (1991). Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and European brown hare syndrome. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **10**, 347–370.
9. CAPUCCI L., SCICLUNA M.T., LAVAZZA A. & BROCCHI E. (1990). Purificazione e caratterizzazione dell'agente eziologico della malattia emorragica virale del coniglio. *Sel. Vet.*, **31**, 301–312.
10. COLLINS B.J., WHITE J.R., LENGUAS C., BOYD V. & WESTBURY H.A. (1995). A competition ELISA for the detection of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet. Microbiol.*, **43**, 85–96.
11. COLLINS B.J., WHITE J.R., LENGUAS C., MORRISSY C.J. & WESTBURY H.A. (1996) Presence of rabbit haemorrhage disease virus antigen in rabbit tissues as revealed by a monoclonal antibody dependent capture ELISA. *J. Virol. Methods*, **58**, 145–154.
12. COOKE B.D., ROBINSON A.J., MERCHANT J.C., NARDIN A. & CAPUCCI L. (2000). Use of ELISAs in field studies of rabbit haemorrhagic disease (EHC) in Australia. *Epidemiol. Infect.*, **124**, 563–576.
13. GELMETTI D., GRIECO V., ROSSI C., CAPUCCI L. & LAVAZZA A. (1998). Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (VEHC) by *in situ* hybridization with a digoxigenin labelled RNA-probe. *J. Virol. Methods*, **72**, 219–226.
14. GOULD A.R., KATTENBELT J.A., LENGHAUS C., MORRISSY C., CHAMBERLAIN T., COLLINS B.J. & WESTBURY H.A. (1997). The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease virus (Czech strain V351): use of the polymerase chain reaction to detect replication in Australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation. *Virus Res.*, **47**, 7–17.
15. GRANZOW H., WEILAND F., STREBELOW H.-G., LU C.M. & SCHIRMEIER H. (1996). Rabbit hemorrhagic disease virus (VEHC): ultrastructure and biochemical studies of typical and core-like particles present in liver homogenates. *Virus Res.*, **41**, 163–172.
16. GREGG D.A., HOUSE C., MEYER R. & BERNINGER M. (1991). Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **10**, 435–451.
17. GUITTRE C., BAGINSKI I., LE GALL G., PRAVE M., TREPO O. & COVA L. (1995). Detection of rabbit haemorrhagic disease virus isolates and sequence comparison of the N-terminus of the capsid protein gene by the polymerise chain reaction. *Res. Vet. Sci.*, **58**, 128–132.
18. LAVAZZA A., SCICLUNA M.T. & CAPUCCI L. (1996). Susceptibility of hares and rabbits to the European Brown Hare Syndrome Virus (EBHSV) and Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (VEHC) under experimental conditions. *J. Vet. Med. [B]*, **43**, 401–410.
19. LIU S.J., XUE H.P., PU B.Q. & QUIAN N.H. (1984). A new viral disease in rabbits. *Anim. Hus. Vet. Med.*, **16**, 253–255.

20. MEYERS G., WIRBLICH C. & THIEL H.J. (1991). Rabbit haemorrhagic disease virus – molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology*, **184**, 664–676.
21. MEYERS G., WIRBLICH C. & THIEL H.J. (1991). Genomic and subgenomic RNAs of rabbit haemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology*, **184**, 677–686.
22. OHLINGER R.F., HAAS B., MEYERS G., WEILAND F. & THIEL H.J. (1990). Identification and characterization of the virus causing rabbit haemorrhagic disease. *J. Virol.*, **64**, 3331–3336.
23. SCHIRRMAYER H., REIMANN I., KOLLNER B. & GRANZOW H. (1999). Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (VEHC) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants. *Arch. Virol.*, **144**, 719–735.
24. SMID B., VALICEK L., RODAK L., STEPANEK J. & JURAK E. (1991). Rabbit haemorrhagic disease: an investigation of some properties of the virus and evaluation of an inactivated vaccine. *Vet. Microbiol.*, **26**, 77–85.
25. STOERCKLE-BERGER N., KELLER-BERGER B., ACKERMANN M. & EHRENSPERGER F. (1992). Immunohistological diagnosis of rabbit haemorrhagic disease (EHC). *J. Vet. Med. [B]*, **39**, 237–245.
26. TORRES J.M., RAMIREZ M.A., MORALES M., BARCENA J., VAZQUEZ B., ESPUNA E., PAGES MANTE A. & SANCHEZ-VIZCAINO J.M. (2000). Safety evaluation of a recombinant myxoma-VEHC virus inducing horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. *Vaccine*, **19**, 174–182.
27. WIRBLICH C., MEYERS G., OHLINGER V.F., CAPUCCI L., ESKENS U., HAAS B. & H.-J. THIEL (1994). European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit haemorrhagic disease virus and other caliciviruses. *J. Virol.*, **68**, 5164–5173.

*

* *

NB: Existe un laboratorio de referencia de la OIE para la Enfermedad hemorrágica del conejo (véase el Cuadro en la Parte 3 de este *Manual de animales terrestres* o consúltese la página Web de la OIE para conseguir la relación más actualizada: www.oie.int).