

# Detección de una nueva variante del virus de la enfermedad hemorrágica en conejos silvestres en España

## *Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in wild rabbits in Spain*

Calvete C.<sup>1\*</sup>, Calvo J.H.<sup>1</sup>, Sarto P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dept. Producción y Sanidad Animal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza.

\*Dirección de contacto: ccalvete@aragon.es

### Resumen

El virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) suele causar elevadas mortalidades tanto en conejos domésticos como en silvestres. Hasta el momento actual, todas las variantes víricas detectadas en la Península Ibérica proceden de un único ancestro común estrechamente emparentado con las primeras cepas patógenas aisladas en esta área. Con objeto de estudiar la epidemiología de esta enfermedad, durante los años 2010 y 2011 se monitorizó una población experimental de conejos silvestres con el fin de detectar los cadáveres de conejos muertos por esta enfermedad. La presencia de ARN viral en el tejido hepático de los cadáveres fue determinada mediante RT-PCR, y en el caso de resultar positiva se procedió a su secuenciación. Durante 2010 se diagnosticaron un total de 12 conejos muertos por RHD, mientras que en 2011 se diagnosticó un total de 9 cadáveres. En todos los conejos muertos por RHD en 2010 y en tres de 2011 la cepa identificada fue la original de la población, sin embargo, en cinco de los restantes seis cadáveres se identificó una cepa diferente. Filogenéticamente, esta cepa es relativamente distante de los grupos de lagovirus, tanto patógenos como apatógenos, descritos hasta la actualidad y, por similitud, esta cepa podría asimilarse a la nueva variante descrita en Francia en 2010 implicada en episodios de elevada mortalidad por RHD en granjas cunícolas de aquel país. Nuestro hallazgo coincidió en el tiempo con la ocurrencia de brotes atípicos de RHD en granjas cunícolas españolas durante 2011, similares a los ocurridos en Francia, por lo que los resultados del presente trabajo confirmarían la presencia de esta nueva variante en España y sugerirían su más que probable implicación en los brotes atípicos detectados.

**Palabras clave:** Enfermedad Hemorrágica del conejo, Análisis filogenético, Conejo silvestre.

### Abstract

Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) is a virulent calicivirus that causes high mortality both in domestic and wild rabbits. It appears to be a mutant form of a benign virus that existed in Europe long before the first outbreak. To date, however, phylogenetic data indicate that all the field strains of RHDV found in the Iberian Peninsula have a common ancestor closely related to pathogenic strains isolated during the first RHD outbreaks in this area. In order to study RHD epidemiology, an experimental wild rabbit population was monitored twice a week during 2010 and 2011 years in order to find rabbits dead by the disease. Detection of viral RNA in liver tissue of carcasses was conducted by RT-PCR reaction and, when positive, PCR products were purified and sequenced. Across 2010, 12 rabbits were found dead by RHD, whereas nine rabbits were found dead in 2011. The original RHDV field strain was identified in all dead rabbits found in 2010 and in three of 2011. However, a new strain was identified in five of remaining six carcasses found in this year. Phylogenetic analysis showed that this new viral strain would be a member of the new variant of RHDV recently detected in France in 2010. This variant is relatively distant from already described pathogenic and non-pathogenic lagoviruses, and it has been reported to cause increased mortalities in French rabbitries. In Spain, several atypical RHD outbreaks have been described affecting rabbitries during 2011 and this variant has been proposed as the putative aetiological agent. This survey confirms that this new RHDV variant would be already present in Spain.

**Key words:** Rabbit haemorrhagic disease, phylogenetic analysis, European wild rabbit

## Introducción

El agente etiológico de la enfermedad hemorrágica vírica del conejo (RHD) 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.

La enfermedad hemorrágica vírica del conejo (RHD) es un proceso que 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 epizoóticos que suelen aparecer en primavera u otoño. Debido a la facilidad de transmisión del virus, la RHD se considera que es una enfermedad 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.

Durante el año 2011 se detectaron, inicialmente en el primer 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 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).

En el presente trabajo se denuncia la identificación de una nueva variante del virus RHD aislada durante un brote de mortalidad, acaecido en una población experimental de conejos silvestres, coincidente con la ocurrencia de brotes atípicos en granjas cunícolas.

## Material y métodos

Dentro de un proyecto orientado a profundizar en el conocimiento de la epidemiología de la RHD, en el año 2009, se creó una población de conejos silvestres en la finca experimental "El Vedado" perteneciente al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Esta finca está localizada en el municipio de Zuera (Zaragoza) y se caracteriza por la práctica ausencia de la especie. La población de conejos se encuentra recluida en varios cercados de 1ha de extensión que impiden la dispersión de los conejos y el paso de predadores terrestres, si bien no impiden el acceso de aves, incluidas grandes rapaces. Esta población fue monitorizada durante 2010 y 2011, con una frecuencia bisemanal, con el objetivo, entre otras cosas, de hallar cadáveres de conejos muertos por la enfermedad que fueron llevados a laboratorio para proceder a su necropsia y toma de muestras. En un primer momento, la presencia de ARN viral en el tejido hepático de los cadáveres fue determinada mediante RT-PCR, y en el caso de resultar positiva se procedió a su secuenciación.

El árbol filogenético fue obtenido a partir de 160 secuencias genéticas del virus de RHD depositadas en el banco de ADN GenBank. Los diferentes virus se agruparon en función de los diferentes linajes descritos por Alda et al. (2010): RHDV I, II, y III. En el análisis filogenético

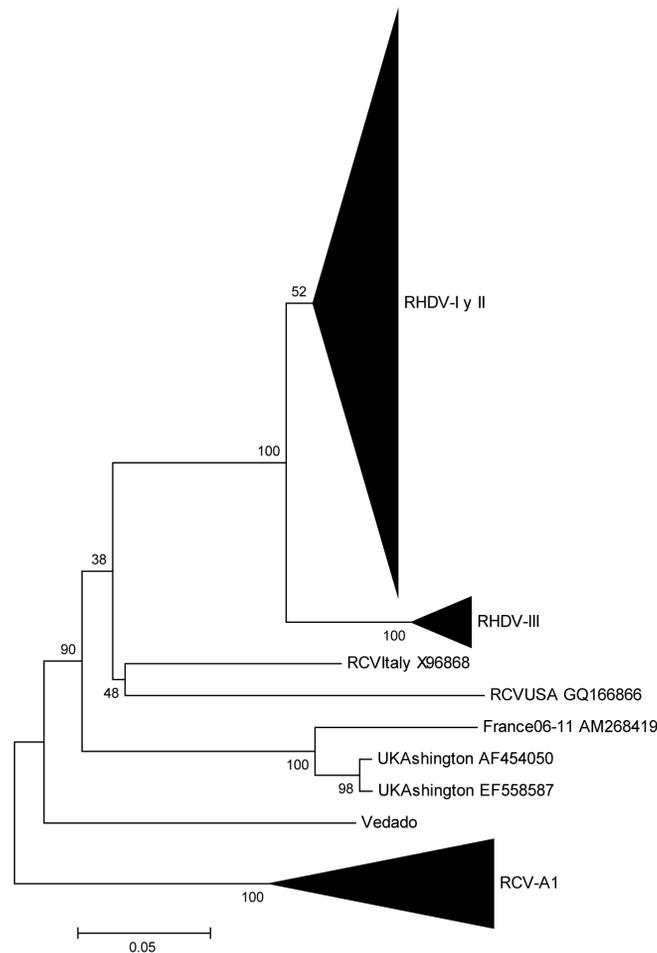
se incluyeron calicivirus del conejo no virulentos pero similares antigénica y genéticamente diferentes: RCV-A1 (aislados en Australia), RCVUSA (aislado en EEUU) y RCVIlaly (aislado en Italia). Igualmente, se incluyeron variantes del virus RHD consideradas como poco patógenas: UKAshington y France 06-11. La fiabilidad del árbol fue testada mediante 10000 remuestreos.

### Resultados y discusión

Durante 2010 se diagnosticaron un total de 12 conejos muertos por RHD, mientras que en 2011 se diagnosticó un total de 9 cadáveres. En todos los conejos muertos por RHD en 2010 y en tres de 2011 la cepa identificada fue la original de la población, sin embargo, en 5 de los restantes seis cadáveres se identificó una cepa diferente que se denominó "Vedado", cuya homología filogenética con la cepa original fue de un 80%. En el otro cadáver, aunque se detectó la presencia del virus RHD, no se pudo llegar a identificar la cepa implicada.

En el árbol filogenético obtenido (Fig. 1) la cepa original se agrupó dentro del linaje RHDV-I, que es donde se agrupan todas las cepas aisladas en la Península Ibérica, mientras que el nuevo aislado el Vedado aparece como un virus diferente de los virus RHD aislados hasta el momento, en función de las secuencias disponibles en el GenBank. Así, mientras la homología de la cepa original con las restantes aisladas en la Península Ibérica oscila entre el 91-96%, la homología de la nueva cepa es tan solo del 77-80%. Aunque no ha sido posible hacer una comparación directa con el aislado denunciado en Francia por LeGall-Reculé et al. (2011), los resultados de relaciones filogenéticas y de identidad genética del aislado Vedado con otros virus RHD depositados en el GenBank, nos hace suponer que el Vedado es un aislado muy similar, si no el mismo, de la nueva variante de RHD detectada en Francia y, más recientemente, también en Italia en conejos domésticos.

En este trabajo, esta nueva variante se ha aislado en una población experimental de conejos silvestres, lo que sugiere que podría estar extendida en otras poblaciones naturales y, por lo tanto, actuar éstas como reservorios. Aunque la propagación de esta nueva variante hacia la Península Ibérica podría haber sucedido de forma natural, el tradicional aislamiento evolutivo de las cepas de RHD en esta área, sugiere que la introducción de la nueva variante pudiera haber estado favorecida por el movimiento de animales o productos relacionados con la cunicultura.



**Figura 1.** *Árbol filogenético obtenido a partir de 160 secuencias genéticas del virus de la fiebre hemorrágica del conejo depositadas en el banco de ADN GenBank. La fiabilidad del árbol fue testada mediante 10000 remuestreos. El valor de fiabilidad aparece en los diferentes clados. Dentro del linaje RHDV-I se encuentran agrupados todos los aislados procedentes de la Península Ibérica, incluida la cepa original de la población experimental de conejos. Vedado es la denominación de la nueva variante identificada en el presente trabajo.*

### 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 el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) y la Gerencia de Control de Enfermedades del citado Grupo.

### Bibliografía

- Alda F., Gaitero T., Suárez M., Merchán T., Rocha G., Doadrio, I. 2010. Evolutionary history and molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the Iberian Peninsula and Western Europe. *BMC Evolutionary Biology*, 10:347.
- Comenge J., Mora F.X. 2011. Brotes atípicos de enfermedad hemorrágica vírica en conejos en la Península Ibérica. *Cunicultura*, 36(213):7-10.
- 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.