

# Detección y aislamiento de virus de la enfermedad hemorrágica del conejo RHDV2/b en micromamíferos silvestres en el Norte de España

*Detection and isolation of rabbit haemorrhagic disease virus RHDV2/b in wild micro-mammals in Northern Spain*

**Mendoza M.<sup>1</sup>, Calvete C.<sup>1\*</sup>, Sarto M.P.<sup>1</sup>, Jiménez de Bagüés M.P.<sup>1</sup>, Luján Ll.<sup>3</sup>, Molín J.<sup>3</sup>, Calvo A.J.<sup>2</sup>, Monroy F.<sup>2</sup>, Calvo J.H.<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup> Dept. Sanidad y Producción Animal, Centro de Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), 50059 Zaragoza, España

<sup>2</sup> Gerencia de Sanidad, Seguridad Alimentaria y Salud Pública de TRAGSATEC, C/ Julián Camarillo 6, 28037 Madrid, España

<sup>3</sup> Departamento de Patología Animal, Universidad de Zaragoza, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), 50013 Zaragoza, España

<sup>4</sup> ARAID, 50004 Zaragoza, España

\*Dirección de contacto: ccalvete@aragon.es

## Resumen

El presente trabajo explora la existencia de infección natural por RHDV2/b en micromamíferos simpátricos del conejo silvestre. Durante el período comprendido entre 2014 y 2016 se monitorizaron varias poblaciones de conejo de monte en semilibertad donde se hallaron cuatro cadáveres de micromamíferos muertos por causas naturales. Mediante un protocolo de PCR dúplex en tiempo real, se intentó determinar la presencia del virus RHDV2/b en los animales muestreados. En total se encontraron, dos topillos mediterráneos (*Microtus duodecimcostatus*) y dos musarañas grises (*Crocidura russula*), resultando un topillo y ambas musarañas positivos a RHDV2/b. Para comprobar la infectividad de las muestras, se inoculó a un lote de conejos de laboratorio con homogeneizados procedentes de los hígados de los micromamíferos, muriendo algunos con lesiones compatibles con RHD. El análisis por PCR dúplex en tiempo real de los hígados de los conejos demostró la presencia de virus en los mismos, confirmando su pertenencia al genotipo RHDV2/b mediante secuenciación del gen que codifica para la proteína VP60. Este hallazgo es a nuestro conocimiento el primer aislamiento de RHDV2/b en micromamíferos silvestres y sugiere que la epidemiología de la enfermedad puede ser más complicada de lo que se conoce actualmente. El estudio además pone de manifiesto la necesidad de realizar una correcta desratización en las granjas cunícolas para evitar la posible entrada del virus por esta vía. Deberían realizarse estudios ulteriores para elucidar completamente el rol de los micromamíferos y otras especies animales en la epidemiología de la enfermedad hemorrágica.

**Palabras clave:** Enfermedad hemorrágica del conejo, RHDV2/b, *Oryctolagus cuniculus*, *Microtus duodecimcostatus*, *Crocidura russula*.

## Abstract

Present work explores the natural RHDV2/b infection of wild rabbit-sympatric micromammals. Between 2014 and 2016 several wild rabbit populations kept in semi-freedom enclosures were monitored where four micromammal carcasses were found, dead by natural causes. A duplex real time PCR procedure was used in order to assess the presence of RHDV2/b in all sampled animals. In total, two Mediterranean Pine Voles (*Microtus duodecimcostatus*) and two White-toothed Shrews (*Crocidura russula*) were found. One vole and both shrews resulted positive to RHDV2/b. To assess the infectiousness of the isolates, a batch of laboratory rabbits was inoculated with homogenates obtained from the livers of positive micromammals, where some died showing compatible RHD lesions. The Duplex real time PCR analysis of the livers from the rabbits demonstrated the infection and

En conclusión, el RHDV2/b parece tener un rango mucho más amplio de hospedadores que las cepas clásicas de RHDV, ya que otros autores han demostrado la infección de varias especies de liebres mencionadas anteriormente. Nuestros resultados van más allá, presentando el hallazgo de una infección natural por RHDV2/b de dos especies de roedores, el topillo mediterráneo (*Microtus duodecimcostatus*) y la musaraña gris (*Crocidura russula*) siendo a nuestro conocimiento el primer aislamiento de este virus fuera del orden de los lagomorfos, lo que implica un importante salto en la supuesta barrera de hospedador del virus RHDV2/b. Además se confirma que los virus aislados en los micromamíferos mantienen su capacidad infectante, siendo capaces de producir enfermedad en los conejos. Se están realizando más estudios para elucidar la filogenética de las cepas aisladas en los micromamíferos y los conejos silvestres de nuestras poblaciones.

Estos resultados sugerirían que la epidemiología de la enfermedad hemorrágica podría ser más compleja de lo que se asume en la actualidad, y refuerzan la posibilidad de que el origen del agente etiológico de la RHD, sin determinar todavía en la actualidad, haya sido consecuencia de un salto del virus entre especies, por lo que es necesario seguir invirtiendo en investigación sobre la RHD. Por otro lado, la implicación para la cunicultura pondría de manifiesto la importancia de aplicar protocolos eficaces para mantener las explotaciones libres de micromamíferos, reduciendo las probabilidades de re-introducir o mantener el virus RHDV2/b en ellas tras un brote de enfermedad.

### Agradecimientos

Este trabajo se ha desarrollado gracias al convenio de colaboración entre el Centro de Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) y Tecnologías y Servicios Agrarios S.A., S.M.E., M.P. (TRAGSATEC), para la realización de las actividades del proyecto "Aplicación del protocolo de Hiperinmunización frente a la Enfermedad Vírica Hemorrágica (RHD) en poblaciones naturales de Conejo Silvestre (INMUNIZADOS 1316)" y ha sido cofinanciado por el proyecto de investigación E-RTA2014-00009-00-00 del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

### Bibliografía

- Abrantes J., Van Der Loo W., Le Pendu J., Esteves P.J. 2012. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Veterinary Research*, 43: 12.
- Calvete C., Sarto P., Calvo A.J., Monroy F., Calvo J.H. 2014. Could the new rabbit haemorrhagic disease virus variant (RHDVb) be fully replacing classical RHD strains in the Iberian Peninsula? *World Rabbit Science*, 22: 91.
- Camarda A., Pugliese N., Cavadini P., Circella E., Capucci L., Caroli A., Legretto M., Mallia E., Lavazza A. 2014. Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Italian hare (*Lepus corsicanus*). *Research in Veterinary Science*, 97: 642-645.
- Dalton K.P., Nicieza I., Balseiro A., Muguerza M.A., Rosell J.M., Casais R., Álvarez A.L., Parra F. 2012. Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 18: 2009-2012.
- Dalton K.P., Nicieza I., Abrantes J., Esteves P.J., Parra F. 2014. Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula. *Veterinary Microbiology*, 169: 67-73.
- Delibes-Mateos M., Delibes M., Ferreras P., Villafuerte R. 2008. Key role of European rabbits in the conservation of the Western Mediterranean basin hotspot. *Conservation Biology*, 22: 1106-1117.
- Le Gall-Reculé G., Zwingelstein F., Boucher S., Le Normand B., Plassiart G., Portejoie Y., Decors A., Bertagnoli S., Guérin J-L., Marchandeu S. 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Veterinary Record*, 168: 137-138.
- Le Gall-Reculé G., Lavazza A., Marchandeu S., Bertagnoli S., Zwingelstein F., Cavadini P., Martinelli N., Lombardi G., Guérin J-L., Lemaitre E., Decors, A. Boucher A., Le Normand B., Capucci L. 2013. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Veterinary Research*, 44:81.
- Le Gall-Reculé G., Lemaitre E., Bertagnoli S., Hubert C., Top S., Lequeux T., Decors A., Marchandeu S., Guitton J.S. 2016. Large scale detection of the rabbit haemorrhagic disease virus RHDV2 in European hare (*Lepus europaeus*) populations