

DIAGNÓSTICO MEDIANTE PCR-DUPLEX DE LA NUEVA VARIANTE RHDVb DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA EN CONEJOS.

Sarto, P.¹, Calvo, J.H.^{1,2}, Calvo, A.J.³, Monroy, F.³, Calvete, C.¹

¹ CITA Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza. ² ARAID. ³ TRAGSATEC, Gerencia Sanidad Animal, Julián Camarillo 6 B, 28037 Madrid. mpsarto@aragon.es

INTRODUCCIÓN

La enfermedad hemorrágica vírica del conejo (RHD) es una enfermedad altamente contagiosa compartida entre el conejo silvestre y el doméstico, si bien en la mayoría de las ocasiones se podría considerar a aquel como el principal reservorio de la enfermedad para la cunicultura doméstica. Esta enfermedad suele cursar con elevadas mortalidades en las explotaciones cunícolas, especialmente entre los reproductores y hacia la finalización del cebo, siendo una enfermedad fácilmente controlable mediante la aplicación de un protocolo de vacunación. Esta enfermedad es enzoótica en las poblaciones de conejo silvestre, con brotes epizooticos que suelen aparecer en primavera u otoño. El agente etiológico de la misma es un miembro del grupo de los calicivirus, grupo caracterizado por su facilidad para mutar y originar nuevas variantes. El virus RHD, aparentemente, se originó a partir de un ancestro no patogénico presente en el Centro y Norte de Europa. En la Península Ibérica no se han encontrado evidencias de que existiese ese ancestro no patogénico, de tal forma que todas las cepas de RHD aisladas hasta la actualidad parecen proceder de una única cepa patógena causante de las primeras epizootias ocurridas a finales de los años ochenta, sugiriendo el aislamiento geográfico de la Península Ibérica respecto del resto de Europa debido al efecto barrera de los Pirineos (Alda *et al.*, 2010).

No obstante, durante el año 2011, se detectaron, inicialmente en el tercio norte de España, una serie de brotes de RHD que cursaron de forma atípica, con incremento de la mortalidad en las granjas afectadas incluso en animales con menos de 30 días de edad, y con una clara y grave disminución de la eficacia de la vacunación (Comenge y Mora, 2011). La epidemiología de estos brotes atípicos se asemejó mucho a la denunciada en brotes de RHD acaecidos en Francia meses antes (desde octubre de 2010) y en donde se identificó, como agente etiológico, una nueva variante del virus relativamente diferente de las aisladas hasta entonces en ese país (LeGall-Reculé *et al.*, 2011). La caracterización del agente etiológico implicado en los brotes de mortalidad acaecidos en granjas cunícolas españolas confirmó la presencia de esta nueva variante emparentada genéticamente con los calicivirus apatógenos del conejo, denominándola RHDVb (Dalton *et al.*, 2012), que también fue detectada simultáneamente afectando a poblaciones de conejo silvestre ubicadas en la finca experimental "El Vedado" perteneciente al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) y localizada en el municipio de Zuera (Zaragoza) (Calvete *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se presenta la puesta a punto de un protocolo que permite identificar las dos variantes del virus mediante PCR-Duplex, así como la evolución de la prevalencia de ambas variantes víricas en los casos de mortalidad por RHD acaecidos en una población experimental de conejos silvestres.

MATERIAL Y MÉTODOS

Dentro de un proyecto orientado a profundizar en el conocimiento de la epidemiología de la RHD, financiado a través de un Convenio de Colaboración por el Grupo TRAGSA, y desarrollado en el CITA durante los años 2008-2011, en 2009 se creó una población de conejos silvestres en la finca experimental "El Vedado". Esta población fue monitorizada desde 2009 hasta 2012, con una frecuencia bisemanal, con el objetivo, entre otras cosas, de hallar cadáveres de conejos muertos que fueron llevados al laboratorio para proceder a su necropsia e identificación del virus RHD en tejido hepático.

Para la identificación del virus, la extracción del ARN se realizó usando *TRI@REAGENT* (Sigma Life Science). El ADNc fue obtenido utilizando el kit *SuperScript@III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) y cebadores específicos del gen que codifica la proteína de la cápside VP60: 5'-GCAACCGAGTACCTGGAGGG-3' y 5'-CCAATTGTTACTGGCAGTGGT-3' (Moss *et al.*, 2010). Posteriormente, sobre el ADNc específico de la proteína VP60 se realizó

una amplificación específica mediante PCR, utilizando los cebadores: 5'-TTGGAACCTTGAATGGCAGCA-3' y 5'-TCACCGGTGCGCCTGACGAC-3' (Moss *et al.*, 2010), siendo las condiciones de amplificación las descritas por Alda *et al.* (2010). Este protocolo de diagnóstico fue aplicado, en primer lugar, a 140 muestras pertenecientes tanto a conejos encontrados muertos en la población experimental (durante los años 2009-2011), con casuística de mortalidad diversa, entre los que se incluyeron ejemplares muertos por alguna de las dos variantes de RHD, como a conejos muertos tras la inoculación experimental con la variante clásica.

Posteriormente, mediante el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) se alinearon las secuencias obtenidas en este estudio y se diseñaron cebadores específicos para la cepa clásica de RHD (código GenBank JQ627640) y la nueva variante RHDVb (código GenBank JQ627641) mediante el programa Primer 3 (<http://primer3.wi.mit.edu/>): 5'-GCTTCCCTGACATGTCGTTTC-3' y 5'-GCAACAATCTGTGAGCCTGA-3' (variante clásica); 5'-CCAAATTGCTCCAGATGGTT-3' y 5'-AATCCTGTTTGGCTGAGGTG-3' (variante RHDVb). De esta manera, sobre 2.5 µ de ADNc específico de la proteína VP60 obtenido tras la retrotranscripción se realizó una PCR-Duplex, con los cebadores anteriormente descritos, con el fin de diagnosticar la presencia del virus y la variante implicada. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo 7.5 pmol de cada cebador, 200 µM dNTPs, 2.2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, 1 U *Taq* polymerase (Hotsplit, Biotools, Spain) y 2.5 µl de cDNA obtenido tras la transcripción. Las condiciones de amplificación fueron 30 ciclos: 94°C 45 s, 60°C 45 s y 72°C 45 s.

Este nuevo protocolo de diagnóstico fue aplicado de nuevo únicamente a las muestras procedentes de conejos encontrados muertos en la población experimental con el fin de estimar la variación de la prevalencia relativa de ambas variantes en los casos de mortalidad a lo largo del período de estudio. En este caso se incluyeron también las muestras obtenidas durante el año 2012.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el primer protocolo se obtuvo una amplificación positiva en 55 muestras de hígado de las 140 analizadas. Estas muestras se secuenciaron identificando 40 muestras como variante clásica y 15 como RHDVb. Posteriormente, utilizando la PCR dúplex basada en las secuencias que amplificaban fragmentos del ADN que codifica para la proteína de la cápside VP60 de 199 y 343 pares de bases (pb) para la variante clásica y la nueva RHDVb, respectivamente, se diagnosticaron, sobre las 140 muestras iniciales, 52 animales positivos a la cepa clásica original, y 34 a la RHDVb. La especificidad de la técnica entre la PCR-Duplex y el diagnóstico por secuenciación fue del 100%.

En total se encontraron 89 animales positivos a RHD frente a los 55 encontrados con los cebadores descritos por Moss *et al.* (2010). Este incremento de casos positivos pudo ser debido a la mayor especificidad de los cebadores, así como a la mayor sensibilidad de la técnica, siendo capaces de detectar menores tasas víricas en hígado. Así, la PCR-duplex, mostró una mayor especificidad en el diagnóstico, disminuyendo el número de falsos negativos, permitiendo diferenciar entre las dos variantes víricas en un solo proceso.

Respecto a la evolución de la prevalencia de ambas variantes en los casos de mortalidad por RHD, en la Tabla 1 se puede observar cómo la variante clásica fue la única identificada en los años 2009 y 2010. No obstante durante 2011, año en el que se detectó la RHDVb, su prevalencia bajó al 26%, siendo no detectada en ninguno de los casos ocurridos en 2012, en los que únicamente fue detectada la nueva variante. En tres de las muestras analizadas en 2011 se detectaron evidencias de coinfección por ambas variantes, todas ellas en conejos jóvenes del año. Aunque no es imposible descartar una coinfección simultánea, probablemente estos casos se debiesen a animales jóvenes portadores asintomáticos de la variante clásica que murieron como consecuencia de la infección por la RHDVb. En cualquier caso, la evolución de las prevalencias observada en este trabajo evidencian una clara ventaja competitiva de la nueva variante RHDVb que, virtualmente, parece haber desplazado a la variante clásica preexistente. Teniendo en cuenta que el conejo silvestre es el principal reservorio de esta enfermedad para los conejos domésticos, estos resultados tienen una gran implicación en la cunicultura doméstica ya que sugieren que la nueva variante será el principal, sino el único, agente etiológico de la RHD en un futuro próximo y que, por lo tanto, parece imperativo que las vacunas comerciales incorporen cuanto antes esta nueva variante frente a la variante RHDVb.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alda, F., Gaitero, T., Suarez, M., Merchán, T., Rocha, G. & Doadrio, I. 2010. *BMC Evol. Biol.* 10:347.
- Calvete, C., Calvo, J.H., Sarto, M.P. 2012. XXXVII Symposium de Cunicultura de La Asociación Española de Cunicultura (ASESCU). Barbastro (Huesca). 112-115p.
- Comenge, J. & Mora, F.X. 2011. *Cunicultura* 36(213):7-10.
- Dalton, K.P., Nicieza, I., Balseiro, A., Muguera, M.A., Rosell, J.M., Casais, R., Alvarez, A.L., Parra, F. 2012. *Emerg. Infec. Dis.*, 18:2009-2012.
- Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Boucher, S., Le Normand, B., Plassiart, G., Portejoie, Y., Decor, s A., Bertagnoli, S., Guérin, J.L. & Marchandeu S. 2011. *Vet. Rec.* 168:137-138.
- Moss, S.R., Turner, S.L., Trout, R.C., White, P.J., Hudson, P.J., Desai, A., Armesto, M., Forrester, N.L. & Gould, E.A. 2002. *J. Gen. Virol.*, 83(10):2461-2467

Agradecimientos: Este trabajo es resultado de un proyecto de I+D+i financiado a través de un Convenio de Colaboración por el Grupo TRAGSA, y desarrollado por la Gerencia de Sanidad Animal del citado Grupo y el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Este Centro también ha participado con la financiación de los trabajos realizados durante 2012.

Tabla 1: Evolución de la prevalencia (%) de ambas variantes víricas en los casos de mortalidad por RHD a lo largo del estudio.

	2009	2010	2011	2012
Muestras analizadas	4	65	40	30
Muestras positivas a RHD	3	24	34	9
Muestras RHDV clásica	3	24	9	0
Muestras RHDVb	0	0	25 *	9

* Tres muestras con evidencia de coinfección por ambas variantes.

DETECTION AND DIAGNOSIS OF THE NEW VARIANT RHDVb OF RABBIT HAEMORRHAGIC DISEASE VIRUS IN WILD RABBITS IN SPAIN BY PCR-DUPLEX

ABSTRACT: Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) is a virulent calicivirus that causes high mortality both in domestic and wild rabbits. In this work, two RHDV strains were detected. The first one viral strain had been previously isolated and belonged to viral Lineage I which includes all RHDV isolates found in the Iberian Peninsula to date (classical strain). The second one was the new variant RHDVb. A duplex PCR using specific primers for the two viral strains was developed to increase the sensibility and specificity of the diagnosis. Then, duplex PCR was used to recording, from 2009 to 2012, the variation of prevalence of both viral strains in rabbits dead by RHD in an experimental wild rabbit population. Results showed an evident predominance of the new variant across time, with no detection of the classical strain in 2012, one year after the first report of the new variant. Since wild rabbit populations are the main reservoir of RHD virus for domestic rabbits, it seems necessary and urgent the inclusion of the RHDVb valency in commercial vaccines against RHD.

Keywords: PCR, Rabbit haemorrhagic disease, phylogenetic analysis, European wild rabbit