

Detección mediante PCR-dúplex a tiempo real y aislamiento de virus RHDV2/b durante un brote de enteropatía mucoide

Real time duplex-PCR detection and isolation of infective RHDV2/b during a mucoid enteropathy outbreak

Mendoza M.¹, Calvete C.^{1*}, Comenge J.², Sarto M.P.¹, Jiménez de Bagüés M.P.¹, Calvo J.H.^{1,3}

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

² NANTA.SA. 28760 Tres Cantos, Madrid, España

³ ARAID, 50004 Zaragoza, España

*Dirección de contacto: ccalvete@aragon.es

Resumen

El presente trabajo describe la detección mediante PCR-dúplex a tiempo real de virus RHDV2/b en muestras de duodeno, bazo y timo de un conejo de cebo de 50 días de edad muerto durante un brote de enteropatía mucoide. El brote tuvo una duración de 31 días afectando a animales con edades comprendidas entre los 42 y los 72 días, produciendo 1113 bajas (17,5%) del total de animales en cebo. En ningún momento, a lo largo de la evolución del brote, se detectaron signos típicos de mortalidad por enfermedad hemorrágica (RHD). Para confirmar la infecciosidad del virus y utilizando un inóculo purificado preparado a partir de las muestras analizadas, se infectó por vía intramuscular a un conejo susceptible a la enfermedad el cual murió tras desarrollar un cuadro agudo de RHD. A partir de una muestra de hígado de este conejo infectado se procedió a caracterizar el virus implicado mediante la secuenciación del gen que codifica para la proteína VP60, confirmando su pertenencia a la variante RHDV2/b. Este hallazgo sugiere la posibilidad de que el virus RHDV2/b pueda circular de forma silente sin causar brotes aparentes de RHD.

Palabras clave: Enfermedad hemorrágica del conejo, Enteropatía mucoide, RHDV2/b, *Oryctolagus cuniculus*.

Abstract

This work describes the duplex real time PCR detection and isolation of infective RHDV2/b virus from duodenum, spleen and thymus from a 50 days old rabbit dead during a mucoid enteropathy outbreak in a Spanish commercial rabbitry. The outbreak lasted 31 days resulting in 17.5% of mortality (1113 individuals) in 42-72 days old rabbits. During the outbreak, no sign or lesion compatible with RHD was found. One 7-week-old specific minimal disease level rabbit was inoculated intramuscularly with an inoculum obtained from homogenized positive samples, dying after developing the acute form of rabbit haemorrhagic disease (RHD). Analysis of the VP60 gene nucleotide sequence confirmed that isolated virus was RHDV2/b. This finding suggests that RHDV2/b might persist and circulate in a silent way without causing RHD outbreaks.

Keywords: Rabbit haemorrhagic disease, Mucoid enteropathy, RHDV2, *Oryctolagus cuniculus*.

Introducción

En la actualidad, la enfermedad hemorrágica del conejo (RHD) y la enteropatía mucoide (EM) son dos de las principales causas de mortalidad en las granjas cunícolas de nuestro país (Rosell y de la Fuente, 2016). La RHD está causada por un calicivirus que suele cursar con formas agudas o subagudas de la enfermedad, las cuales producen la muerte de los animales a los pocos días tras la infección, con tasas de mortalidad que pueden ser muy variables, aunque casi siempre elevadas. Durante varias décadas, el control de la enfermedad se ha basado en el vaciado sanitario de las granjas afectadas y, sobre todo, en la instauración de programas de inmunización vacunal, mediante la utilización de vacunas comerciales de elevada eficacia. No obstante, desde la aparición de

El conejo se monitorizó hasta su muerte, procediéndose a la necropsia y a la correspondiente toma de muestras. Una parte de tejido hepático fue analizada mediante la dúplex-qPCR para comprobar la presencia de virus RHD. Para confirmar la identidad del virus aislado se procedió a la secuenciación completa del gen que codifica para la proteína VP60. Para ello se utilizó PCR convencional, tras la cual los productos obtenidos se purificaron utilizando el kit Macherey-Nagel-Extract II purification (Macherey-Nagel, Alemania), siendo secuenciados en una plataforma ABI Prism 3700 (Applied Biosystems, Madrid, España) conforme a las instrucciones del fabricante.

Resultados y discusión

Los resultados de la dúplex-qPCR fueron positivos para RHDV2/b en las tres muestras analizadas, si bien a valores de Cq muy elevados (38-41 Cq), lo que sugiere una reducida densidad de partículas víricas en los tejidos. El conejo infectado experimentalmente murió a las 48 horas post-infección, presentando lesiones características de RHD en su forma aguda. El análisis de tejido hepático con dúplex-qPCR fue positivo para RHDV2/b mientras que el análisis de la secuencia del gen para la VP60 confirmó al aislado como perteneciente a esta variante vírica.

Estos resultados sugieren que el virus RHDV2/b podría persistir o incluso circular de forma silente sin producir brotes aparentes de mortalidad por RHD, posiblemente asociado a explotaciones con historial de brotes anteriores de RHD causados por este virus y en donde la vacunación con vacuna clásica proporciona una protección parcial frente al mismo. La asociación del RHDV2/b con procesos digestivos ya fue descrita durante los primeros brotes de la enfermedad en granjas cunícolas (Grasa y Malo, 2012). En conejo silvestre también se ha detectado este virus asociado a brotes de mortalidad con lesiones típicas de enteropatía mucoide (Calvete, datos no publicados), mientras que a lo largo de 2016, de las muestras procedentes de otras siete explotaciones con problemas debidos a procesos digestivos, y que fueron remitidas al laboratorio del CITA para ser analizadas mediante la dúplex-qPCR, en tres de ellas se detectó también la presencia del RHDV2/b en condiciones similares; baja densidad de partículas víricas en los tejidos analizados y ausencia de cuadros típicos de RHD en las explotaciones. Todo ello apoyaría la hipótesis de la persistencia y circulación del virus RHDV2/b en determinadas circunstancias sin producir brotes de RHD, asociado a procesos digestivos originados por su mayor tropismo hacia las células del epitelio intestinal en comparación a las cepas clásicas del virus (Dalton *et al.*, 2012).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de investigación E-RTA2014-00009-00-00 del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

Bibliografía

- Baeuerl C., Collado M.C., Zuniga M., Blas E., Martínez G.P. 2014. Changes in cecal microbiota and mucosal gene expression revealed new aspects of epizootic rabbit enteropathy. *PLOS ONE*. 9.
- Dalton K.P., Nieceza 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.
- Grasa J.R., Malo M. 2012. Enfermedad vírica-hemorrágica: Nueva variante. *Boletín de Cunicultura*, 169: 6-24.
- Haligur M., Ozmen O., Demir N. 2009. Pathological and ultrastructural studies on mucoide enteropathy in New Zealand Rabbits. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18: 224-228.
- Le Gall-Reculé G., Zwingelstein F., Le Normand B., Plassiart G., Portejoie Y., Decors A., Bertagnoli S., Guérin J.L., Marchandeaup S. 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Veterinary Record*, 5: 137-138.
- Licois D., Wyers M., Coudert P. 2005. Epizootic rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Veterinary Research*. 36:601-613.
- Rosell J.M., de la Fuente L.F. 2016. Causes of mortality in breeding rabbits. *Preventive Veterinary Medicine*, 127: 56-63.
- Stenglein M.D., Velazquez E., Greenacre C., Wilkes R.P., Ruby J.G., Lankton J.S., Ganem D., Kennedy M.A., DeRisi J.L. 2012. Complete genome sequence of an astrovirus identified in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) with gastroenteritis. *Virology Journal*, 9: 216.