

Higiene y patología

Diagnóstico de la Enfermedad Hemorrágica Vírica de los conejos (EHVC)

Miguel Tesouro-Vallejo *

(Expoaviga 89. IV Jornada Técnica sobre Cunicultura. Barcelona, 14-17 noviembre 1989)

Resumen

El motivo de este trabajo es exponer una serie de aspectos por los cuales podemos hacer el diagnóstico de esta enfermedad.

Por los datos epidemiológicos: Afecta casi exclusivamente a conejos de más de dos meses de edad. El período de incubación es muy corto -1-3 días-, con muertes súbitas. Morbilidad y mortalidad elevada.

Por los síntomas: Postración con insensibilidad o indiferencia a todo lo que les rodea. Muerte súbita, con contracciones musculares que suele ir acompañada de un fuerte chillido, y en algunos casos con epistaxis.

Por las lesiones: Pulmones con hemorragias petequiales, en las formas sobreagudas y áreas hemorrágicas en las formas agudas. Tráquea hemorrágica. Hígado hiperplásico y congestivo, en las formas sobreagudas y de color más claro, amarillento y más friable en las formas agudas. Bazo hiperplásico, congestivo e incluso hemorrágico. El timo hiperplásico, congestivo e incluso hemorrágico.

Sin embargo, para una confirmación del diagnóstico debemos acudir al diagnóstico etiológico: Los intentos del aislamiento del agente etiológico mediante el empleo de cultivos celulares han sido infructuosos a pesar de haber sido utilizados numerosos tipos de células, tanto primarias como líneas celulares. Hemos podido visualizar mediante el microscopio electrónico, por tinción negativa, la presencia de partículas víricas redondas, de pequeño tamaño (30-35 nm de diámetro), sin envoltura y con la superficie no lisa (con

depresiones redondeadas y salientes) que nos recuerdan las imágenes de los Calicivirus.

Es la Prueba de Hemoaglutinación-Inhibición de la Hemoaglutinación la que debemos realizar para hacer un diagnóstico etiológico confirmativo. Se describe con detalle esta técnica para que pueda ser utilizada de una manera normalizada por el personal de otros Laboratorios, ya que tiene una gran sensibilidad, especificidad, seguridad, exactitud, rapidez, y de bajo costo, para hacer el diagnóstico de esta enfermedad en los conejos.

Introducción

Quisiéramos exponer de una manera breve una serie de aspectos por los cuales podemos hacer el diagnóstico de esta enfermedad en los conejos:

Afecta casi exclusivamente a conejos de más de 2 meses de edad.

El período de incubación es muy corto (1-3 días), transcurrido el cual los conejos mueren súbitamente, después de pasar por un período de postración, con insensibilidad a todo lo que les rodea.

La postración va acompañada, en la mayoría de los casos, por síntomas convulsivos, en los cuales el animal está tumbado de costado y es capaz de elevarse por un movimiento brusco de contracción muscular, que suele ir acompañada de un fuerte chillido, especialmente antes de producirse la muerte.

* Jefe del Departamento de Virología. Laboratorio Estatal de Sanidad y Producción Animal. Algete (Madrid)

En algunos conejos al producirse la muerte aparece la epístaxis.

Los conejos de razas albina presentan las orejas de un color sonrosado, debido a una intensa congestión de los vasos y a la consiguiente hemólisis de la sangre trasvasada cuando se miran al trasluz.

La morbilidad y la mortalidad es elevada, pudiendo llegar al 70-100% de los conejos de más de 2 meses de edad en algunos efectivos, dependiendo de la edad, raza, estirpes, tipo de alojamiento, tipo de ventilación, aislamiento de la explotación, desinfección, etc.

Por los *datos epidemiológicos* y por la *sintomatología* podemos sospechar, con bastantes probabilidades, que nos encontramos ante casos de conejos afectados o muertos por la Enfermedad Hemorrágica Vírica.

Análisis anatomopatológico

Para confirmar este *diagnóstico presuntivo* debemos realizar una necropsis de algún o algunos conejos muertos o moribundos.

En la *necrosis* se pueden observar las siguientes lesiones:

Congestión generalizada del tejido subcutáneo y la presencia de vasos dilatados muy visibles en la cara interna de la piel.

Los *grandes vasos* aparecen dilatados y repletos de sangre, la mayoría de las veces sin coagular.

El *corazón* está frecuentemente en diástole con las aurículas repletas de sangre o de coágulos de sangre.

Los *pulmones* presentan hemorragias petequiales en las formas sobreagudas y áreas hemorrágicas de tamaño variable, con hepatización roja, en las formas agudas. Al corte se observa abundante exudado espumoso sanguinolento.

La *tráquea* casi siempre se encuentra muy alterada, mostrándose hemorrágica y conteniendo en su interior un exudado espumoso sanguinolento.

El *hígado* siempre está aumentado de tamaño, congestivo, con un color más oscuro remarcando el dibujo lobulillar, en las formas sobreagudas. En las formas agudas, el hígado está hipertrofiado y de color más claro, amarillento y más friable.

El *bazo* en la mayoría de los casos está aumentado de tamaño, mostrando una

fuerte congestión e incluso intensamente hemorrágico.

Los *riñones* de manera constante aparecen congestivos y aumentados de tamaño, a veces con claras sufusiones hemorrágicas.

El *timo* frecuentemente aparece hiperplásico, congestivo, con petequias e incluso hemorragias.

Como podemos deducir, *los síntomas* y *las lesiones anatomopatológicas* son bastante específicas de esta enfermedad, pero sin embargo para una confirmación del diagnóstico debemos acudir al diagnóstico etiológico.

Análisis virológico

Mediante el empleo de *cultivos celulares*, tanto primarios como de líneas celulares, de las cuales hemos utilizado la RK-13 (riñón de conejo), la VERO (riñón de mono verde), BT (cornetes bovino), HEP-2 (carcinoma epidermoide de laringe humana), CINCINATTI (línea más sensible procedente de la anterior), y FP (fibroblasto de piel humana), hemos sido incapaces de poner en evidencia un claro efecto citopático (ECP) producido por los sobrenadantes y filtrados del material procedente de órganos con claras lesiones de la enfermedad, diferente del posible efecto citotóxico que puede ser producido por el material del inóculo, presencia de redondeamiento celular e incluso en algunos casos agrupamiento de estas células redondeadas, pues en pases sucesivos estas alteraciones celulares desaparecían en vez de incrementarse.

En los análisis mediante el empleo del *Microscopio Electrónico* de estos cultivos celulares no se ha puesto en evidencia la multiplicación del virus, tanto en el sobrenadante del cultivo celular como en las células de la monocapa. Se ha observado en algunos casos la presencia de algunas partículas víricas en escasas cantidades en los primeros pases de los cultivos celulares, de probable origen del material del inóculo. Igualmente el poder hemoaglutinante de hemafés humano del grupo 0 del sobrenadante de los cultivos celulares o de los extractos obtenidos de la monocapa celular fueron totalmente negativos en la mayoría de los casos, o de un bajo título en algunos en el primer pase, poder que desaparecía en pases sucesivos.

Este fracaso generalizado de cultivar el presunto virus etiológico de esta enfermedad de

los conejos ha sido puesto de manifiesto por los diversos investigadores que asistieron a la reunión de Verona, del 13-14 de marzo de 1989 y que como una conclusión final sobre el intento del cultivo del probable virus de esta enfermedad se dijo que había que persistir en los intentos de su cultivo, pues a pesar de haber sido utilizadas más de 20 tipos de células, tanto de mamíferos, como de peces, e incluso de insectos, unos de origen primario y otros de líneas celulares, no se había conseguido su replicación "in vitro", incluso ensayando diferentes tipos de tratamiento del inóculo como de los cultivos celulares.

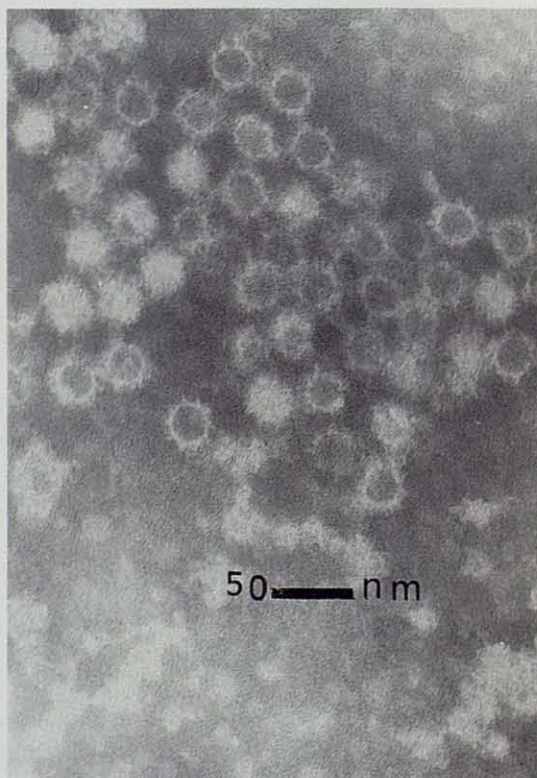
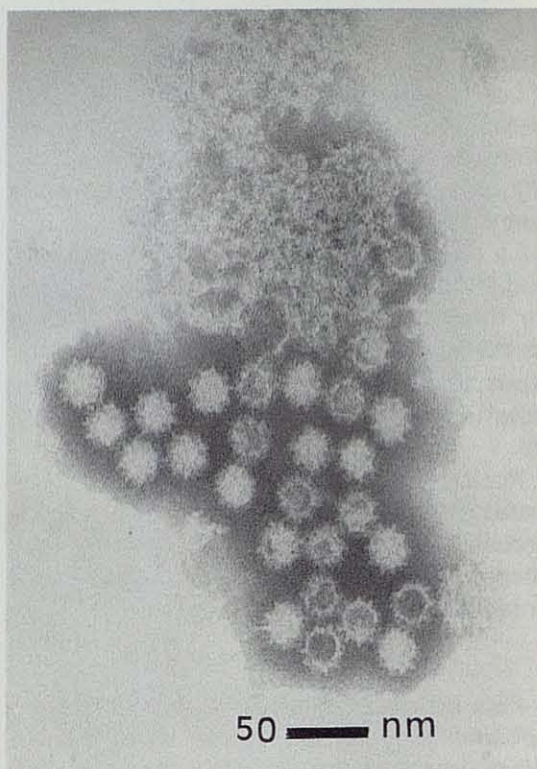
Visualización por microscopía electrónica

Ante los frustrados intentos del cultivo del presunto virus, hemos investigado su presencia en el material procedente de órganos de conejos muertos por esta enfermedad y con fuerte poder hemoaglutinante mediante la utilización del microscopio electrónico para ponerlos en evidencia por visualización directa.

En la observación de las preparaciones sometidas a *tinción negativa*, por el microscopio electrónico pudimos observar la presencia de abundantes partículas víricas, redondas, de pequeño tamaño (30-35 nm de diámetro), sin envoltura y con la superficie no lisa -con depresiones redondeadas y salientes).

En las microfotografías electrónicas se aprecia fácilmente la existencia de partículas víricas vacías -su interior oscuro- y partículas víricas completas -claras en su totalidad- que junto a la presencia de depresiones en su superficie de fondo redondeado y la presencia de algunas partículas víricas en las que claramente podemos contar 10 puntas en su borde externo, que nos recuerdan las imágenes de los calicivirus -Electronfotografía nº 1-, hecho que ha sido puesto de manifiesto por Plana-Durán, J. y col -1989-; sin embargo, es preciso realizar más investigaciones para confirmar esta suposición.

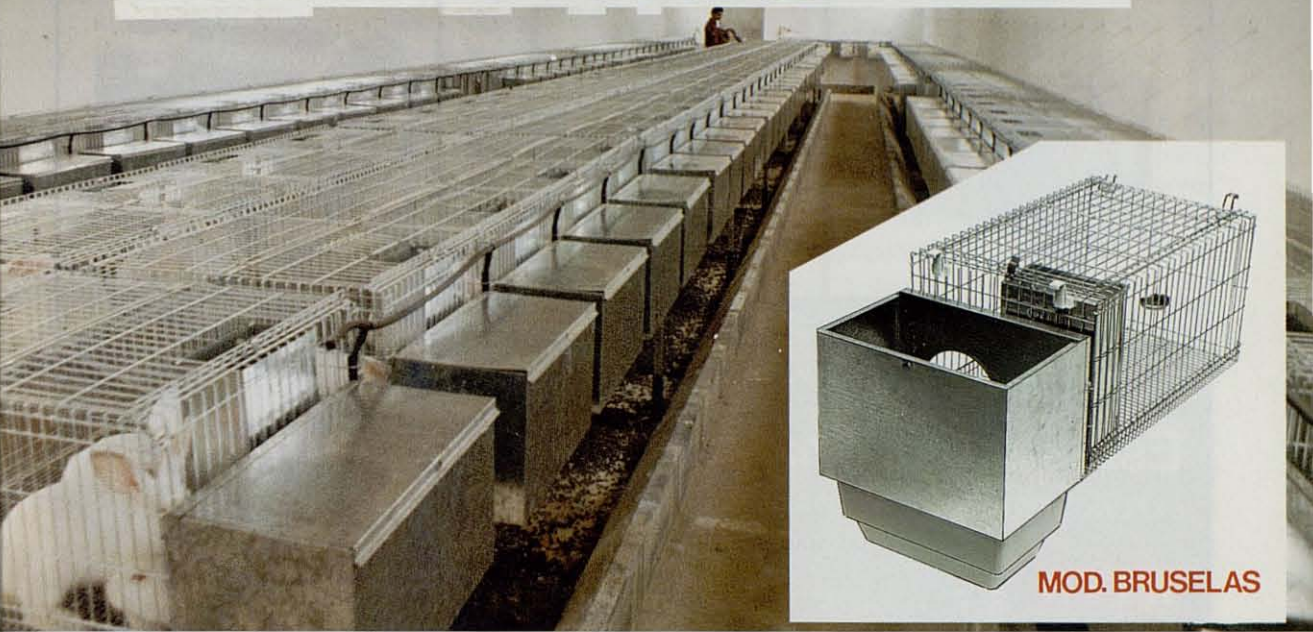
Hemos realizado con antígeno Ovejero una *Inmunomicroscopía electrónica* empleando un suero hiperinmune de conejo contra la EHV, ya que esta técnica posee una mayor *sensibilidad* que la microscopía electrónica por tinción negativa simple, a causa de





COPELE

instalaciones cunícolas



MOD. BRUSELAS

La mejor oferta para su instalación



MOD. MARSELLA



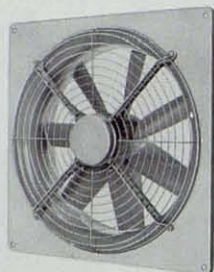
BEBEDERO LOGIS



LA MAS AMPLIA GAMA PARA: CALEFACCION, REFRIGERACION Y VENTILACION



SERIE K. Generadores de aire caliente a gasóleo, con chimenea, móviles o colgables, con gran intercambiador de calor de gran rendimiento. Capacidades de 23.000 a 100.000 Kcal/h.



VENTILADORES. Regulables, amplia gama de 3.000 a 40.000 m³/h., muy silenciosos y de gran rendimiento. También centrífugos.



SERIE DE. Calefactores por aire móviles y colgables, con capacidades desde 40.000 a 160.000 Kcal/h. Combustión directa, a gasóleo o gas.

Estos equipos harán más rentable su negocio.

EXPONGANOS SUS NECESIDADES: LE ESTUDIAREMOS LA SOLUCION MAS IDONEA

HYLO

S. A. Taulat, 25 - Tel.: 93-300 67 62 - Télex 50830 CLAP E - 08005 BARCELONA

Distribuidores exclusivos de

HYLO

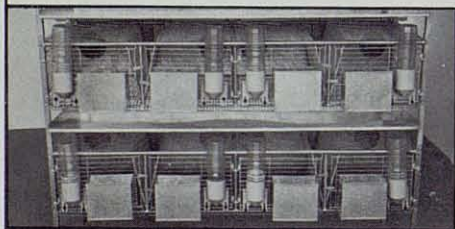
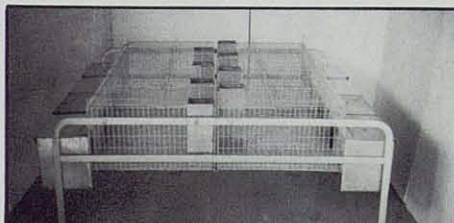
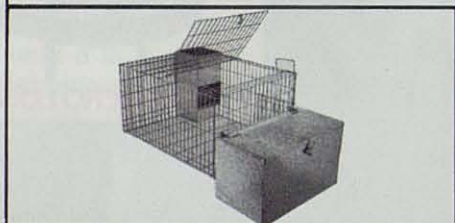
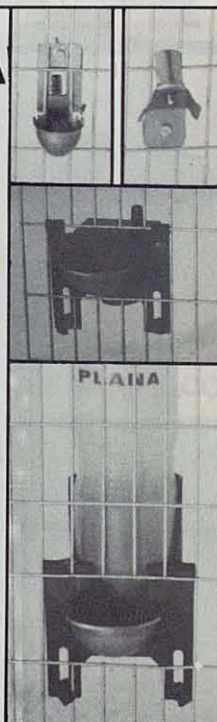
S. A. y

DY-EX



Industrial LA PLANA

NUEVA GAMA DE JAULAS PARA INTERIOR Y EXTERIOR



Instalación de granjas para **AVICULTURA**

CUNICULTURA

VACUNO (Estabulación libre)

INDUSTRIAL LA PLANA

Carretera de Taradell, s/n - Barrio Estación Balenya
Tel.: 93 - 887 04 15 - SEVA (Barcelona)

que son mejor detectados los agregados de partículas que las partículas víricas aisladas y sueltas. Además, esta técnica posee la característica de su *especificidad*, pues la visualización del complejo antígeno-anticuerpo y de sus puentes de unión inmunoglobulínicos nos indican su correspondencia serológica específica. Como podemos observar en la figura 2, se ven agregados de partículas víricas unidas por puentes de inmunoglobulinas.

La comprobación visual de las partículas víricas en los órganos de los conejos afectados o muertos por esta enfermedad mediante microscopía electrónica no es fácil en la práctica, por la necesidad de disponer de un microscopio electrónico -por su alto coste-, la necesidad de personal altamente especializado y de la disponibilidad de recursos económicos para su mantenimiento.

Prueba de Hemoaglutinación-Inhibición de la Hemoaglutinación (HA-IHA)

Ante el conocimiento que el sobrenadante de los macerados de órganos -hígado, bazo, pulmón, timo, riñón, etc- de conejos afectados o muertos por esta enfermedad tenían la propiedad de hemoaglutinar los hematíes humanos 0, señalada ya hace tiempo por los investigadores chinos PU, B.Q. y col -1985-, hemos ensayado y utilizado esta *técnica modificada* para el diagnóstico de la Enfermedad Hemorrágica Vírica de los conejos (EHVC) en gran número de conejos enfermos y muertos y vísceras de los mismos, remitidos a este Laboratorio.

Técnica de la Prueba de Hemoaglutinación-Inhibición de la Hemoaglutinación modificada

La prueba de HA-IHA la hemos realizado en placas de 96 pocillos (8x12) y con fondo en U, utilizando como material a valorar el sobrenadante del macerado del hígado, bazo o pulmón al 10% en solución salina fisiológica, centrifugado a 2.500 rpm durante 15 minutos.

En la microplaca se deposita en los pocillos

2-12; 0,025 ml de solución salina al 0,85%. En los pocillos 1 y 2 se deposita 0,025 ml de sobrenadante del órgano a titular. A partir del pocillo 2 al pocillo 12 se realiza una dilución por doblaje, mediante el empleo de una micropipeta de 8 canales de 0,025 ml. Después se añade en todos los pocillos, del 1 al 12, solución salina fisiológica en cantidades de 0,025 ml -fila A.

En la fila siguiente -Fila B- se realiza en paralelo una dilución por doblaje del mismo sobrenadante, como ha sido explicado anteriormente. Sin embargo, esta vez se añade en todos los pocillos, del 1 al 12, en vez de solución salina fisiológica, 0,025 ml de una dilución de un suero hiperinmune -positivo-, conteniendo 10 Unidades Inhibidoras de la Hemoaglutinación -10 UIHA- por 0,025 ml, frente a la EHVC.

Se cubre la microplaca con una lámina de celofán adhesivo y se coloca en un agitador de microplacas durante 2 minutos y después se deja a la temperatura del laboratorio durante 15 minutos.

Después de desprender el celofán adhesivo se añade a cada pocillo 0,025 ml de una suspensión de hematíes humanos 0 al 1%. Se coloca el celofán adhesivo y nuevamente se agita 2 minutos y después se deja a la temperatura del laboratorio durante 60 minutos. Igualmente la lectura de la reacción puede postergarse al día siguiente dejando la microplaca en un frigorífico a 4° C.

En una microplaca podemos realizar a la vez reacciones de *Hemoaglutinación* y de *Hemoaglutinación-Inhibición de la Hemoaglutinación* (HA-IHA) con 4 sobrenadantes de órganos de una manera bastante rápida, segura, sensible, específica y con bajo coste para hacer el diagnóstico de esta enfermedad.

Consideramos el *título hemoaglutinante* (HA) del sobrenadante del órgano de procedencia a la dilución más alta que produce una hemoaglutinación total.

Nosotros solemos valorar a los pocillos de la microplaca con los siguientes títulos:

Pocillo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilución	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1.024	1/2.048

aunque en realidad la dilución del órgano sería la que se obtendría de multiplicarlas por

10, ya que el sobrenadante consiste en una suspensión centrifugada de un macerado del

órgano al 10% en solución salina fisiológica -0,85%.

En la *fila A* valoramos el poder HA del sobrenadante del órgano sobre los Hematíes humanos 0, que son los más sensibles a esta reacción.

En la *fila B* podemos comprobar si ese poder HA del sobrenadante se ha reducido en 2-4 pocillos, debido a que se ha inhibido el poder hemoaglutinante por la edición de 0,025 ml de suero positivo en cada pocillo, 10 UIHA, lo cual nos indica la especificidad de la reacción HA-IHA.

La práctica nos ha demostrado que el sobrenadante que produce HA a mayor dilución siempre es el procedente del *macerado del hígado*, por lo tanto últimamente las reacciones las hemos realizado exclusivamente con este órgano, pues éste suele producir fácilmente HA a diluciones superiores del 1/32 y no pocas veces llegan a ser mayores del 1/2.048.

Como no se ha encontrado la existencia de sobrenadante de hígado, bazo, timo o pulmón de *conejos sanos*, que tenga poder hemoaglutinante de hematíes humanos 0, podemos realizar la prueba cualitativa de la *Hemoaglutinación en placa*, mezclando 0,050 ml del sobrenadante con 0,050 ml de una suspensión de hematíes humanos 0 al 5%, que mezclamos por agitación con una varilla en la cuadrícula de una placa de un aglutinoscopio. Esta es una técnica rápida y nos

puede ser de gran utilidad para detectar casos de HA positivos cuando hay que analizar gran número de muestras, pues la podemos utilizar en una primera fase para seleccionar los casos positivos.

Datos epidemiológicos sobre la Enfermedad Hemorrágica Vírica de los conejos (EHVC)

Igualmente queremos decir algo sobre la escasa información epidemiológica publicada sobre esta enfermedad, hecho que no nos sorprende porque es frecuente que suceda en España, a pesar de haberse remitido por la Subdirección General de Sanidad Animal una Circular recabando información sobre la situación epizootiológica de esta enfermedad a las Comunidades Autonómicas a comienzo de 1989.

Hemos diagnosticado la enfermedad en conejos y en menor cantidad en los procedentes de explotaciones industriales y domésticas, remitidos desde las provincias de Madrid, Toledo, Ciudad Real, Cuenca, Guadalajara, Cáceres, Lugo, Albacete y Palma de Mallorca, pero por la información conseguida de otros Laboratorios que se dedican al diagnóstico de enfermedades cunícolas, tanto oficiales como privados, podemos deducir que se ha diagnosticado en todas las provincias españolas, en mayor o menor extensión y con más o menos mortalidad.

AGENTES DE ESTA REVISTA EN EL EXTRANJERO

Argentina:	Librería Agropecuaria, S.R.L. - Pasteur, 743 Buenos Aires.
Chile:	Bernardo Pelikan Neumann. Casilla 1.113 Viña del Mar
Panamá:	Hacienda Fidanque, S.A. Apartado 7.252 Panamá.
Uruguay:	Juan Angel Peri. Alzaibar 1.328 Montevideo.