

CAPÍTULO 2.6.2.

ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: La enfermedad hemorrágica del conejo (EHC) es una hepatitis aguda, fatal y muy contagiosa del conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), causada por un calicivirus (género *Lagovirus*). Hasta 2010, todos los virus de la EHC (VEHC) aislados pertenecían a uno de los seis genotipos identificados (GI-GVI), entre los cuales, el GVI es un subtipo antigénico (VEHCa). En 2010, se identificó otro VEHC, filogenéticamente y antigénicamente distinto del VEHC y se denominó provisionalmente VEHC2 o VEHCb. Se ha descrito una enfermedad similar en la liebre (*Lepus europaeus*), denominada síndrome de la liebre parda europea (SLPE).

La EHC se caracteriza por una alta morbilidad y una mortalidad del 70–90% en el caso del VEHC/VEHCa y del 5-70% en el caso del VEHC2. La infección puede producirse por vía oral. En conejos salvajes, en concreto, los insectos se consideran una vía importante de infección o transmisión y a menudo constituyen la fuente de transmisión a largas distancias. El periodo de incubación de la EHC varía entre 1 y 3 días, y la muerte normalmente sobreviene 12–36 horas después de la aparición de la fiebre. Los principales signos clínicos de la infección aguda son signos nerviosos y respiratorios, apatía y anorexia. En conejos de menos de 4–6 semanas de edad, la infección por el VEHC es subclínica, pero cuando el agente causal es el VEHC2, se observan signos clínicos y mortalidad incluso en animales jóvenes, de 15–20 días de edad en adelante.

Identificación del agente: El hígado y el bazo de conejos que han muerto por EHC de forma aguda contienen una concentración vírica muy alta. Por tanto, muchas pruebas permiten establecer un diagnóstico fiable. Teniendo en cuenta que no se han establecido sustratos celulares sensibles in vitro, las pruebas de laboratorio más utilizadas son la amplificación del ARN (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa [RT-PCR]) y el enzoinmunoanálisis (ELISA) en sándwich basado en el uso de anticuerpos monoclonales (MAbs). Deben escogerse y utilizarse cebadores y MAbs específicos para distinguir entre VEHC, VEHCa y VEHC2. Dado que los VEHC hemaglutinan eritrocitos humanos del Grupo O, la prueba de la hemaglutinación (HA) también puede utilizarse siempre que se recuerde que también se han identificado variantes del VEHC que dan negativo en la HA. La detección de partículas del VEHC en homogenados de hígado mediante microscopía electrónica también es una posibilidad. El diagnóstico de EHC puede complicarse por la presencia de títulos altos de anticuerpos anti-VEHC en las muestras, que darán lugar a posibles falsos negativos en el ELISA y, sobre todo, en la HA.

Pruebas serológicas: La inmunidad humoral es la principal defensa contra la EHC, de tal forma que incluso niveles bajos de anticuerpos específicos contra el VEHC confieren una protección total frente a la enfermedad. Los mejores métodos serológicos para la detección de la EHC son ELISA de competición con MAbs específicos anti-VEHC. Estos métodos también permiten distinguir entre la infección por el VEHC o el VEHC2 y la vacunación en conejos no infectados previamente. Además, la cuantificación mediante ELISA de las inmunoglobulinas de isotipo específico del VEHC (IgM, IgA e IgG), ayuda a distinguir entre la primera infección y una re-infección o una vacunación. El ELISA directo clásico, que precisa partículas purificadas de VEHC o de tipo vírico recombinantes (VLP) para adsorber a la fase sólida, ofrece una sensibilidad diagnóstica alta. No obstante, debido a la deformación de la cápsida vírica en el momento de adsorberse a la placa, la exposición de epítomos internos comunes al VEHC y a los calicivirus del conejo (CVC) disminuye la especificidad de esta prueba.

Requisitos para las vacunas: Se logra fácilmente un control indirecto de la enfermedad mediante la vacunación. Aunque la cápsida de los VEHC se ha expresado como VLP recombinante, desde

2015, las vacunas que se utilizan son vacunas inactivadas preparadas a partir de hígados de conejos infectados experimentalmente, y posteriormente inactivadas y adyuvantadas. Los animales vacunados producen rápidamente una sólida inmunidad protectora frente a la infección por el VEHC (en un plazo de 7–10 días) y datos experimentales indican que la protección dura mucho (más de 1 año). Dado que el VEHC2 es un subtipo antigénico distante o incluso un segundo serotipo del VEHC, es muy aconsejable una vacunación combinada con ambos tipos antigénicos o bien el uso de una vacuna homóloga a la cepa de VEHC que se haya identificado durante la epidemia o el brote en cuestión.

A. INTRODUCCIÓN

La enfermedad hemorrágica del conejo (EHC) es una hepatitis fatal y muy contagiosa de los conejos europeos, tanto domésticos como silvestres (*Oryctolagus cuniculus*). La EHC está causada por un calicivirus (género EHC *Lagovirus*, familia Caliciviridae), un virus ARN redondo y pequeño sin envoltura con una sola proteína principal en la cápsida (VP60) (Ohlinger *et al.*, 1990). El género *Lagovirus* también incluye el virus del síndrome de la liebre parda europea (VSLPE), el agente causal de una enfermedad de la liebre parda (*Lepus europaeus*) denominada SLPE, muy similar a la EHC. A pesar de la estrecha relación genética (un 70% de similitud entre nucleótidos de las VP60), el VEHC y el VSLPE son dos especies víricas bien diferenciadas (Lavazza *et al.*, 1996; Wirblich *et al.*, 1994).

La comparación genética y antigénica y los datos epidemiológicos indican la existencia de tres grupos de VEHC principales:

- i) El “VEHC clásico”, incluidos los genogrupos G1–G5, descubierto en China (Rep. Pop. de) en 1984 (Liu *et al.*, 1984). Hasta ahora, este VEHC se ha documentado en más de 40 países de Asia, África, las Américas, Europa y Oceanía y es endémica en la mayoría de los países en los que viven conejos europeos salvajes o domesticados.
- ii) El subtipo VEHCa/G6 identificado en Europa en 1996 (Capucci *et al.*, 1998; Schirrmeier *et al.*, 1999) y actualmente documentado en otros continentes (Oceanía, Asia y las Américas).
- iii) El “nuevo” VEHC (denominado de forma provisional VEHC2 o VEHCb), que emergió en Francia en 2010 en conejos vacunados salvajes y domésticos (Dalton *et al.*, 2012; Le Gall-Reculé *et al.*, 2001, 2013), y que se distribuyó rápidamente por Europa y la cuenca del Mediterráneo (Malta y Túnez), y también por Australia en 2015. Según Le Gall-Reculé *et al.* (2013), el VEHC2 no deriva del VEHC clásico, sino que se originó como segundo virus a partir de un origen desconocido. Los datos antigénicos y de protección frente a la enfermedad han hecho que se clasificara al VEHC2 como un segundo serotipo del VEHC.

La EHC se caracteriza por ocasionar una mortalidad alta pero un porcentaje variable de los conejos muere según el tipo de virus. El periodo de incubación del VEHC/VEHCa dura 1–3 días, y la muerte suele tener lugar 12–36 horas después del inicio de la fiebre (80–90% de mortalidad). Alrededor del 5–10% de los conejos presenta un curso clínico subagudo-crónico. Aunque pueden resultar infectados conejos de cualquier edad, la infección es subclínica en los de menos de 6–8 semanas. La enfermedad causada por el VEHC2 tiene unas características determinadas: la tasa de mortalidad es menor pero muy variable (5–70%), con una media del 20% en los conejos infectados de forma experimental; mueren conejos lactantes desde los 15 días de vida en adelante y el curso de la enfermedad suele ser más largo (3–5 días), y un porcentaje más alto de conejos presenta enfermedad subaguda-crónica. Además, el VEHC2 puede causar una enfermedad de tipo EHC en dos especies de liebre: la liebre de El Cabo (*Lepus capensis* var. *mediterraneus*) (Puggioni *et al.*, 2013) y la liebre corsa (*Lepus corsicanus*) (Camarda *et al.*, 2014).

La EHC subclínica-crónica se caracteriza por una ictericia grave y generalizada, pérdida de peso y letargo. Los animales pueden morir pasadas 1 o 2 semanas, pero algunos conejos sobreviven tras una seroconversión. Aparecen IgM específicas y relevantes en un plazo máximo de 3 días, seguidas de inmediato por IgA e IgG 2–3 días después (Barbieri *et al.*, 1997). El ARN vírico se detecta mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) hasta 15 semanas después de la infección (Gall *et al.*, 2007) en la sangre y las heces de conejos convalecientes, así como en conejos infectados por el VEHC pero ya protegidos por anticuerpos específicos adquiridos previamente (es decir, vacunados o supervivientes a la infección). Todavía no se sabe si ello es consecuencia de una eliminación lenta del virus o de una replicación real y prolongada del virus (persistencia).

Como resultado de las pruebas serológicas para la detección de la EHC (Capucci *et al.*, 1991; 1997; Collins *et al.*, 1995; Cooke *et al.*, 2000), en Europa y en Oceanía se han aislado y caracterizado varios lagovirus no patógenos relacionados con el VEHC (calicivirus del conejo – CVC) (Capucci *et al.*, 1996; 1997; Forrester *et*

al., 2002; Marchandau *et al.*, 2005; Strive *et al.*, 2009; White *et al.*, 2004). Estos “virus entéricos” inducen una respuesta serológica que puede interferir con el diagnóstico serológico de la EHC y complicarlo (Capucci *et al.*, 1991; Cooke *et al.*, 2000; Marchandau *et al.*, 2005; Nagesha *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2002).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la enfermedad hemorrágica del conejo y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de circulación del virus en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
Detección de antígeno	+	–	++	+++	+	–
RT-PCR en tiempo real	+	–	++	+++	+	–
Detección de la respuesta inmunitaria²						
ELISA	+++	+++	+++	–	+++	+++
HA	++	++	++	–	++	++

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no apropiado para este propósito; n/a = no aplicable.

Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa;

ELISA = enzimoimmunoanálisis HA = prueba de hemaglutinación.

1. Identificación del agente

El hígado contiene el título vírico más alto (desde 10^3 DL₅₀ [dosis letal 50%] a $10^{6,5}$ DL₅₀/ml de homogenado al 10%) y es el órgano de elección para la identificación tanto del VEHC como del VSLPE. La cantidad de virus presente en otras partes del cuerpo es directamente proporcional a la vascularización; de modo que el bazo y el suero pueden servir como material de diagnóstico alternativo.

En el caso de los animales que mueren por una forma subaguda o crónica de EHC, la respuesta humoral desencadena la eliminación del virus en el hígado y en el bazo de los conejos, de tal forma que se detecta una partícula de tipo virus de la EHC (VLP) en lugar del VEHC, principalmente en el bazo pero también en el hígado (Barbieri *et al.*, 1997; Capucci *et al.*, 1991; Granzow *et al.*, 1996). Esta VLP se caracteriza por la falta de envoltura externa en la cápsida vírica, que consiste en la mitad de la parte C-terminal de la VP60 y, en consecuencia, es negativa en la prueba de la hemaglutinación (HA) y también al usar anticuerpos monoclonales anti-VEHC (MAbs) dirigidos a epítopos conformacionales externos (Capucci *et al.*, 1995).

El tratamiento inicial de las muestras para el diagnóstico es casi idéntico independientemente del método de diagnóstico aplicado, con la excepción de las técnicas de inmunotinción. Un fragmento de órgano se homogeniza mecánicamente en solución salina tamponada con fosfato (PBS) al 5–20% (p/v), pH 7,2–7,4, se filtra a través de una gasa y se clarifica por centrifugación a 5 000 **g** durante 15 minutos. En esta etapa, el sobrenadante puede examinarse directamente mediante la prueba HA o enzimoimmunoanálisis (ELISA). Si la muestra se va a observar al microscopio electrónico (ME), es aconsejable realizar una segunda centrifugación a 12 000 **g** durante

1 Se recomienda utilizar una combinación de métodos de identificación del agente en la misma muestral clínica.

2 Es suficiente con una de las pruebas serológicas de la lista.

15 minutos, antes de la ultracentrifugación final. Para la detección por medio de la PCR, se puede extraer ARN vírico de las muestras directamente de los tejidos. Teniendo en cuenta la alta carga vírica de las muestras positivas para el VEHC y la alta sensibilidad analítica de los métodos basados en PCR, en la fase pre-analítica de la preparación de la muestra deben procederse con sumo cuidado para evitar problemas de contaminación cruzada.

1.1. Enzimoimmunoanálisis

La detección vírica mediante el ELISA se lleva a cabo según la técnica de tipo 'sándwich' y se han descrito diversas variaciones de la misma. En uno de los procedimientos, se utilizan los reactivos, soluciones, tiempos y temperaturas que se emplean en el ELISA de competición (C-ELISA) para pruebas serológicas (véase el apartado B.2.2.). Las microplacas usadas deben ser de alta capacidad de adsorción. El homogenado de hígado consiste en una suspensión al 10% (p/v) en PBS estándar; en todas las etapas el volumen estándar utilizado es de 50 µl/pocillo. El tampón para la técnica ELISA empleado en todas las etapas es PBS con extracto de levadura al 1% (o seroalbúmina bovina [BSA]), y Tween 20 al 0,1%, pH 7,4. Todas las etapas de incubación son de 50–60 minutos a 37°C con agitación suave. Después de todas las etapas se deben realizar lavados de 3–5 minutos empleando PBS con Tween 20 al 0,05%. Como controles se deben utilizar homogenados de hígado de conejo positivos y negativos a la EHC. El conjugado a la peroxidasa de rábano (HRPO) puede ser IgG purificada procedente de un suero policlonal específico o MAb (véase el apartado B.2.2.). En diversos laboratorios se han producido MAb anti-VEHC que pueden emplearse en lugar de sueros policlonales de conejo. También se ha conseguido producir MAb que reconocen epítomos específicos expresados solo por la variante VEHCa y por el VEHC2 (Capucci, datos personales; Le Gall-Reculé *et al.*, 2013).

Para tipificar los VEHC presentes en las muestras (VEHC, VEHCa o VEHC2) mediante un ELISA de tipo sándwich, se aconseja analizar cada muestra usando al menos cuatro réplicas y posteriormente emplear conjugados a HRPO con diferente especificidad, es decir, MAb que reconozcan determinantes antigénicos presentes en la superficie vírica y expresados alternativamente por la cepa clásica, por la variante VEHCa o por el VEHC2, y un conjunto de MAb que reconozcan epítomos internos que puedan detectar tanto partículas subvíricas lisas degradadas como el VSLPE. Se ha descrito una técnica alternativa de ELISA de captura antigénica que emplea como anticuerpo de captura uno de oveja anti-VEHC y un MAb para detectar el VEHC (Collins *et al.*, 1996).

1.1.1. Procedimiento analítico (ejemplo)

En el caso de los pasos que no están indicados específicamente, véase el procedimiento de la técnica C-ELISA para serología (apartado B.2.2).

- i) Se recubre la placa con suero hiperinmune anti-VEHC, con suero hiperinmune anti-VEHC2 y con suero negativo al VEHC. Este último sirve como control para reacciones inespecíficas (muestras que dan falsos positivos). Para cada muestra, se deben sensibilizar ocho pocillos con los sueros positivos y cuatro con el negativo.
- ii) Se diluye el extracto de hígado a 1/5 y 1/30 (dos réplicas para cada dilución) en tampón para la técnica ELISA (véase arriba), directamente en los pocillos de la placa (p. ej. se añaden 45 µl de tampón a todos los pocillos de la placa, se añaden 10 µl de la muestra a los dos primeros pocillos y entonces, después de mezclar, se transfieren 9 µl a los segundos pocillos). Los controles, tanto el positivo como el negativo, se tratan de la misma manera que las muestras problema
- iii) Después de la incubación y del lavado (véase arriba), se incuban con los conjugados específicos a HRPO
- iv) Después de las últimas series de lavados, se añade el sustrato cromógeno. Para el revelado final de la reacción se puede emplear orto-fenilendiamina (OPD) como sustrato de la peroxidasa. Se utilizan tampón citrato fosfato 0,15 M, a pH 5,0, con 0,5 mg/ml de OPD y H₂O₂ al 0,02%. La reacción se para después de 5 minutos añadiendo 50 µl de H₂SO₄ 1M.
- v) Se realiza la lectura de la absorbancia a 492 nm. Las muestras positivas son aquellas que presentan una diferencia de absorbancia >0,3 entre los pocillos recubiertos con suero positivo al VEHC y los pocillos con suero negativo. Normalmente, a la dilución 1/30, las muestras positivas procedentes de conejos con la forma aguda clásica de la EHC dan un valor de absorbancia >0,8, mientras que el valor de una muestra negativa, a la dilución 1/5, varía entre 0,1 y 0,25

Para el diagnóstico del VSLPE, es posible utilizar la técnica ELISA de tipo sándwich específica del VEHC, pero, debido a la gran diferencia antigénica entre ambos virus, existe el riesgo de obtener falsos negativos. Por consiguiente, es muy recomendable realizar un ELISA de tipo sándwich específico del VSLPE, que emplee o un suero de liebre anti- VSLPE positivo y con un elevado título, o MAb contra el VEHC de reacción cruzada (Capucci *et al.*, 1991; 1995), o MAb específicos contra el VSLPE, en vez de suero de conejo (Capucci *et al.*, 1991).

1.2. Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos

Debido al bajo nivel de variación de la secuencia entre cepas de VEHC/VEHCa y a la alta sensibilidad de la PCR, la PCR con transcripción inversa (RT) supone una prueba de diagnóstico de la EHC rápida y adecuada, como defienden varios autores (Gould *et al.*, 1997; Guittre *et al.*, 1995). Este método se lleva a cabo con muestras de órganos (lo óptimo es utilizar hígado o bazo), orina, heces y sueros utilizando distintos cebadores de oligonucleótidos derivados de la región de la cápsida del genoma del VEHC. El Laboratorio de Referencia de la OIE para la EHC utiliza una RT-PCR de un solo paso con los siguientes cebadores específicos del gen PV60: directo: 5'-CCT-GTT-ACC-ATC-ACC-ATG-CC-3'; inverso: 5'-CAA-GTT-CCA-RTG-SCT-GTT-GCA-3'; los cebadores permiten amplificar todas las variantes del VEHC, incluido el VEHC2. El ADNc obtenido de la reacción de la RT se suele amplificar mediante PCR como describieron Guittre *et al.*, 1995 o bien utilizando una metodología de RT-PCR estándar de un solo paso. Para revelar el producto de la PCR, la mezcla de reacción de ADN amplificado se somete a electroforesis en gel de agarosa. Si es necesario, puede determinarse la especificidad del producto de la PCR mediante secuenciación. Para identificar el CVC (calicivirus del conejo) no patógeno se utilizó un método de RT-PCR similar (Capucci *et al.*, 1998). La RT-PCR constituye un método extremadamente sensible para la detección del VEHC, y es al menos 10⁴ veces más sensible que el ELISA (Guittre *et al.*, 1995). No es estrictamente necesaria para el diagnóstico sistemático, pero es más sensible, cómoda y rápida que otras pruebas. De forma similar, se ha utilizado una RT-PCR para la detección del VSLPE a la detección y caracterización de cepas del VSLPE (Le Gall-Reculé *et al.*, 2001[]).

Se ha desarrollado una RT-PCR múltiple en tiempo real con control interno en la que se utilizan sondas fluorógenas TaqMan® y estándares externos para la cuantificación absoluta de ARN, a modo de herramienta diagnóstica para la detección del VEHC. Los oligonucleótidos utilizados en este método son: [directo para VP60-7: 5'-ACY-TCA-CTG-AAC TYA-TTG-ACG-3', inverso para vp60-8_: 5' TCA-GAC-ATA-AGA-AAA-GCC-ATT-GG-3'] y la sonda [VP60-9_fam 5'-FAM-CCA-ARA-GCA-CRC-TCG-TGT-TCA-ACC-T-TAMRA-3']. También se ha creado una RT-PCR TaqMan en tiempo real específica para la detección del VEHC2 (Duarte *et al.*, 2015), en la que se utilizan los siguientes nucleótidos: [RHDV2-F: 5'-TGG-AAC-TTG-GCT-TGA-GTG-TTG-A-3', RHDV2-R: 5'- ACA-AGC-GTG-CTT-GTG-GAC-GG-3'] y la siguiente sonda: [RHDV2: 5'-FAM-TGT-CAG-AAC-TTG-TTG-ACA-TCC-GCC-C-TAMRA-3'.

1.3. Microscopía electrónica

La ME de tinción negativa puede llevarse a cabo utilizando el llamado "método de la gota". Una rejilla recubierta de formvar y fibra de carbono se coloca sobre una gota de suspensión de órgano (preparada como se describe en el apartado B.1) y se deja durante 5 minutos. Después de eliminar el exceso de líquido con el borde de un papel de filtro, la rejilla se coloca flotando sobre una gota de fosfotungstato de sodio (NaPT) al 2%, pH 6,8, durante un minuto y medio. El exceso de colorante se elimina y finalmente la rejilla se observa a x 19–28.500 aumentos.

Se recomienda ultracentrifugar la muestra para concentrar las partículas víricas debido a la baja sensibilidad del método de la gota. El precipitado obtenido después de la ultracentrifugación (al menos a 100 000 **g** durante 30 minutos) se resuspende en PBS o en agua destilada, se coloca sobre una rejilla durante unos pocos minutos y entonces se tiñe como se ha descrito. Se observan los viriones de la EHC, que son partículas sin envoltura de 32–35 nm de diámetro que presentan una capa interna (25–27 nm de diámetro), delimitada por un borde desde el cual salen diez proyecciones cortas y periféricas distribuidas de manera regular. Las partículas lisas (s-VEHC) se identifican por la pérdida completa de las porciones internas, y llegan a ser perfectamente hexagonales y más pequeñas, en las que solo es visible el borde de la cápsida (Barbieri *et al.*, 1997; Capucci *et al.*, 1991; Granzow *et al.*, 1996).

A los efectos del diagnóstico, y en concreto cuando otros métodos dan resultados dudosos, el mejor método de ME es una técnica de inmuno ME (MEI) (Lavazza *et al.*, 2015). En este método se utiliza un suero anti-VEHC hiperinmune, obtenido de conejo o de otras especies, o MABs específicos, que se incuban con un volumen igual de muestra durante 1 hora a 37°C antes de la ultracentrifugación. La reacción inmunitaria induce la agrupación de las partículas víricas en agregados que se identifican

rápida y fácilmente mediante ME. Para identificar mejor los viriones y las proteínas víricas también pueden aplicarse métodos de inmunomarcaje con oro.

El VSLPE también puede identificarse en muestras diagnósticas mediante el examen por ME. Además, puede utilizarse el método de la MEI utilizando suero anti-VSLPE o MAbs específicos anti SLPE de animales convalecientes para identificar el VSLPE. Utilizando antisueros que sean específicos del VSLPE y del VEHC, es posible diferenciar entre ambos virus.

1.4. Prueba de la hemaglutinación

La HA fue la primera prueba utilizada para el diagnóstico sistemático de laboratorio de la EHC (Lui *et al.*, 1984). Dado que el VEHC2 presentaba una actividad HA similar a la del VEHC/VEHCa (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013), este método también podría utilizarse para el diagnóstico del VEHC2. Debe llevarse a cabo una HA con eritrocitos humanos del grupo O, acabados de obtener, conservados durante toda la noche en solución de Alsever, y lavados con PBS al 0,85% a pH 6,5 (intervalo de 6–7,2). La HA es menos evidente o inexistente cuando se utilizan eritrocitos de otras especies. Los eritrocitos lavados se suspenden en PBS al 0,75%. Se incuban una dilución a la mitad del sobrenadante clarificado de un homogenado de tejido al 10% de hígado o bazo con un volumen igual de eritrocitos lavados en una placa de microtitulación de fondo redondo sellada, preferiblemente a 4°C. Tras 1 hora (intervalo de entre 20 minutos y 2 horas) de incubación, una aglutinación a una dilución de punto final superior a 1/160 se considera un resultado positivo. Los títulos inferiores deben considerarse dudosos, y deben comprobarse por otros métodos. Alrededor del 10% de las muestras que dan un resultado positivo en el ELISA o en la ME dan resultados negativos en la HA (falsos negativos en la HA). Algunas cepas de la EHC pueden presentar diferencias en las características de la hemaglutinación dependientes de la temperatura y podrían presentar actividad de HA solo cuando la prueba se lleva a cabo a 4°C. Sin embargo, la falsa negatividad en la HA se obtiene principalmente en órganos de conejos que presentan una forma subaguda/crónica de la enfermedad y depende de las características de las VLP.

Los órganos de liebre casi nunca dan un título significativo al utilizar el protocolo de HA del VEHC. Para observar actividad de HA en órganos de conejos infectados por el VSLPE, debe adoptarse un procedimiento modificado: todos los pasos se llevan a cabo a 4°C, la suspensión de órganos se trata con un volumen igual de cloroformo, y se utilizan eritrocitos a un pH no superior a 6,5 (Capucci *et al.*, 1991). Incluso utilizando este método, solo alrededor de un 50% de las muestras da resultados positivos. Esto se debe a que la enfermedad de las liebres a menudo es subaguda o crónica y, por lo tanto, el virus tiene las características antigénicas y estructurales típicas de las partículas VLP (Capucci *et al.*, 1991).

Dada la dificultad práctica de obtener y conservar eritrocitos humanos, así como el riesgo de trabajar con estas células, y dada la dificultad de obtener resultados coherentes, esta prueba se ha sustituido por el ELISA de detección del virus.

1.5. Inmunotinción

Puede teñirse mediante inmunotinción tejido fijado en formalina tamponada al 10% y fijarse en parafina utilizando el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC). En primer lugar se desparafinan los cortes en xileno y alcohol, se someten a tinción de contraste con hematoxilina durante 1 minuto y se lavan en agua de grifo. A continuación, se sumergen en un baño de metanol que contenga un 3% de H₂O₂ y se lavan en PBS tres veces durante 5 minutos cada una. Para reducir la interferencia de fondo causada por la unión de anticuerpos inespecíficos, las muestras se incuban con suero normal de conejo durante 1 hora a temperatura ambiente antes de añadir la biotina. Los cortes se incuban durante toda la noche en una cámara húmeda a temperatura ambiente con suero de conejo biotinilado anti-VEHC o MAbs, se lavan como antes y se incuban de nuevo 30 minutos a 37°C con una peroxidasa ABC. A continuación, se lavan tres veces. Como sustrato, se utiliza amino-etil-carbazol. Por último, los cortes se lavan en agua de grifo y se montan (Stoerckle-Berger *et al.*, 1992).

Son características y específicas una tinción intensa del núcleo y una tinción difusa del citoplasma de células necróticas del hígado, principalmente de las zonas periportales. También se observa una tinción positiva de macrófagos y de células de Kupffer, así como reacciones hepatocelulares. También pueden detectarse reacciones positivas en los macrófagos de los pulmones, el bazo y ganglios linfáticos, y en las células mesangiales renales (Stoerckle-Berger *et al.*, 1992).

Los cortes de tejido congelados fijados en metanol o acetona puede inmunoteñirse directamente mediante incubación durante 1 hora con suero de conejo anti-VEHC o MAbs conjugados con fluoresceína. Puede detectarse fluorescencia específica en el hígado, el bazo y glomérulos renales.

1.6. Inmunoelctrotransferencia

Cuando otras pruebas, como la HA o el ELISA, dan resultados dudosos (baja positividad) o las muestras son sospechosas de contener partículas s-VEHC, la inmunoelctrotransferencia es útil para determinar el diagnóstico final.

Se preparan homogenados como se ha descrito anteriormente, y a continuación se concentran partículas víricas (diez veces) por ultracentrifugación (100 000 **g** durante 90 minutos) mediante un colchón de sacarosa al 20% (p/p).

Pueden examinarse tanto el sobrenadante como el precipitado para detectar, respectivamente, las subunidades 6S del VEHC (Capucci *et al.*, 1995) y la proteína estructural VP60 desnaturalizada del VEHC o sus fragmentos proteolíticos, cuyo tamaño puede oscilar entre los 50 y los 28 kDa. En cada ocasión deben utilizarse muestras control positiva y negativa.

Podrían detectarse proteínas del VEHC con anticuerpos policlonales o MAbs. Si se utilizan MAbs, deben reconocer epítomos continuos. También pueden utilizarse MAbs específicos del VEHC que reconozcan epítomos internos o enterrados para detectar el VSLPE. Los sueros hiperinmunes de conejo anti-VEHC son menos eficientes que los MAbs para reconocer los mismos patrones de bandas (Capucci *et al.*, 1996).

Se desnaturalizan proteínas de la muestra durante 2 minutos a 100°C en presencia de Tris 60 mM, pH 6,8, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2%, beta-mercaptoetanol al 2%, glicerol al 5%, separadas sobre SDS/PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) al 10%, y a continuación se transfieren aplicando electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa o PVDF (fluoruro de polivinilideno), en Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3, y metanol al 10% (v/v) a 1,5 Å durante 60 minutos con enfriamiento o a 0,15 Å durante toda la noche. Tras la transferencia, las membranas se saturan durante 30-60 minutos en tampón de bloqueo o PBS, pH 7,4, que contenga seroalbúmina bovina (BSA) al 2%, y a continuación se incuban 2 horas a temperatura ambiente con la dilución de suero adecuada en PBS, pH 7,4, y un BSA al 1%. Los filtros se lavan a fondo con PBS y se incuban 1 hora a temperatura ambiente con inmunoglobulinas anti especie marcadas con fosfatasa alcalina a una dilución predeterminada por titulación. Por último, los filtros se lavan de nuevo y se añade el sustrato cromógeno (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/ nitroazul tetrazolio).

Al analizar el precipitado, las muestras problema positivas y el control positivo producirán un patrón de reacción a proteínas de pesos moleculares de 60 kDa (la proteína estructural única del VEHC) o 41–28 kDa (los fragmentos de la VP60 asociada a la transición del VEHC al s-VEHC), y al analizar el sobrenadante, de 6 kDa (las subunidades).

Para identificar el VSLPE también puede utilizarse un análisis por inmunoelctrotransferencia. El procedimiento analítico es idéntico. El patrón de bandas de proteína detectado utilizando un suero policlonal anti-VSLPE o MAbs anti-VEHC de reacción cruzada, es similar. No obstante, el porcentaje de muestras que presentan degradación vírica es superior y, por lo tanto, a menudo se observan varios fragmentos de menor peso molecular, originados en la proteína estructural VP60.

1.7. Inoculación en conejos

Dado que no se ha establecido ningún sistema eficiente de replicación *in-vitro* para el VEHC ni el VSLPE, no puede incluirse el aislamiento en cultivo celular entre los métodos de diagnóstico. Por tanto, la inoculación en conejo sigue siendo la única forma de aislar, propagar y titular la infectividad del VEHC. No obstante, en el diagnóstico de rutina este método debe evitarse por motivos de bienestar animal. Cuando se reúnan las condiciones para aplicar este sistema, los conejos utilizados deben ser totalmente susceptibles al virus, es decir, deben tener más de 2 meses de edad y no presentar anticuerpos anti-VEHC (véase el apartado sobre pruebas serológicas). La EHC puede reproducirse utilizando suspensiones de hígado filtradas y tratadas con antibiótico, inoculadas por vía intramuscular, intravenosa u oronasal. Cuando la enfermedad es clínicamente evidente, los signos y lesiones halladas post-mortem son similares a los descritos en los casos de infección natural. Cuando se usa el VEHC/VEHCa como inóculo, se registra un aumento de la temperatura corporal entre 18 y 24 horas después de la infección (p.i.), seguido de la muerte del animal en un 70-90% de los casos. Unos pocos animales pueden sobrevivir hasta 6-8 días tras la infección. Al analizar la patogenicidad *in vivo* del VEHC2, se comprueba que las mortalidades son mucho menores (20% de media), y que tienen lugar más tarde y a lo largo de un periodo más largo que en el caso del VEHC y del VEHCa, es decir, tienen lugar 3–9 días p.i., y duran 5 días en lugar de tener lugar 2–6 días p.i. y de durar 3–4 días, como se ha observado en general en el caso de la EHC clásica. Los animales que superan la

enfermedad presentan solo hipertermia, abatimiento y anorexia transitorios, pero una llamativa seroconversión que puede detectarse fácilmente a los 3–4 días post-infección.

2. Pruebas serológicas

Puede diagnosticarse infección por el VEHC mediante la detección de una respuesta de anticuerpos específicos. Dado que la respuesta humoral tiene gran importancia para la protección de los animales frente a la EHC, el título de anticuerpos específicos tras la vacunación o en animales convalecientes es un factor predictivo de la capacidad de los conejos de resistir la infección por el VEHC. Teniendo en cuenta la diferencia antigénica que existe entre el VEHC/VEHCa y el VEHC2, tras la infección o la vacunación con una vacuna homóloga se inducen respuestas humorales específicas claramente distintas. Como consecuencia, el diagnóstico serológico debe basarse en métodos en los que se utilicen reactivos inmunológicos específicos del VEHC y del VEHC2. Así, y en especial cuando no se disponga de datos de la anamnesis o epidemiológicos o cuando estos sean muy escasos, debe realizarse pruebas tanto del VEHC como del VEHC2 y deben compararse los resultados.

Para el diagnóstico serológico del VEHC se aplican tres técnicas básicas: inhibición de la hemaglutinación (HI) Lui *et al.*, 1984), ELISA indirecto (I-ELISA) y C-ELISA (Capucci *et al.*, 1991). Cada uno de estos métodos tiene ventajas e inconvenientes. Respecto a la disponibilidad de reactivos y a la complejidad técnica de la realización de la prueba, la HI es el método más cómodo, seguido del I-ELISA y del C-ELISA, respectivamente. Por otra parte, ambos ELISA son más rápidos y fáciles que la HI, en concreto cuando se analiza una gran cantidad de muestras. La especificidad del C-ELISA es destacadamente mayor que las logradas con los otros dos métodos (Capucci *et al.*, 1991). Se ha descrito un método C-ELISA alternativo (Collins *et al.*, 1995). Para mejorar la interpretación serológica y para clasificar correctamente el estado inmunitario de los conejos, también existe una combinación de técnicas ELISA que permite distinguir las respuestas de anticuerpos IgA, IgM e IgG (Cooke *et al.*, 2000).

Para estudios concretos y cuando se necesite un nivel más alto de sensibilidad o para detectar anticuerpos inducidos por CVC no patógenos que presenten reacción cruzada, pueden utilizarse otras pruebas (Capucci, datos no publicados; Cooke *et al.*, 2000) (véase el apartado A. Introducción).

Son las siguientes:

- *I-ELISA*: el antígeno, un homogenado de hígado positivo para el VEHC, se une a la fase sólida mediante un MAb, cuyo epítipo está situado en la envoltura externa del VEHC. A continuación, los sueros se diluyen de forma seriada empezando por 1/40, y la IgG que se une al antígeno se detecta empleando un reactivo, preferiblemente un MAb anti IgG de conejo marcado con peroxidasa de rábano (HRPO). Este ELISA tiene una sensibilidad más alta que el C-ELISA, lo cual permite la medición de anticuerpos que presenten una alta reacción cruzada y puede detectar anticuerpos con baja avidéz.
- *ELISA en fase sólida (SP-ELISA)*: el antígeno purificado se adsorbe directamente a la fase sólida y, debido a la deformación del virus, se exponen epítipos internos. Por tanto, detecta un espectro más amplio de anticuerpos contra el VEHC y tiene una alta sensibilidad y una baja especificidad. Por estos motivos, también puede utilizarse para la serología para la detección del VSLPE. Junto con el I-ELISA, esta prueba podría considerarse específica de los lagovirus, es decir, capaz de detectar anticuerpos contra epítipos de lagovirus comunes presentes en la mitad NH2 de las proteínas VP60.
- *ELISA de tipo sándwich para detectar IgM e IgG en muestras de hígado o bazo ya examinadas con la prueba virológica*: este tipo de prueba es especialmente útil en los animales que mueren por la forma “crónica” de la enfermedad, cuando la detección del virus puede ser difícil con HA o ELISA. En este caso, una concentración alta de IgM específica del VEHC y una concentración baja, si la hay, de IgG son marcadores inequívocos de positividad a la EHC.

2.1. Inhibición de la hemaglutinación

Antígeno: El antígeno se prepara utilizando hígado de conejo infectado recogido justo después de que el animal muera. El hígado se homogeniza en PBS al 10% (p/v), pH 6,4, y se clarifica mediante dos centrifugaciones consecutivas a baja velocidad (500 **g** durante 20 minutos y 6 000 **g** durante 30 minutos). El sobrenadante, que se extrae del tubo de tal modo que se evite la capa lipídica superficial, se filtra por un filtro de 0,22 μ m de tamaño de poro, se titula mediante HA, y se distribuye en alícuotas, que se conservarán a -70°C .

Muestras de suero: Antes de analizarlos, los sueros se inactivan por incubación a 56°C durante 30 minutos. A continuación, los sueros se tratan con caolina al 25% (dilución final del suero: 1/10) a 25°C durante 20 minutos y se centrifugan. Esto va seguido de un segundo tratamiento con caolina, también a 25°C durante 20 minutos, esta vez con 1/10 del volumen de eritrocitos humanos del grupo O concentrados a aproximadamente el 50%. Estos se recogen frescos, se mantienen toda la noche en

solución de Alsever y se lavan con PBS al 0,85%, pH 6,5. Los sueros se clarifican mediante centrifugación.

2.1.1. Procedimiento analítico

- i) Se depositan 50 µl de suero en el primer pocillo de una placa de microtitulación de fondo redondo y se preparan diluciones a la mitad en los pocillos 2–8 utilizando PBS con BSA al 0,05%.
- ii) Se añaden 25 µl de antígeno VEHC que contenga 8 unidades de HA a cada pocillo y se incuba la placa a 25°C durante 30–60 minutos.
- iii) Se añaden 25 µl de eritrocitos humanos del grupo O a una concentración del 2-3% a cada pocillo y se dejan en reposo a 25°C durante 30–60 minutos.
- iv) Se titula el antígeno con cada prueba para garantizar que se hayan utilizado 8 HA/ 25 µl, y se incluyen sueros control positivo y negativo.

El título del suero es la dilución a punto final que presente inhibición de la HA. El umbral de positividad de los títulos séricos se correlaciona con el título de los sueros control negativos; normalmente se encuentra en el intervalo de 1/20 a 1/80.

Como ocurre con la prueba de HA (apartado B.1.4), la dificultad de obtener eritrocitos humanos del grupo O y de trabajar con ellos ha hecho que esta prueba se está sustituyendo por el ELISA serológico o de detección de anticuerpos.

2.2. Enzimoimmunoanálisis de competición

Antígeno: Debido a la reciente aparición del VEHC2, las pruebas serológicas de detección de la EHC deben basarse en el uso de dos antígenos: el VEHC clásico y el VEHC2.

El antígeno puede prepararse como se ha descrito previamente en el apartado sobre HI, B.2.1, con cuidado de conservarlo a -20°C en presencia de glicerol al 50% (v/v) para impedir que se congele. Si es necesario, el virus se puede inactivar antes de añadir el glicerol, utilizando etilenimina binaria (BEI) al 1% a 33°C durante 24 horas.

El antígeno debe pretitularse en ELISA y a continuación utilizarse como reactivo limitante: es decir, la dilución que corresponde a un 60-70% de la altura de la meseta (valor de la absorbancia a 492 nm en el intervalo 1,1-1,3).

Suero anti-VEHC: pueden obtenerse sueros policlonales específicos con alto título anti-VEHC o anti-VEHC2 de distintas formas. Dos posibles métodos, que se utilizan actualmente, son los siguientes:

- i) Se infectan conejos con extracto de hígado al 10% positivo a VEHC diluido a 1/100 en PBS para obtener sueros convalecientes (21–25 días) que contengan una alta concentración de IgG anti-VEHC. En el caso del VEHC, debido a la alta tasa de mortalidad, es necesario infectar al menos 10–15 conejos seronegativos de más de 8 semanas de edad o infectar conejos que solo estén parcialmente protegidos (por ejemplo, 4–8 conejos infectados desde los 3 a 7 días post-vacunación). Deben tomarse muestras de sangre de los conejos que sobreviven a la infección 21–25 días post-infección para obtener sueros convalecientes (según el ELISA, títulos de 1/10240). Como alternativa, pueden re-infectarse conejos convalecientes 3–4 meses post-infección y extraérseles muestras de sangre 10–15 días después para obtener sueros hiperinmunes contra el VEHC. En el caso del VEHC2, las principales dificultades están relacionadas con el hecho de que los sueros de los conejos convalecientes infectados a menudo tienen un título 20–40 veces inferior al inducido por el VEHC, supuestamente como consecuencia de la baja mortalidad inducida. Por lo tanto, como en el caso anterior, para la infección experimental deben utilizarse un mínimo de 10–15 conejos seronegativos.
- ii) El antígeno (VEHC o VEHC2) se purifica a partir de los hígados de conejos infectados experimentalmente que hayan muerto por la forma aguda de la enfermedad (entre 28 y 40 horas post-infección), utilizando uno de los métodos publicados (Capucci *et al.*, 1991; 1995; Ohlinger *et al.*, 1990). A continuación, el antígeno VEHC purificado puede utilizarse para inmunizar ovejas o cabras según los protocolos clásicos utilizando adyuvantes oleosos. También puede aplicarse el procedimiento utilizado para inocular conejos si antes de la inoculación se inactiva el virus purificado.

Pueden utilizarse MAbs anti-VEHC en lugar de sueros policlonales de conejo. La purificación de IgG de conejo y la conjugación a HRPO puede realizarse siguiendo los protocolos estándar. El anticuerpo

conjugado se titula en un ELISA de tipo sándwich en presencia y en ausencia de antígeno VEHC (hígado de conejo negativo). A continuación, se utiliza a la máxima dilución que presente absorbancia máxima (parte alta de la meseta) (si el suero tiene un buen título anti-VEHC, el valor del conjugado a HRPO debe oscilar entre 1/1000 y 1/3000).

Sueros control: el suero negativo se consigue extrayendo suero de conejos totalmente susceptibles a la infección por el VEHC. El suero positivo puede ser un suero convaleciente diluido a 1/100 en un suero negativo, o bien un suero tomado de un animal vacunado.

2.2.1. Procedimiento analítico (ejemplo)

NB: Este procedimiento también es válido para el VEHC2 si se emplean reactivos homólogos.

- i) El suero de conejo anti-VEHC diluido a un título predeterminado, por ejemplo, a 1/5 000 en tampón carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6, debe adsorberse a una microplaca de ELISA de alta capacidad de adsorción (por ejemplo, la Nunc Maxisorb Immunoplate) a 4°C durante toda la noche.
- ii) Se lava la placa tres veces durante 3-5 minutos cada vez, en PBS, pH 7,4, con Tween 20 al 0,05% (PBST). Cuando las placas no se vayan a utilizar de inmediato, pueden conservarse, cerradas en una bolsa de plástico, durante 1 mes a -20°C.
- iii) Se distribuyen 25 µl/pocillo de PBST con un 1% de extracto de levadura (PBSTY) o BSA (PBST-BSA) al 1% a todos los pocillos necesarios de la placa (véase abajo). Se añaden 7 µl de la primera muestra de suero a los dos primeros pocillos (A1 y B1), 7 µl del segundo suero a los dos pocillos siguientes (C1 y D1), y se sigue con el tercer (E1 y F1) y cuarto (G1 y H1) sueros, completando así la primera columna. Si se precisan datos cualitativos (positivo/negativo), se repite la operación en la segunda columna con muestras de los sueros 5 a 8, y en la tercera columna con muestras de los sueros 9 a 12, y así sucesivamente. Si el título del suero tiene que determinarse, este debe volver a diluirse. Se agita la placa y a continuación se utiliza una micropipeta de ocho canales para transferir 7 µl de los pocillos de la columna 1 a los pocillos de la columna 2. Esto corresponde a una dilución de los sueros a 1/2. Esta última operación puede repetirse una vez (título 1/160), dos veces (título 1/640), o cuatro veces (título 1/10 240). Tanto en el caso del análisis los datos cualitativos de los sueros (dilución única) como al obtener el título final (varias diluciones), se completa cada placa dejando 12 pocillos vacíos para los sueros control. Se añaden 7 µl de sueros positivos a los pocillos G7 y H7, y 7 µl de sueros negativos a los pocillos G10 y H10, y a continuación se diluyen una y dos veces (1/40–1/160).
- iv) Se añaden 25 µl/pocillo de antígeno suspendido en PBSTY a todos los pocillos de la placa, a una dilución que sea el doble que la dilución decidida, como se ha descrito anteriormente en el apartado sobre antígeno (véase la primera parte de la descripción de este método ELISA).
- v) Se incuba la placa a 37°C sobre una plataforma de balanceo durante 50–60 minutos.
- vi) Se lava la placa como se describe en el paso ii.
- vii) Se añaden 50 µl/pocillo de IgG de conejo anti-VEHC conjugada a HRPO a la dilución decidida, como se describe anteriormente en el apartado “suero anti-VEHC” (véase la primera parte de la descripción de este ELISA).
- viii) Se incuba la placa a 37°C sobre una plataforma de balanceo durante 50-60 minutos, y se lava como se describe en el paso ii añadiendo un cuarto paso de 3 minutos de duración.
- ix) Se utilizan 50 µl/pocillo de OPD como donante de hidrógeno en las siguientes condiciones: 0,5 mg/ml de OPD en tampón fosfato/citrato 0,15 M, pH 5, y H₂O₂ al 0,02%. Se detiene la reacción pasados 5 minutos añadiendo 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 M.
- x) Se lee la placa en un espectrofotómetro utilizando un filtro de 492 nm.

El suero se considera negativo cuando la absorbancia de la primera dilución (1/10) disminuye menos de un 15% respecto al valor de referencia (dilución a 1/10 del suero control negativo), mientras que es positivo cuando la absorbancia disminuye un 25% o más. Cuando la absorbancia de la dilución a 1/10 disminuye entre un 15% y un 25% respecto al valor de referencia, el suero se considera dudoso.

El título del suero corresponde a la dilución que da una absorbancia igual al 50% (± 10) de la media de los valores de las diluciones de los tres sueros negativos. Se ha comprobado que este valor también es válido para el C-ELISA con VEHC2.

Puede hallarse un amplio intervalo de títulos, en función del origen de la muestra. Los sueros positivos oscilan entre 1/640 y 1/10 240 en conejos convalecientes, entre 1/80 y 1/640 en conejos vacunados y entre 1/10 y 1/160 en infección “no patógena”. Conocer el origen de las muestras permite decidir si analizar una o más diluciones. Analizar solo la primera dilución da un resultado positivo o negativo. El título se establece analizando todas las diluciones, hasta la sexta.

Debido a las importantes diferencias antigénicas existentes entre el VEHC y el VSLPE (Capucci *et al.*, 1991; Stoerckle-Berger *et al.*, 1992), las técnicas serológicas descritas arriba, que utilizan el VEHC como antígeno, no se recomiendan para el diagnóstico serológico del SLPE. No obstante, podría utilizarse un ELISA directo para la detección de sueros de liebre positivos y negativos al VSLPE; de hecho, la adsorción de VEHC en la fase sólida de una microplaca de ELISA expone determinantes antigénicos que causan reacción cruzada. Como alternativa, puede prepararse un C-ELISA específico del VSLPE de forma similar, utilizando reactivo específico (antígeno y antisueros) preparado como se describe arriba para el VEHC.

2.3. Enzimoimmunoanálisis de detección de isotipos (isoELISA)

Los isoELISA permiten detectar y titular isotipos de las inmunoglobulinas IgA, IgM e IgG. Los títulos de los isotipos son críticos para la interpretación serológica de campo en cuatro áreas principales: anticuerpos de reacción cruzada, resistencia natural de conejos jóvenes, anticuerpos maternos y anticuerpos en conejos infectados previamente (Cooke *et al.*, 2000). De hecho, en el caso de los anticuerpos pasivos, solo se detectan las IgG; en animales vacunados, no se detectan IgA, y en conejos infectados recientemente, primero se detectan las IgM y a continuación las IgA y las IgG (Cooke *et al.*, 2000).

Para detectar la IgG específica del VEHC, se adhiere un MAb específico del VEHC a una placa Maxisorp a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ mediante el método descrito anteriormente para el suero policlonal en la prueba C-ELISA (véase el apartado anterior B.2.2, etapa i), del procedimiento analítico). Se añade el virus a las placas a una concentración doble a la empleada en el C-ELISA y después de la incubación y el lavado, se añaden los sueros y se realizan diluciones seriadas a un cuarto comenzando por 1/40. Se emplea un MAb anti-IgG de conejo conjugado a HRPO para detectar la IgG unida al virus. La etapa final de los isoELISA para IgG, IgM e IgA consiste en la adición de OPD y H_2SO_4 , como en el C-ELISA. Para detectar los isotipos de la IgM y la IgA, se invierten las fases de la reacción ELISA con el fin de evitar la competición con la IgG, que habitualmente es el isotipo predominante. Se adhiere a los pocillos un MAb anti-IgM de conejo o anti-IgA de conejo y después los sueros se diluyen como se ha descrito anteriormente. A continuación se incuban con el antígeno y entonces se utiliza un MAb conjugado a HRPO para detectar el VEHC unido a la placa. Los sueros se consideran positivos si el valor de OD_{492} (densidad óptica) a la dilución 1/40 es más de 0,2 unidades de OD (dos desviaciones estándar) superior al valor del suero negativo utilizado como control. El título de cada suero se considera como la última dilución que da un valor positivo. Debido a que las pruebas isoELISA no siguen metodologías idénticas, títulos equivalentes no implican que haya isotipos en las mismas cantidades. Este método también podría aplicarse para la serología con el VEHC2, lógicamente utilizando los MAb específicos del VEHC2.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

En los países donde la EHC es endémica, se realizan controles indirectos de la enfermedad en conejos tanto de producción como mascotas mediante vacunación empleando el tipo apropiado de vacuna, que se prepara a partir de una suspensión clarificada de hígado de conejos infectados experimentalmente que posteriormente se inactiva, y a la que se añade un adyuvante. Los métodos de inactivación (formaldehído, beta-propiolactona u otras sustancias) y los adyuvantes empleados (aceite mineral incompleto o hidróxido de aluminio), pueden variar de acuerdo con el protocolo utilizado por cada fabricante.

El nivel de protección cruzada que induce la vacunación con vacunas VEHC/VEHCa contra el VEHC2 es bajo y no previene ni la infección ni las pérdidas derivadas de la enfermedad clínica. Por lo tanto, es

muy aconsejable una vacunación combinada con ambos tipos antigénicos o bien el uso de una vacuna homóloga a la cepa VEHC que se haya identificado durante la epidemia o el brote en cuestión.

La mayoría de fabricantes de vacunas recomienda una única vacunación básica con revacunación anual. Normalmente, se inyecta por vía subcutánea una dosis de 1 ml en la zona del cuello, o bien por vía intramuscular. La primera inyección debe administrarse a los 2–3 meses. En las explotaciones sin antecedentes de la enfermedad, en las que el ganadero indica que no hay EHC, es aconsejable vacunar solo a los reproductores. Teniendo en cuenta la alta tasa de reposición en las explotaciones cunícolas industriales, el programa de vacunación habitual consiste en administrar la vacuna a todos los reproductores, con independencia de su edad, cada 6 meses. Esto debería garantizar que todos los animales reciban al menos una vacuna al año. Es muy recomendable la revacunación para asegurar un buen nivel de protección, aunque datos experimentales indican que la protección suele durar mucho (más de 1 año).

Dado el corto ciclo de vida (de unos 80 días) de los conejos de engorde y su resistencia natural que presentan hasta las 6-8 semanas de edad a la enfermedad causada por el VEHC/VEHCa, pero no al VEHC2, la vacunación de estos animales no es necesaria si la situación de la explotación es normal, es decir, si se aplican unas buenas medidas de bioseguridad y no hay brotes de la enfermedad en la zona. Tras un brote de EHC, y sobre todo en el caso del VEHC2, que podría inducir enfermedad incluso en gazapos, a pesar de que se apliquen estrictas medidas de higiene y sanitarias, como limpieza y desinfección, un desechado seguro de los animales muertos y un vacío sanitario, es muy recomendable vacunar a los animales de engorde a la edad de 30-40 días, porque la incidencia de la reinfección es muy alta. Solo tras varios ciclos productivos es aconsejable dejar de vacunar. Para verificar la persistencia de la EHC infectiva dentro de la unidad, deberá dejarse sin vacunar un número variable de conejos, empezando con un pequeño grupo centinela.

Dado que la inmunidad empieza pasados unos 7-10 días, la vacunación también puede considerarse un tratamiento post-exposición bastante eficaz. En algunas situaciones en concreto puede incluirse en las estrategias de emergencia aplicadas cuando surge EHC en estas explotaciones que disponen de naves separadas y en las que se aplican con regularidad buenas medidas de bioseguridad. De hecho, podrían obtenerse mejores resultados de reducción de la propagación de la enfermedad y de las pérdidas económicas aplicando suero terapia mediante la administración parenteral de sueros hiperinmunes anti-VEHC, lo cual da lugar a una rápida aunque corta protección frente a la infección por el VEHC. En ambas situaciones (vacunación seguida de tratamiento post-exposición y protección pasiva con sueros hiperinmunes), es necesario utilizar una vacuna y unos sueros homólogos a la cepa del VEHC causante de la enfermedad. Es algo especialmente cierto en el caso del VEHC2 dado la escasa protección cruzada que inducen las vacunas clásicas basadas en VEHC/VEHCa.

La vacuna debe conservarse a 2–8°C y no debe congelarse ni exponerse a la luz del sol ni a altas temperaturas.

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas convencionales

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

Actualmente, la replicación del VEHC solo se puede lograr mediante la infección de animales susceptibles. Por lo tanto, la fuente de inóculo vírico para la producción de vacunas inactivadas a partir de tejidos son homogenados de hígado infectado obtenidos por pases seriados en conejos que han sido inoculados con una suspensión vírica de EHC parcialmente purificada. Los conejos utilizados para la inoculación se escogen de colonias que, mediante análisis serológicos periódicos, se ha demostrado que están sanas y que son susceptibles a la enfermedad. Para obtener hígados para la producción de vacuna contra el VEHC2 podrían surgir más dificultades debido a que en infecciones experimentales se registra una menor mortalidad.

2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

La suspensión de virus de la EHC parcialmente purificada se obtiene centrifugando la suspensión de hígado a 1/5 (v/v) en PBS a 10 000 **g** durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se trata con polietilenglicol (PEG 6000) al 8% (v/v) durante toda la noche a 4°C. El precipitado se vuelve a suspender a una dilución de 1/10 en PBS, y a continuación se centrifuga a 10 000 **g** durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se ultracentrifuga a 80 000 **g** durante 2 horas a 4°C mediante un colchón de sacarosa al 20%. El precipitado se vuelve a suspender en PBS (1/100 del volumen inicial).

A continuación, esta suspensión vírica se caracteriza por tres métodos: un examen por ME con tinción negativa, determinación de la reactividad en ELISA con distintos MAb's específicos y actividad HA a temperatura ambiente (título de HA contra eritrocitos humanos del grupo O superior a 1/1280).

La ausencia de bacterias, hongos o micoplasmas viables debe determinarse utilizando métodos bacteriológicos de laboratorio comunes. Pueden utilizarse PCR para la detección de determinados virus extraños (como el virus *Myxoma*).

El inóculo vírico se controla mediante inoculación directa en conejos susceptibles seguida de la evaluación de los signos clínicos en el curso de la infección experimental. Para que un virus de inóculo sea considerado adecuado, deberá causar una tasa de mortalidad que variará según el tipo de cepas, es decir, del 70-80% de los conejos en el caso del VEHC/VEHCa y menor en el caso del VEHC2 (20% de media), en un plazo máximo de 24-96 horas post-inoculación, con lesiones en órganos internos características de la EHC. Para validar la prueba, debe llevarse a cabo un examen macroscópico e histopatológico de todos los conejos para excluir enfermedades subyacentes.

El inóculo vírico se titula antes de ser utilizado y debe contener al menos 10^5 DL₅₀. Debe conservarse congelado (-70°C), mejor añadiendo un volumen de glicerol a razón de 1:1 o bien liofilizándolo.

2.2. Método de fabricación

2.2.1 Procedimiento

El proceso de fabricación de la vacuna es similar con ambos tipos antigénicos (VEHC y VEHC2). Después de la inoculación de conejos susceptibles, se recogen el hígado y el bazo de los conejos que mueran entre las 24 y las 96 horas después de la inoculación. Los conejos que hayan muerto después, deberán descartarse. Los órganos se pican en una solución diluida a 1/10 (p/v) de PBS estéril, pH 7,2-7,4 y la mezcla se homogeniza durante 10 minutos en una mezcladora en condiciones de refrigeración. A continuación, la mezcla se trata con cloroformo al 2% (18 horas a 4°C) y posteriormente se centrifuga a 6 000 g durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante se recoge mediante una bomba a alta presión continua y seguidamente se inactiva. La suspensión vírica se analiza utilizando la prueba HA y la técnica ELISA y, una vez que se conozca el número de unidades de HA a partir de la titulación inicial, se añade más PBS estéril en cantidad suficiente para conseguir, después de la inactivación y de la adsorción/adición al adyuvante, una concentración de 640-1 280 unidades de HA/ml en el producto comercial. Varios agentes han demostrado ser eficaces para acabar con la infectividad vírica. Los más empleados son el formaldehído y la beta-propiolactona, que pueden utilizarse a diferentes concentraciones y temperaturas durante periodos variables de tiempo y también combinados. Durante la inactivación, se aconseja agitar continuamente el líquido. A continuación, se incorporan a la vacuna, como adyuvantes, hidróxido de aluminio, el adyuvante incompleto de Freund u otra emulsión de aceite. Finalmente se añade un conservante, tiomersal (mertiolato), a una dilución de 1/10 000 (v/v) antes de la distribución en frascos.

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

Dado que el virus no puede crecer *in vitro*, los únicos requisitos son los relativos a animales infectados. Los conejos deben estar libres del VEHC y del virus de la mixomatosis y no deben tener anticuerpos anti-VEHC, incluidos los anticuerpos de reacción cruzada inducidos por el calicivirus no patógeno del conejo relacionado con el VEHC (CVC).

Los animales (de al menos 4 meses de edad) deben mantenerse en estricta cuarentena al llegar, en una zona independiente, y deben criarse en condiciones sanitarias y de bioseguridad satisfactorias (véase el apartado sobre instalaciones para animales de Laboratorio en el Capítulo 1.1.4. *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*).

La propagación del inóculo vírico y la producción de lotes de vacuna se basan en el mismo protocolo de infección experimental, que incluye la inyección intramuscular de una dosis de al menos 100 LD₅₀.

2.2.3. Controles durante el proceso

i) Contenido en antígeno

El título de VEHC se determina antes de la inactivación calculando el título de HA, que debe ser superior a 1/1 280, y la reactividad según el ELISA. Ambos valores se determinan de nuevo tras la inactivación y adsorción/adición del adyuvante. La ME con tinción negativa confirma la identidad de EHC.

ii) Esterilidad

Se analizan los órganos para comprobar si contienen bacterias, virus, hongos o micoplasmas viables según el protocolo utilizado para analizar el virus del inóculo primario. Se esteriliza solución PBS e hidróxido de aluminio en autoclave; se esteriliza emulsión oleosa calentándola a 160°C 1 hora.

iii) Inactivación

Antes de añadir el adyuvante, se debe comprobar que el agente inactivante y el proceso de inactivación inactivan el virus vacunal en las condiciones de fabricación. Así pues, se lleva a cabo una prueba en cada lote de vacuna a granel y en el producto final.

Se utilizan 30 conejos adultos (de más de 4 meses de edad) y se agrupan en tres grupos de 10. El primer y segundo grupos se inyectan con antígeno concentrado y se mantienen en observación durante 15 y 7 días, respectivamente. El segundo grupo se sacrifica por medios humanitarios. El tercer grupo se inyecta con el hígado de conejos del segundo grupo y se mantiene en observación durante 21 días. La dosis del inóculo, administrada por vía parenteral (intramuscular o subcutánea), es de 1 ml de antígeno concentrado (precipitación de PEG) correspondiente a un mínimo de 10 dosis (HA \geq 20 480). El periodo de observación es: 10 conejos durante 7 días, 10 conejos durante 15 días y 10 conejos durante 21 días. Todos los conejos mantenidos en observación deben sobrevivir sin ningún signo clínico. El hígado debe dar resultados negativos en la prueba de la HA y en el ELISA de tipo sándwich. Los conejos inoculados con antígeno deben tener un título serológico positivo (por ejemplo $>1/80$ en el C-ELISA específico para el virus homólogo) y los inyectados con hígados obtenidos tras el primer pase deben ser serológicamente negativos.

2.2.4. Análisis de los lotes de producto final

Deben llevarse a cabo pruebas de esterilidad, inocuidad y potencia en cada lote de vacuna final; asimismo, deben realizarse pruebas de duración de la inmunidad una vez utilizando un lote característico de la vacuna, y pruebas de estabilidad en tres lotes.

i) Esterilidad/pureza

Se debe comprobar en cada lote de vacuna si hay bacterias, virus, hongos o micoplasmas viables según el protocolo recomendado para analizar el virus inóculo primario.

ii) Inocuidad

Antes de proceder a los estudios de campo, la inocuidad de esta nueva vacuna se analiza en pruebas de laboratorio. En concreto, deben llevarse a cabo las siguientes pruebas de inocuidad:

- a) La inocuidad de la administración de una dosis;
- b) La inocuidad de la administración de una sobredosis (al menos dos dosis de vacuna inactivada);
- c) La inocuidad de la administración repetida de una dosis.

La prueba se lleva a cabo para cada vía de administración aprobada. Se utilizan al menos 10 adultos (de más de 4 meses de edad) que no tengan anticuerpos anti VEHC. Se observan estos animales durante 21 días evaluando los siguientes parámetros: condiciones y reacciones generales, estado sensitivo, consumo de agua y alimento, características de las heces, y reacciones anómalas locales en el punto de inoculación. Se registra la temperatura corporal el día antes de la vacunación, en el momento de la vacunación, 4 horas después de la vacunación y, a continuación, a diario durante 4 días; se anota el máximo aumento de temperatura corporal en cada animal. No debe producirse ninguna reacción anómala, ni local ni sistémica; la media de aumento de la temperatura

corporal no debe ser superior a 1°C y ningún animal debe presentar un aumento de temperatura superior a los 2°C. Puede producirse una reacción local que dure menos de 21 días. Si la vacuna va destinada a conejas gestantes, se administra a no menos de 10 conejas gestantes según el programa recomendado. Se prolonga el periodo de observación hasta 1 día post-parto. Las conejas deben seguir sanas y no deben observarse reacciones anómalas ni locales ni sistémicas. No deben aparecer efectos adversos en la gestación ni en los gazapos.

iii) Potencia del lote

Se utilizan conejos adultos (de más de 4 meses de edad) susceptibles, libres de anticuerpos anti-VEHC y criados en condiciones adecuadas de aislamiento para garantizar la ausencia de contacto con el VEHC. Se vacunan diez conejos con una dosis completa de vacuna administrada por la vía recomendada. Se vacunan dos grupos más de cinco animales cada uno con $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{6}$ de la dosis, respectivamente. Un cuarto grupo de 10 conejos no vacunados se mantiene como control. Todos los animales se exponen no menos de 21 días post-vacunación por inoculación intramuscular de una dosis del VEHC que contenga al menos 100 DL₅₀ o que presente un título de HA superior a 1/2 560. Se observan los conejos durante 21 días más. La prueba no es válida si: a) durante el periodo entre vacunaciones y exposición más del 10% de las vacunas o más del 20% de los conejos control presentan signos clínicos anómalos o mueren por causas no atribuibles a la vacuna; b) tras la exposición al VEHC/VEHCa, menos de un 70% de los conejos control muere con signos característicos de la EHC; o c) tras la exposición al VEHC2, menos de un 10% de los conejos control muere y menos del 70% de ellos presenta títulos altos de anticuerpos ($>1/1280$ empleando el C-ELISA homólogo). La vacuna supera la prueba si: a) no menos del 90% de los conejos vacunados está exento de signos de la EHC; b) la media del nivel de anticuerpos de los animales vacunados no es significativamente inferior al nivel registrado en la prueba de protección realizada utilizando como vacuna el virus inóculo inactivado.

2.3. Requisitos para la autorización

Las pruebas de inocuidad, potencia y esterilidad del producto final deben realizarse tras envasar en frascos la vacuna y empaquetar los frascos. Así pues, es importante que estos dos últimos pasos de la fabricación se lleven a cabo siguiendo procedimientos estandarizados de buena fabricación. Las pruebas se llevan a cabo tomando muestras de un número, determinado estadísticamente, de recipientes multidosis de vacuna elegidos aleatoriamente (20, 50 o 100 dosis).

2.3.1. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

El conejo es la única especie susceptible al VEHC, y por motivos de bienestar del animal, las pruebas y estudios deben llevarse a cabo solo en la especie de destino. Los requisitos de inocuidad del producto final para conejos deben verificarse en estudios de campo tanto en conejos de engorde como en reproductores. Deben utilizarse al menos 30 conejos reproductores, de más de 4 meses de edad, y 70 conejos de 30–45 días de edad. Se vacunan por vía subcutánea conejos reproductores en el dorso del cuello dos veces (con un intervalo de 3 semanas) con una dosis cada vez. Se vacunan conejos de engorde a la edad de 30 o 45 días. Se observan los animales durante 4 meses desde la primera vacunación. Se mantienen animales no vacunados como controles.

El control de la inocuidad de la vacuna en conejos reproductores se realiza evaluando su rendimiento reproductivo. Se evalúan los siguientes parámetros: reacciones locales o generales; número total de gazapos nacidos y número de gazapos nacidos vivos; porcentaje de mortalidad en el periodo de destete; peso medio de los gazapos en el periodo de destete; consumo diario de alimento. El control de la inocuidad de la vacuna en conejos de engorde se realiza evaluando su salud a diario. Se evalúan los siguientes parámetros: reacciones locales o generales; aumento de peso individual desde el destete (30 días) y cada 15 días; ingesta diaria de alimento; índice de conversión; mortalidad durante el periodo de engorde. Los conejos vacunados no deben presentar ninguna alteración de su estado general ni reacciones anómalas locales ni sistémicas en ningún momento de la prueba.

La vacuna no puede contener ningún ingrediente que pueda suponer un riesgo para los consumidores de los conejos vacunados. No obstante, dado que la vacuna inactivada contiene un adyuvante de aceite mineral, existe un riesgo asociado que podría surgir en

caso de autoinyección accidental. La inyección accidental puede causar una hinchazón intensa y graves consecuencias si no se recibe atención médica enseguida.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas

No se produce reversión a la virulencia porque es una vacuna inactivada.

iii) Consideraciones medioambientales

Durante los estudios de campo de inocuidad y eficacia, deben comprobarse y registrarse las posibles interacciones con otras vacunas (como la vacuna contra la mixomatosis) o productos farmacéuticos (alimentos medicados que contengan antibióticos contra enfermedades respiratorias y enteritis bacterianas). Hasta ahora no se ha documentado ninguna interacción.

La vacuna inactivada no se propaga al ambiente y, según estudios previos, no ha habido signos de problemas de ecotoxicidad con los antígenos víricos. El riesgo de ecotoxicidad causada por el uso de la vacuna es inexistente por la naturaleza de la vacuna (vacuna inactivada para uso parenteral). La vacuna no contiene ingredientes que puedan suponer un riesgo para el medioambiente. Además, la vacuna se administra por inyección, de modo que la contaminación medioambiental es improbable. Para lograr el máximo nivel de inocuidad de acuerdo con las buenas prácticas de higiene, los frascos deben sumergirse en una solución antiséptica tras su uso.

2.3.2. Requisitos de eficacia

La eficacia debe comprobarse en el laboratorio con pruebas tanto de desafío como serológicas. Se exponen al virus virulento 40 conejos (20 vacunados y 20 no vacunados), de al menos 4 meses de edad: al menos un 90% de los animales vacunados debe quedar protegido, dando títulos serológicos positivos, y un porcentaje de los animales control no vacunados, similar al porcentaje registrado para la infección natural según el tipo de cepa (es decir, un 70-90% en el caso del VEHC y un 5-70% en el caso del VEHC2) debe haber muerto durante el periodo de observación.

La eficacia de la vacuna en condiciones de campo podría determinarse evaluando la seroconversión en muestras de sangre tomadas de conejos tanto de engorde como reproductores en distintos momentos tras la vacunación. Se miden los títulos por C-ELISA y por ELISA de detección de anti-isotipos IgM, IgA e IgG utilizando métodos específicos y homólogos según el tipo de virus (VEHC/VEHCa o VEHC2).

Antes de la primera vacunación, debe confirmarse mediante C-ELISA en todos los conejos la total ausencia de anticuerpos anti-VEHC o la presencia de títulos en el límite inferior de aceptación del título de protección $\leq 1/10$. Los animales vacunados desarrollan una inmunidad protectora frente al VEHC en un corto periodo de tiempo: en el suero de animales infectados, hay anticuerpos circulantes justo 3-4 días después de la infección (IgM e IgA), mientras que en conejos vacunados con la vacuna inactivada y adyuvantada, los primeros anticuerpos suelen aparecer tras 7-10 días (solo IgM). Aparecen IgG pasados 15-20 días. Tras la vacunación, hay muy poca producción de IgA, o nula. Dado que se produce solo durante la infección con el virus vivo tras la diseminación oronasal, la IgA podría considerarse un marcador de contacto con el virus de campo. El sistema inmunitario de las mucosas también podría intervenir en la protección frente a la enfermedad incluso aunque la vacuna se administre por vía parenteral y no oral. Esto es lo que sugieren estudios de desafío en conejos vacunados cuando aparece IgA pero no IgM muy rápidamente en el suero, e indica que a nivel de las mucosas ya hay células B con memoria capaces de producir IgA, que normalmente es el primer lugar de replicación del VEHC.

Existe una correlación definida entre el título obtenido con cada C-ELISA y el estado de protección frente a la enfermedad inducida por las cepas homólogas, es decir, los conejos con títulos superiores a 1/10 de anticuerpos específicamente inducidos por una cepa (VEHC/VEHCa/VEHC2) no mostraron ningún signo de enfermedad cuando se les expuso a la misma cepa virulenta. En conejos convalecientes, los títulos serológicos podrían ser de incluso 1/20480, mientras que en conejos vacunados suelen estar entre 1/40 y 1/640 según el tiempo transcurrido desde la vacunación. Los anticuerpos maternos (solo IgG) suelen desaparecer antes de los 30 días de edad en gazapos de corta edad nacidos de conejas sanas vacunadas, pero duran más (hasta los 45-55 días de edad) cuando los conejos son hijos de conejas convalecientes, puesto que los títulos pasivos de los gazapos están directamente relacionados con los de sus madres. Esto se cumple en gazapos de explotaciones industriales que se

destetan bastante temprano (25-35 días de edad), mientras que en gazapos salvajes los anticuerpos maternos pueden durar hasta 80 días (Forrester *et al.*, 2002). En los gazapos (<35–40 días de edad), una infección activa por VEHC/VEHCa que no comporte enfermedad, como suele ocurrir en animales de esta edad, también podría inducir un bajo nivel de anticuerpos (1/80-1/320).

Los datos publicados indican la duración a largo plazo de la inmunidad inducida por una sola vacunación (hasta 15 meses). A los 9–12 meses post-vacunación, los títulos son 2–4 veces inferiores a los observados 2–3 semanas después de la vacunación. El efecto de la revacunación, en el caso de la infección natural o de la revacunación, depende del tiempo transcurrido desde la vacunación, es decir, es inferior 5–7 meses post-vacunación y superior en animales vacunados antes de ese momento.

Para determinar con exactitud la duración y la eficacia de la inmunidad, es aconsejable llevar a cabo la siguiente prueba: 20 conejos vacunados una vez se dividen en cuatro grupos y se les realizan pruebas serológicas a intervalos mensuales a lo largo de 1 año. Cada grupo se inocula con VEHC virulento a los 3, 6, 9 meses o 1 año post-vacunación. La infección de desafío debe producir una seroconversión creciente, directamente proporcional al tiempo transcurrido desde la vacunación. La ausencia de signos clínicos de enfermedad y de mortalidad respalda la eficacia de la vacuna.

2.3.3. Estabilidad

Deben aportarse pruebas para demostrar que la vacuna supera la prueba de potencia del lote 3 meses después de la fecha de caducidad.

Normalmente se requiere un conservante adecuado para la vacuna presentada en recipientes multidosis. Debe comprobarse su persistencia a lo largo de todo el periodo de validez.

3. Vacunas desarrolladas mediante biotecnología

Se han llevado a cabo varios estudios sobre la expresión de la proteína de la cápsida del VEHC en *Escherichia coli*, en el virus de la vaccinia, y en el virus *Myxoma* (VM) atenuado. Además, varios autores han observado que una proteína recombinante de la cápsida, VP60, expresada en el sistema de expresión del baculovirus/célula Sf9, auto ensamblada a VLP que son estructural y antigénicamente idénticas a viriones de la EHC. Aunque la proteína de fusión expresada en *E. coli* es muy insoluble y de baja inmunogenicidad, puede lograrse una inmunización activa con VLP en el sistema del baculovirus o utilizando virus de la vaccinia recombinante, VM y virus de la viruela del canario, administrado por vía intramuscular u oral. En concreto, conejos vacunados con VM recombinante expresando la proteína de la cápsida del VEHC quedaron protegidos contra exposiciones a VEHC y VM letales. Se ha desarrollado y registrado este tipo de vacuna recombinante, es decir, un Myxomavirus modificado que expresa la principal proteína del VEHC, y se comercializa en varios países para su administración por vía parenteral.

La proteína estructural VP60 también se ha expresado en plantas transgénicas, con un nuevo vector basado en el virus de la viruela del ciruelo (VVC) (PPV-NK), o en patateras transgénicas bajo el control de un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor o un promotor 35S modificado. En ambos casos, la inmunización de conejos con extractos de la planta *Nicotiana clevelandii* infectadas con la quimera PPV-NK de la VP60 y con extractos de hoja de patata portadora de este promotor 35S modificado, respectivamente, indujo una respuesta inmunitaria eficiente que protegió a los animales contra un desafío letal con el VEHC. No obstante, actualmente ninguna de estas vacunas está registrada y, por lo tanto, no se comercializan.

Se ha desarrollado en Francia y posteriormente se ha comercializado en algunos países europeos una vacuna que consiste en una combinación de una vacuna tradicional inactivada contra la EHC derivada de hígado y una vacuna viva atenuada contra el virus del *Myxoma*, y que se puede administrar por vía intradérmica.

BIBLIOGRAFÍA

BARBIERI I., LAVAZZA A., BROCCHI E., KONIG M. & CAPUCCI L. (1997). Morphological, structural and antigenic modifications of rabbit haemorrhagic disease virus in the course of the disease. Proceedings of the 1st Symposium on Calicivirus of the European Society of Veterinary Virology (ESVV), Reading, UK, 15–17 September 1996, 182–193.

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*). *Res. Vet. Sci.*, **97**, 642–645. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.10.008.

CAPUCCI L., FALLACARA F., GRAZIOLI S., LAVAZZA A., PACCIARINI M.L. & BROCCHI E. (1998). A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res.*, **58**, 115–126.

CAPUCCI L., FRIGOLI G., RONSHOLT L., LAVAZZA A., BROCCHI E. & ROSSI C. (1995). Antigenicity of the rabbit hemorrhagic disease virus studied by its reactivity with monoclonal antibodies. *Virus Res.*, **37**, 221–238.

CAPUCCI L., FUSI P., LAVAZZA A., PACCIARINI M.L. & ROSSI C. (1996b). Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J. Virol.*, **70**, 8614–8623.

CAPUCCI L., NARDIN A. & LAVAZZA A. (1997). Seroconversion in an industrial unit of rabbits infected with a non-pathogenic rabbit haemorrhagic disease-like virus. *Vet. Rec.*, **140**, 647–650.

CAPUCCI L., SCICLUNA M.T. & LAVAZZA A. (1991). Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and European brown hare syndrome. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **10**, 347–370.

COLLINS B.J., WHITE J.R., LENGUAS C., BOYD V. & WESTBURY H.A. (1995). A competition ELISA for the detection of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet. Microbiol.*, **43**, 85–96.

COLLINS B.J., WHITE J.R., LENGUAS C., MORRISSY C.J. & WESTBURY H.A. (1996) Presence of rabbit haemorrhagic disease virus antigen in rabbit tissues as revealed by a monoclonal antibody dependent capture ELISA. *J. Virol. Methods*, **58**, 145–154.

COOKE B.D., ROBINSON A.J., MERCHANT J.C., NARDIN A. & CAPUCCI L. (2000). Use of ELISAs in field studies of rabbit haemorrhagic disease (RHD) in Australia. *Epidemiol. Infect.*, **124**, 563–576.

DALTON K.P., NICIEZA I., BALSEIRO A., MUGUERZA M.A., ROSELL J.M., CASAIS R., ÁLVAREZ Á.L. & PARRA F. (2012). Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, **18**, 2009–2012. doi: 10.3201/EID1812.120341.

DUARTE M.D., CARVALHO C.L., BARROS S.C., HENRIQUES A.M., RAMOS F., FAGULHA T., LUÍS T., DUARTE E.L. & FEVEIREIRO M. (2015). A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *J. Virol. Methods*, **219**, 90–95.

FORRESTER N.L., TROUT R.C. & GOULD E.A. (2002). Benign circulation of rabbit haemorrhagic disease virus on Lambay Island, Eire. *Virology*, **358**, 18–22.

GALL A., HOFFMANN B., TEIFKE J.P., LANGE B. & SCHIRRMIEIER H. (2007). Persistence of viral RNA in rabbits which overcome an experimental RHDV infection detected by a highly sensitive multiplex real-time RT-PCR. *Vet. Microbiol.*, **120**, 17–32.

GOULD A.R., KATTENBELT J.A., LENGHAUS C., MORRISSY C., CHAMBERLAIN T., COLLINS B.J. & WESTBURY H.A. (1997). The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease virus (Czech strain V351): use of the polymerase chain reaction to detect replication in Australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation. *Virus Res.*, **47**, 7–17.

GRANZOW H., WEILAND F., STREBELOW H.-G., LU C.M. & SCHIRRMIEIER H. (1996). Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV): ultrastructure and biochemical studies of typical and core-like particles present in liver homogenates. *Virus Res.*, **41**, 163–172.

GUITTRE C., BAGINSKI I., LE GALL G., PRAVE M., TREPO O. & COVA L. (1995). Detection of rabbit haemorrhagic disease virus isolates and sequence comparison of the N-terminus of the capsid protein gene by the polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.*, **58**, 128–132.

LAVAZZA A., SCICLUNA M.T. & CAPUCCI L. (1996). Susceptibility of hares and rabbits to the European Brown Hare Syndrome Virus (EBHSV) and Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) under experimental conditions. *J. Vet. Med. [B]*, **43**, 401–410.

LE GALL-RECULE G., LAVAZZA A., MARCHANDEAU S., BERTAGNOLI S., ZWINGELSTEIN F., CAVADINI P., MARTINELLI N., LOMBARDI G., GUERIN J.L., LEMAITRE E., DECORS A., BOUCHER S., LE NORMAND B. & CAPUCCI L. (2013). Emergence of a new lagovirus related to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus. *Vet. Res.*, **44**, 81. DOI: 10.1186/1297-9716-44-81.

LE GALL-RECULE G., ZWINGELSTEIN F., PORTEJOIE Y. & LE GALL G. (2001). Immunocapture-RT-PCR assay for detection and molecular epidemiology studies of rabbit haemorrhagic disease and european brown hare syndrome viruses. *J. Virol. Methods*, **97**, 49–57.

LIU S.J., XUE H.P., PU B.Q. & QUIAN N.H. (1984). A new viral disease in rabbits. *Anim. Hus. Vet. Med.*, **16**, 253–255.

MARCHANDEAU S., LE GALL-RECULE G., BERTAGNOLI S., AUBINEAU J., BOTTI G. & LAVAZZA A. (2005). Serological evidence for a non-protective RHDV-like virus. *Vet. Res.*, **36**, 53–62.

NAGESHA H.S., MCCOLL K.A., COLLINS B.J., MORRISSY C.J., WANG L.F. & WESTBURY (2000). The presence of cross-reactive antibodies to RHDV in Australian wild rabbits prior to the escape of the virus from quarantine. *Arch. Virol.*, **145**, 749–757.

OHLINGER R.F., HAAS B., MEYERS G., WEILAND F. & THIEL H.J (1990). Identification and characterization of the virus causing rabbit haemorrhagic disease. *J. Virol.*, **64**, 3331–3336.

PUGGIONI G., CAVADINI P., MAESTRALE C., SCIVOLI R., BOTTI G., LIGIOS C., LE GALL-RECULE G., LAVAZZA A. & CAPUCCI L. (2013). The new French 2010 rabbit hemorrhagic disease virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Vet. Res.*, **44**, 96. doi: 10.1186/1297-9716-44-96.

ROBINSON A.J., KIRKLAND P.D., FORRESTER R.I., CAPUCCI L. & COOKE B.D. (2002). Serological evidence for the presence of a calicivirus in Australian wild rabbits, *Oryctolagus cuniculis*, before the introduction of RHDV: its potential influence on the specificity of a competitive ELISA for RHDV. *Wildl. Res.*, **29**, 655–662.

SCHIRMEIER H., REIMANN I., KOLLNER B. & GRANZOW H. (1999). Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants. *Arch. Virol.*, **144**, 719–735.

STOERCKLE-BERGER N., KELLER-BERGER B., ACKERMANN M. & EHRENSPERGER F. (1992). Immunohistological diagnosis of rabbit haemorrhagic disease (RHD). *J Vet. Med. [B]*, **39**, 237–245.

STRIVE T., WRIGHT J.D. & ROBINSON A.J. (2009). Identification and partial characterisation of a new Lagovirus in Australian wild rabbits. *Virology*, **384**, 97–105.

WHITE P.J., TROUT R.C., MOSS S.R., DESAI A., ARMESTO M., FORRESTER N.L., GOULD E.A. & HUDSON P.J. (2004). Epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the United Kingdom: evidence for seasonal transmission by both virulent and avirulent modes of infection. *Epidemiol. Infect.*, **132**, 555–567.

WIRBLICH C., MEYERS G., OHLINGER V.F., CAPUCCI L., ESKENS U., HAAS B. & H.-J. THIEL (1994). European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other caliciviruses. *J. Virol.*, **68**, 5164–5173.

*

* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la enfermedad hemorrágica del conejo (puede consultarse en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la enfermedad hemorrágica del conejo