

CAPÍTULO 3.7.2.

ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: La enfermedad hemorrágica del conejo (EHC) es una hepatitis aguda, fatal y muy contagiosa de los lepóridos, causada por un calicivirus (género Lagovirus). Hasta 2010, todos los virus de la EHC (VEHC) aislados pertenecían a uno de los seis genotipos identificados anteriormente (G1-G6), entre los cuales, el G6 es un subtipo antigénico (VEHCa). En 2010, emergió en Europa otro VEHC, filogenética y antigénicamente distinto del VEHC y se denominó VEHC2. Otro lagovirus, denominado virus del síndrome de la liebre común (VSLC) causa una enfermedad similar en las liebres (*Lepus europaeus*, *L. timidus* y *L. corsicanus*).

La EHC se caracteriza por una alta morbilidad y una mortalidad de hasta un 90%. La infección puede producirse por vía oral. La transmisión sigue al contacto con conejos infectados o se produce por contacto indirecto con vectores mecánicos (como insectos, aves o humanos) o utensilios y equipo contaminados. 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, indiferencia 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 7 a 15 días de edad en adelante.

Detección e 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 enzimoimmunoanálisis (ELISA) en sándwich basado en el uso de anticuerpos monoclonales (MAbs). Deben escogerse y utilizarse cebadores y MAbs específicos para distinguir entre los distintos lagovirus. 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 y homólogos contra el VEHC confieren protección frente a la enfermedad. Los mejores métodos serológicos para la detección de la EHC son ELISA de competición con MAbs específicos. 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, la exposición de epítomos internos compartidos por distintos lagovirus disminuye la especificidad de esta prueba.

Requisitos para las vacunas: Se logra fácilmente un control indirecto de la enfermedad mediante la vacunación. Aunque las proteínas de la cápsida de los VEHC se han expresado como VLP recombinantes y se comercializan, la mayoría de las vacunas que se utilizan todavía se preparan a partir de hígados de conejos infectados, y se inactivan y adyuvantan. Los animales vacunados producen una sólida inmunidad protectora frente a la infección por el VEHC y datos experimentales

indican que la protección dura mucho (más de 1 año). Dado que VEHC1 y VEHC2 tienen perfiles antigénicos distintos, es muy aconsejable una vacunación combinada con ambos serotipos, o el uso de una vacuna homóloga para las cepas de VEHC y VEHC2 identificadas durante la epidemia o el brote.

A. INTRODUCCIÓN

La enfermedad hemorrágica del conejo (EHC) es una hepatitis fatal y muy contagiosa de los lepóridos. 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. 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 (Capucci *et al.*, 1991; Green *et al.*, 2000; Wirblich *et al.*, 1994).

Se ha propuesto una nueva clasificación del género *Lagovirus* basada en las secuencias codificantes de VP60 (Le Pendu *et al.*, 2017). En la propuesta, aún no aprobada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), todos los lagovirus están agrupados en una especie de virus única (*Lagovirus europaeus*). Esto podría dividirse en dos genogrupos (GI y GII) que se pueden subdividir en seis genotipos (GI.1, GI.2, GI.3, GI.4, GII.1 y GII.2), y además en variantes (cuatro para GI.1 y tres para GII.1). De acuerdo con la nueva clasificación del genoma, los genomas del "VEHC clásico", incluidos los genogrupos G1-G5 anteriores, se notificaron por primera vez en China (Rep. Pop. de) en 1984 (Liu *et al.*, 1984), y el subtipo VEHCa que anteriormente correspondía al genogrupo G6, identificado en Europa en 1996 (Capucci *et al.*, 1998), ahora se clasifica como GI.1 (a – d). El nuevo virus relacionado con el VEHC llamado VEHC2 (o VEHCb), que surgió en Francia en 2010 (Le Gall-Recule *et al.*, 2013), ahora se clasifica como GI.2. El genoma del VSLPE se clasifica como GII.1. Sin embargo, como la taxonomía oficial del ICTV para la familia Caliciviridae sigue siendo la descrita por Green *et al.* (2000), en este capítulo se utiliza la clasificación actual de *Lagovirus*.

El conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) es la única especie hospedadora susceptible al VEHC y VEHCa. Otras especies de lagomorfos, incluidos los conejos de rabo blanco (*Sylvilagus spp.*), la liebre de cola negra (*Lepus californicus*) y los conejos de los volcanes (*Romerolagus diazzi*) no son susceptibles. El espectro de hospedadores de VEHC2 es más amplio, ya que también puede causar enfermedades en la liebre del Cabo (*L. capensis var mediterraneus*), la liebre italiana (*L. corsicanus*), la liebre parda (*L. europaeus*) y la liebre de montaña (*L. timidus*) y varias especies de liebre *Lepus* y de *Sylvilagus* de América del Norte, aunque con diferente grado de susceptibilidad.

El VSLPE suele causar enfermedad en *Lepus europaeus*, *L. timidus* y *L. corsicanus*, y ocasionalmente en conejillos de indias (*Sylvilagus floridanus*), pero aparentemente no en *L. granatensis*, *L. castroviejoi* y *L. capensis*.

El VEHC nunca se ha descrito en humanos. Existe un único informe en ciervo almizclero alpino (*Moschus sifanicus*) en China (Rep. Pop. De) (La inoculación de una suspensión de tejido de VEHC positiva en 28 especies de vertebrados diferentes distintas de los conejos no produjo la enfermedad y no se detectó replicación del virus mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (Gould *et al.*, 1997). Por el contrario, se observaron lesiones típicas y muerte al exponer a conejos de laboratorio a extractos positivos de VEHC2 de dos pequeños roedores, *Microtus duodecimcostatus* y *Crocidura russula*, que resultaron positivos para VEHC2 por RT-PCR. También se ha descrito infección por el VEHC2 en tejones (*Meles meles*), en Portugal.

La aparición de VEHC2 ha modificado drásticamente la situación epidemiológica mundial de la EHC, principalmente porque es un serotipo distinto del VEHC y puede causar enfermedad en conejos jóvenes y liebres. Hoy en día, el VEHC2 está asociado a casi todos los casos de EHC detectados en todo el mundo. Desde 2010, el VEHC2 se ha propagado rápidamente al norte de África y al norte de Europa y se ha descrito en África occidental. También se volvió endémico en Australia, donde está reemplazando al VEHC. Además, se han notificado repetidamente varios brotes de EHC causados por VEHC2 en conejos europeos y especies silvestres de *Lepus* y *Sylvilagus* en América del Norte y Centroamérica.

La EHC se caracteriza por una alta morbilidad, pero con una tasa de mortalidad variable según el tipo de virus y la edad del conejo. En la infección por VEHC/VEHCa, la mortalidad es de alrededor del 80 a 90%, y un 5 a 10% de los conejos presenta un curso clínico subagudo o crónico. Aunque pueden infectarse conejos de todas las edades, la infección es subclínica en animales menores de 6 a 8 semanas de edad. La enfermedad causada por VEHC2 podría durar un poco más y la tasa de mortalidad es muy variable (50-80%) dependiendo de la cepa; las cepas detectadas

más recientemente (de 2014 a 2015) han demostrado ser progresivamente más virulentas que las identificadas inicialmente en 2010-2011 (Capucci *et al.*, 2017). Pueden morir incluso conejos no destetados, a partir de los 10 a los 15 días de edad.

El período de incubación de la EHC varía de 1 y 6 días. En los casos agudos, los animales infectados desarrollan fiebre alta (> 40°C) y mueren repentinamente dentro de las 12 a 36 horas posteriores a su aparición. Los únicos signos clínicos pueden ser chillidos terminales seguidos rápidamente de colapso y muerte. La EHC crónica subclínica se caracteriza por ictericia generalizada, pérdida de peso y letargo. La muerte puede ocurrir en 1 a 2 semanas, pero algunos conejos sobreviven después de la seroconversión. Aparece una respuesta de IgM específica y relevante en un plazo de 3 días, seguida inmediatamente por una respuesta de IgA e IgG 2 a 3 días después. El ARN vírico se detecta mediante PCR en sangre y heces de conejos convalecientes hasta 15 semanas después de la infección, así como en conejos infectados por VEHC, pero ya protegidos por anticuerpos específicos adquiridos previamente (es decir, vacunados o supervivientes de la infección) (Gall *et al.*, 2007). Aún no se ha establecido si esto es consecuencia de un aclaramiento vírico lento o indicativo de una replicación (persistencia) real y prolongada del virus.

Tras la realización de pruebas serológicas de la EHC, se han aislado y caracterizado parcialmente en Europa varios lagovirus no patógenos relacionados con la el VEHC (calicivirus del conejo – CVC) (Capucci *et al.*, 1996; Le Gall-Recule *et al.*, 2015; Marchandeu *et al.*, 2005), y también en Oceanía (Strive *et al.*, 2009). Los lagovirus no patógenos inducen una respuesta serológica que puede interferir y complicar el diagnóstico serológico de la EHC (Capucci *et al.*, 1991; Cooke *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2002). Recientemente, se han detectado lagovirus no patógenos en liebres de Europa y de Australia (Cavadini *et al.*, 2016; Droillard *et al.*, 2018; Mahar *et al.*, 2019).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

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

Método	Finalidad					
	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
Detección e identificación del agente^(a)						
ELISA	+	–	++	+++	+	–
EM	–	–	–	++	–	–
HA	–	–	–	+	–	–
RT-PCR en tiempo real	+	–	++	+++	+	–
Detección de la respuesta inmunitaria						
C-ELISA	+++	+++	+++	+	+++	+++
IsoELISA	++	+++	++	++	++	++
HI	++	++	++	–	++	++

Clave: +++ = método recomendado para esta finalidad; ++ = método recomendado, pero tiene limitaciones;

+ = adecuado en muy pocas circunstancias; – = no adecuado para esta finalidad.

ELISA = enzimoimmunoanálisis; EM = microscopía electrónica; HA = prueba de hemaglutinación;

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

C-ELISA = enzimoimmunoanálisis de competición; isoELISA = ELISA de isotipo;

HI = prueba de inhibición de la hemaglutinación. ^(a)Se recomienda aplicar varios métodos de identificación del agente a una misma muestra clínica.

1. Detección del agente

El hígado de los conejos afectados por la EHC contiene el título vírico más alto (desde 10^3 DL₅₀ [dosis letal 50%] a $10^{6.5}$ DL₅₀/ml de homogenado al 10% y de 10^7 a 10^{10} copias del genoma por mg de tejido) 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 ser adecuados como material de diagnóstico alternativo.

En el caso de 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 (Capucci *et al.*, 1991). 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 epítomos 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 clarifica por centrifugación a 5 000 *g* durante 10–15 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 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 entre muestras.

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. Un 10% de los homogenados de hígado de conejos afectados por EHC dieron positivo en diluciones de entre 1/100 y 1/1000 con estos ELISA. Por lo tanto, a pesar de la escasa sensibilidad del ELISA en comparación con las PCR, ELISA es el mejor método para el diagnóstico de la EHC aguda. 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 μ l/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 y variantes relacionadas 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 han descrito ELISA de captura de antígeno similares para la detección de VEHC (Collins *et al.*, 1996) o VEHC2 (Dalton *et al.*, 2018).

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 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 estos agentes, 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 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; Yang *et al.*, 2008). 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 OMSA 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. Únicamente para la amplificación de RHDV2, se deberán utilizar cebadores específicos, es decir "14U1" (5'-GAA-TGT-GCT-TGA-GTT-YTG-GTA-3') y "RVP60-L1" (5'-CAA-GTC-CCA-GTC-CRA-TRA-A-3'), que amplifican a 794 pb la secuencia localizadas en el terminal C del gen que codifica VP60 de RHDV2 (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013) o "Fra109-F" (5'-ACT-ACT-AGC-GTG-GTC-ACC-ACC-3') y "Fra567-R" (5'-TTG-TTA-TAA-ACG-CTC-AGG-ACC-AAC-3'), que amplifican una secuencia de 481 pb localizada en la primera parte del gen VP60 (Velarde *et al.*, 2017). El ARN vírico se puede amplificar directamente con una RT-PCR de un solo paso o retrotranscribirse primero a ADNc y después amplificarse mediante PCR. Para visualizar el producto de la PCR, el ADN amplificado se somete a electroforesis en gel de agarosa. Si es necesario, la especificidad de la PCR se puede determinar mediante secuenciación.

Para identificar el CVC (calicivirus del conejo) (Capucci *et al.*, 1998) o HaCV (Cavadini *et al.*, 2016; Droillard *et al.*, 2018; Mahar *et al.*, 2019) no patógenos se ha utilizado un método de RT-PCR similar en el que se emplean cebadores universales para los lagovirus (Strive *et al.*, 2009). 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 han aplicado a la detección y caracterización de cepas del virus del síndrome de la liebre parda europea (VSLPE) RT-PCR para la detección del mismo, empleando distintos pares de cebadores (Le Gall-Reculé *et al.*, 2001; Velarde *et al.*, 2017).

Se ha desarrollado una RT-PCR múltiple en tiempo real con control interno en la que se utilizan sondas fluorógenas y estándares externos para la cuantificación absoluta de ARN, a modo de herramienta diagnóstica para la detección del VEHC (Gall *et al.*, 2007). 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 han creado RT-PCR en tiempo real específicas para la detección del VEHC2. En la descrita por Duarte *et al.*, (2015), los nucleótidos utilizados fueron los siguientes: [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']. También se han publicado y utilizado otros protocolos de RT-PCR en tiempo real.

1.3. Microscopía electrónica

La microscopía electrónica (EM) debe realizarse preferiblemente después de la ultracentrifugación (al menos a 100 000 *g* durante 30 minutos) de la muestra (una suspensión de órganos preparada como se describe en la Sección B.1) para concentrar las partículas víricas. El sedimento obtenido se resuspende en PBS o agua destilada, se coloca en una rejilla durante unos minutos y luego se tiñe negativamente con fosfotungstato de sodio (NaPT) al 2%, pH 6,8, durante 1,5 minutos. Los viriones del virus de la EHC son visibles como partículas sin recubrimiento, de 32 a 35 nm de diámetro, que presentan una capa interna (de 25 a 27 nm de diámetro), delimitada por un borde del que irradian diez proyecciones periféricas cortas distribuidas de manera uniforme. Las partículas lisas (s-RHDV) se identifican por la pérdida completa de las porciones externas, volviéndose perfectamente hexagonales y más pequeñas, siendo solo visible el borde de la cápsida (Capucci *et al.*, 1991).

Se ha descrito una técnica de inmuno-ME (IEM) que emplea los mismos principios serológicos que el ELISA y que resulta útil en el diagnóstico y caracterización de varios virus, incluido el VEHC. La IEM, que funciona bien con antisueros o MAb, puede ser más específica que la EM de tinción negativa tradicional mediante al combinar identificación morfológica y especificidad de antígeno (Lavazza *et al.*, 2015).

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 MAb 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 incluso inexistente cuando se utilizan eritrocitos de otras especies. Los eritrocitos lavados se suspenden en PBS al 0,75%. Se incuba 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 fiebres 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 debe sustituirse por otros métodos virológicos, como el ELISA de detección de antígeno o la PCR.

1.5. Inmunotinción

Puede teñirse mediante inmunotinción tejido fijado en formalina tamponada al 10% y fijarse en parafina utilizando métodos estándar en los que se empleen MAb específicos (Neimanis *et al.*, 2018).

Son características y específicas una tinción intensa del núcleo y una tinción difusa del citoplasma de hepatocitos necróticos en el 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, en las células mesangiales renales y en la médula ósea, que pueden presentar un marcado descenso en la producción de células mieloides respecto a las eritroides y un aumento en la producción de células mieloides inmaduras (Stoerckle-Berger *et al.*, 1992) (disminución de la proporción mieloides/eritroides) (Neimanis *et al.*, 2018).

Los cortes de tejido congelados fijados en metanol o acetona puede inmunotefñirse 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. Inmunoelectrotransferencia

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 inmunoelectrotransferencia puede utilizarse para determinar el diagnóstico final, mientras que los métodos modernos de detección de genoma (RT-PCR en tiempo real) son especialmente útiles para la confirmación.

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 RHDV-VP60 desnaturalizada 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.*, 1995).

Para identificar el VSLPE también puede utilizarse un análisis por inmunoelectrotransferencia. 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. Se registra un aumento de la temperatura corporal entre 18 y 24 horas después de la infección (p.i.), seguido de la muerte en más de un 80% de los animales inoculados, en función del tipo y virulencia de la cepa. Unos pocos animales pueden sobrevivir hasta 6-8 días tras la infección. 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 de forma indirecta infección por el VEHC en animales que hayan sobrevivido a la infección, 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 (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. Además de la RT-PCR, una concentración alta de IgM específica del VEHC y una concentración baja, si la hay, de IgG, son marcadores inequívocos de positividad para 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 µm 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) Los conejos mayores de 10 semanas se vacunan con una vacuna homóloga al suero policlonal que se desea producir (VEHC o VEHC2). Para obtener sueros que contienen un alto nivel de IgG anti-VEHC, se exponen por vía oral 8 días después con 2 ml de un homogeneizado de hígado al 10% positivo para VEHC o VEHC2 diluido 1/20 en PBS. Los conejos deben ser sangrados 35-45 días después de la exposición para obtener los sueros convalescientes (título en C-ELISA de alrededor de 1/10240). Como alternativa, los conejos convalescientes pueden reinfectarse después de 3 a 4 meses y sangrarse 10 a 15 días después para obtener sueros hiperinmunes contra el VEHC. En el caso de VEHC2, para obtener sueros inmunes con títulos elevados, es aconsejable utilizar cepas identificadas a partir de 2015 (es decir, cepas de alta virulencia).
- ii) El antígeno (VEHC o VEHC2) se purifica a partir de hígados de conejos infectados de forma natural o experimental que hayan muerto por una forma aguda de la enfermedad (entre 28 y 40 horas después de la infección), utilizando uno de los métodos publicados (Capucci *et al.*, 1991; 1995;

Ohlinger *et al.*, 1990). Luego, el antígeno de VEHC purificado se puede usar para inmunizar ovejas, cabras o pollos de acuerdo con los protocolos clásicos usando adyuvantes oleosos. El mismo procedimiento también se puede utilizar para inocular conejos, pero, por supuesto, el virus purificado debe inactivarse antes de la inoculación.

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 1/4. 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 calculada, 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.

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.

Los criterios anteriores utilizados para transformar los datos de ELISA sin procesar en resultados serológicos finales son los mismos para los C-ELISA de VEHC y VEHC2. Sin embargo, para una interpretación práctica de los resultados obtenidos, se deben tener en cuenta algunas consideraciones. La principal es que VEHC y VEHC 2, aunque representan dos serotipos distintos, comparten determinantes antigénicos secundarios. Estos determinantes inducen un subconjunto menor de anticuerpos de reacción cruzada que, aunque tienen poca importancia en la protección frente a la EHC, "interfieren" en las reacciones de ELISA. Esto significa que los conejos vacunados (o infectados) por VEHC tendrán títulos medios o altos en el C-ELISA homólogo, pero serán positivos hasta cierto punto en el C-ELISA heterólogo (C-ELISA para VEHC2). Lo contrario también es cierto cuando los conejos se vacunan o se infectan por VEHC2 y se analizan con un ELISA para VEHC. Sin embargo, para determinar qué vacuna se utilizó (o qué virus infectó a los conejos), puede ser posible utilizar el valor obtenido por el cociente del título de C-ELISA para VEHC2 dividido por el título de C-ELISA para el VEHC (valor RT2) (Velarde *et al.*, 2017). Este valor suele oscilar entre 4 y 64 en conejos vacunados o infectados por VEHC2 y entre 0,25 y 0,0156 en conejos vacunados o infectados por VEHC. Para un valor de RT2 de 2 a 0,5, no es posible asignar el origen de los anticuerpos detectados a uno u otro virus. Esto podría ocurrir cuando ambos títulos son bajos (<1/80) o cuando los conejos se vacunan con una vacuna bivalente (VEHC más VEHC2) o dos vacunas asociadas (VEHC y VEHC2).

Debido a las importantes diferencias antigénicas existentes entre el VEHC y el VSLPE, 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. Enzoinmunoanálisis 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, normalmente 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 la placa a una concentración de 2 µg/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 H₂SO₄, 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 OD₄₉₂ (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 MABs específicos del VEHC2.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

En los países donde la EHC es endémica, se realizan controles indirectos de la enfermedad en conejos tanto de producción como mascotas mediante vacunación. La mayor parte de las vacunas que se comercializan contienen virus infecciosos inactivados. Debido a la falta de sistemas de cultivo celular que permitan propagar de forma eficiente el virus, estas vacunas se preparan 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 u otras emulsiones), 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, se debe utilizar vacunación combinada con ambos tipos antigénicos y/o vacunas homólogas al tipo de VEHC que se haya identificado durante la epidemia o el brote en cuestión. Considerando la actual variabilidad de las cepas de VEHC2, es muy recomendable el uso de vacunas basadas en cepas que presenten una homología alta con las que circulan en un área/región/país.

La mayoría de los fabricantes de vacunas recomienda una única vacunación básica con revacunación anual. Normalmente, se inocula por vía subcutánea una dosis de 1 ml en la zona del cuello, o bien por vía intramuscular. 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 conejos no es necesaria si se aplican unas buenas medidas de bioseguridad en la explotación 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 desecho 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 (>3) es aconsejable dejar de vacunar. Para verificar la persistencia de la EHC infecciosa 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 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 del inóculo primario

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 podría surgir más variabilidad debido a que en infecciones experimentales se registra una menor mortalidad, en función de la virulencia de la cepa utilizada.

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 mediante alguno de los siguientes métodos: un examen por ME con tinción negativa, determinación de la reactividad en ELISA con distintos MAbs específicos y actividad HA a temperatura ambiente (título de HA contra eritrocitos humanos del grupo O superior a 1/1280).

La ausencia de bacterias y hongos viables debe determinarse utilizando métodos bacteriológicos de laboratorio comunes. Pueden utilizarse PCR para la detección de micoplasmas y de virus extraños que afecten a los conejos (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 de hasta un 80% en el caso del VEHC2 en función de la virulencia de la cepa, 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 10⁵ DL₅₀. Debe conservarse congelado (-70°C), mejor añadiendo un volumen de glicerol a razón de 1:1 o bien liofilizándolo.

2.1.3. Validación como cepa vacunal

Debido a la falta de protección cruzada efectiva cuando se usan vacunas heterólogas (es decir, VEHC/VEHCa en lugar de VEHC2), para la preparación de la vacuna se recomienda usar aquellas cepas que sean altamente homólogas respecto al serotipo dominante de VEHC que causa brotes en el área en cuestión.

También es importante tener controles de vacuna actuales y homólogos debido a la inmunidad inducida con respecto al patrón antigénico expresado de las cepas de campo.

2.1.4. Procedimiento para la aceptación provisional de un nuevo inóculo vírico primario

Los datos epidemiológicos actuales muestran claramente que el VEHC2 casi ha reemplazado a los VEHC clásicos y, por lo tanto, existe una demanda creciente de vacunas contra el VEHC2. Como el VEHC 2 es un virus emergente 'nuevo' y no solo una variante genética de VEHC/ VEHCa, ha experimentado una evolución significativa desde 2010, lo que ha dado lugar a cambios en la virulencia y en el perfil antigénico (Capucci et al., 2017). En consecuencia, se recomienda elegir como inóculo primario para la producción de vacuna una de las cepas aisladas a partir de 2015, y basar la selección en su perfil antigénico.

No obstante, debe recordarse que, si bien las poblaciones de conejos domésticos y silvestres están ganando rápidamente una alta inmunidad colectiva contra el VEHC 2, simultáneamente están perdiendo toda protección contra las cepas clásicas de VEHC/VEHCa que no han desaparecido por completo. Este hecho debe tenerse en cuenta en el diseño de los sistemas de vigilancia de la EHC para que los países puedan estar preparados para reaccionar rápidamente ante las epizootias actualizando la composición de la vacuna.

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 ingredientes

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 DL₅₀.

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 identidad de la EHC también podría confirmarse mediante ME de tinción negativa o con una RT-PCR en tiempo real.

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 en lotes de producto final

No se requieren pruebas de inocuidad por lotes para la liberación del producto, excepto en el caso de las vacunas autógenas. Deben llevarse a cabo pruebas de esterilidad 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

Cuando se precisen pruebas de inocuidad, debe aplicarse el siguiente procedimiento:

- 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 cinco conejos con una dosis completa de vacuna administrada por la vía recomendada. Se vacunan dos grupos más de cinco animales cada uno con 1/4 y 1/6 de la dosis, respectivamente. Un cuarto grupo de 5 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 60% de los conejos control muere con signos característicos de la EHC; o c) tras la exposición al VEHC2, menos de un 20% de los conejos control muere y menos del 60% de ellos presenta títulos altos de anticuerpos (>1/1280 empleando el C-ELISA homólogo). La vacuna supera la prueba si: a) no menos del 80% 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 aprobación del registro

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. Proceso de fabricación

Para la aprobación de la vacuna, deben presentarse a las autoridades todos los detalles relevantes relacionados con la fabricación de la vacuna y las pruebas de control de calidad (véase la Sección C.2.1 *Características del inóculo* y la Sección C.2.2 *Método de fabricación*). Esta información se proporcionará a partir de tres lotes de vacuna consecutivos con un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual del lote industrial.

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 (a excepción de algunas especies de liebre susceptibles al VEHC2), 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.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas

No es aplicable.

iii) Precauciones

La vacuna no debe contener ningún ingrediente que pueda representar un riesgo para los consumidores de conejos vacunados. Sin embargo, como la vacuna inactivada contiene un adyuvante de aceite mineral, existe un riesgo asociado que podría surgir de una autoinyección accidental. La inyección accidental puede causar hinchazón intensa y consecuencias graves si no se acude a un médico experto de inmediato.

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 20 conejos (10 vacunados y 10 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 50-80% 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 IgA 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 ausencia de anticuerpos anti-VEHC. 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 los títulos obtenidos con los C-ELISA y el estado de protección frente a la enfermedad inducida por cada cepa (véase el apartado B.2.2), teniendo en cuenta el valor hallado de RT₂, es decir, los conejos con títulos 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. 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).

2.3.4 Duración de la inmunidad

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.

2.3.5. 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 ingeniería genética

Se han desarrollado y se siguen desarrollando métodos de producción de vacunas basados en la ingeniería genética. El objetivo será superar los problemas de bienestar que plantea la producción de vacunas convencionales, evitar los riesgos de bioseguridad y proporcionar una protección de amplio espectro contra múltiples cepas del virus.

Se han llevado a cabo varios estudios sobre la expresión de la proteína de la cápsida del VEHC/VEHCz/VEHC2 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 Myxoma virus modificado que expresa la principal proteína de la cápsida del VEHC y del VEHC2, 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.

Recientemente se han desarrollado y registrado dos nuevas vacunas biotecnológicas, una bivalente y otra trivalente, que se comercializan en varios países para su administración por vía parenteral. En la primera, el gen VP60 del VEHC o del VEHC2 se ha insertado en el genoma de una cepa vacunal del virus de la mixomatosis que, al inocularse en el conejo, se replica produciendo también el VP60 del VEHC. La segunda vacuna se basa en el mismo principio y contiene dos cepas diferentes del virus de la mixomatosis, cada una de las cuales produce la VP60 del VEHC y del VEHC2, respectivamente (Reemers et al., 2020). Estas vacunas necesitan aproximadamente 3 semanas para inducir anticuerpos detectables.

Además, otra vacuna bivalente contra el VEHC y el VEHC2, en la que la cápside vírica se expresa en forma de partículas similares a virus a partir de un baculovirus que crece en las pupas de *Lepidoptera* (Dalton et al., 2021), ha sido aprobada por la Agencia Europea del Medicamento y pronto debería comercializarse. Estas vacunas de tipo recombinante no necesitan la etapa de inactivación, y sólo la basada en el sistema de baculovirus utiliza hidróxido de aluminio como adyuvante. Al igual que las vacunas de órganos inactivados, esta vacuna induce una respuesta inmunitaria rápida y los anticuerpos son detectables entre 7 y 10 días después de la vacunación.

BIBLIOGRAFÍA

CAPUCCI L., CAVADINI P., SCHIAVITTO M., LOMBARDI G. & LAVAZZA A. (2017). Increased pathogenicity in rabbit haemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2). *Vet. Rec.*, **180**, 246. doi: 10.1136/vr.104132

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. (1996). Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J. Virol.*, **70**, 8614–8623.

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.

CAVADINI P., MOLINARI S., PEZZONI G., CHIARI M., BROCCHI E., LAVAZZA A. & CAPUCCI L. (2016). Identification of a New Non-Pathogenic Lagovirus in Brown Hares (*Lepus europeus*). In: Proceedings of the 5th World Lagomorph Conference, California State University, California, USA, 13 July 2016.

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., ALVARADO C., REYTOR E., DEL CARMEN NUÑEZ M., PODADERA A., MARTÍNEZ-ALONSO D., ALONSO J.M.M., NICIEZA I., GÓMEZ-SEBASTIÁN S., DALTON R.M., PARRA F. & ESCRIBANO J.M. (2021). Chimeric VLPs Bearing VP60 from Two Serotypes of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus are Protective against Both Viruses. *Vaccines*, **9**, 1005. <https://doi.org/10.3390/vaccines9091005>
- DALTON K.P., PODADERA A., GRANDA V., NICIEZA I., DEL LLANO D., GONZALEZ R., DE LOS TOYOS J.R., GARCÍA OCAÑA M., VÁZQUEZ F., MARTÍN ALONSO J.M., PRIETO J.M., PARRA F. & CASAS R. (2018). ELISA for detection of variant rabbit haemorrhagic disease virus RHDV2 antigen in liver extracts. *J. Virol. Methods*, **251**, 38–42.
- DROILLARD C., LEMAITRE E., CHATEL M., GUITTON J-S., MARCHANDEAU S., ETERRADOSSI N. & LE GALL-RECOLE G. (2018). First Complete Genome Sequence of a Hare Calicivirus Strain Isolated from *Lepus Europaeus*. *Microbiol. Resour. Announc.*, **7**, e01224–18.
- DUARTE M.D., CARVALHO C.L., BARROS S.C., HENRIQUES A.M., RAMOS F., FAGULHA T., LUÍS T., DUARTE E.L. & FEVEREIRO M. (2015). A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *J. Virol. Methods*, **219**, 90–95.
- 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. doi: 10.1016/s0168-1702(96)01399-8.
- GREEN K.Y., ANDO T., BALAYAN M.S., BERKE T., CLARKE I.N., ESTES M.K., MATSON D.O., NAKATA S., NEILL J.D., STUDDERT M.J. & THIEL H-J. (2000). Taxonomy of the Caliciviruses. *J. Infect. Dis.*, **181**, (S2), S322–S330, <https://doi.org/10.1086/315591>
- 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., TITTARELLI C. & CERIOLO M. (2015). The use of convalescent sera in immune-electron microscopy to detect non-suspected/new viral agents. *Viruses*, **7**, 2683–2703. doi: 10.3390/v7052683.
- LE GALL-RECOLE G., LAVAZZA A., MARCHANDEAU S., BERTAGNOLI S., ZWINGELSTEIN F., CAVADINI P., MARTINELLI N., LOMBARDI G., GUÉRIN 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-RECOLE 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.
- LE GALL-RECOLE G., LEMAITRE E., BRIAND F-X & MARCHANDEAU S. (2015). Characterization in France of non-pathogenic lagoviruses closely related to the Australian Rabbit calicivirus RCV-A1: confirmation of the European origin of RCV-A1 In. *Xth International Congress for Veterinary Virology “Changing Viruses in a Changing World”*. France: Montpellier; 2015. pp. 183–185
- LE PENDU J., ABRANTES J., BERTAGNOLI S., GUITTON J.S., LE GALL-RECOLE G., LOPES A.M., MARCHANDEAU S., ALDA F., ALMEIDA T., ALVES P.C., BARCENA J., BURMAKINA G., BLANCO E., CALVETE C., CAVADINI P., COOKE B., DALTON K. P., DELIBES MATEOS M., DEPTULA W., EDEN J-S., FANG W., FERREIRA C.C., FERREIRA P., FORONDA P., GONÇALVES D., GAVIER-WIDÉN D., HALL R., HUKOWSKA-SZEMATOWICZ B., KERR P., KOVALISKI J., LAVAZZA A., MAHAR J., MALOGOLOVKIN A., MARQUES R., MARQUES S., MARTIN-ALONSO A., MONTERROSO P., MORENO S., MUTZE G., NEIMANIS A., NIEDZWIEDZKA-RYSTWEJ P., PEACOCK D., PARRA F., ROCCHI M., ROUCO C., RUVOËN-CLOUET N., SILVA E., SILVÉRIO D., STRIVE T., THOMPSON G., TOKARZ-DEPTULA B. & ESTEVES PEDRO J. (2017). Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *J. Gen. Virol.*, **98**, 1658–1666. doi: 10.1099/jgv.0.000840.

- LIU S.J., XUE H.P., PU B.Q. & QIAN N.H. (1984). A new viral disease in rabbits. *Anim. Hus. Vet. Med.*, **16**, 253–255.
- MAHAR J.E., HALL R.N., SHI M. MOURANT R., HUANG N., STRIVE T. & HOLMES E.C. (2019). The discovery of three new hare lagoviruses reveals unexplored viral diversity in this genus. *Virus Evolution*, **5**, vez005, <https://doi.org/10.1093/ve/vez005>.
- 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.
- NEIMANIS A., LARSSON PETTERSSON U., HUANG N., GAVIER-WIDÉN D. & STRIVE T. (2018). Elucidation of the pathology and tissue distribution of *Lagovirus europaeus* Gl.2/RHDV2 (rabbit haemorrhagic disease virus 2) in young and adult rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Res.*, **49**, 46. doi: 10.1186/s13567-018-0540-z.
- 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.
- REEMERS S., PEETERS L., VAN SCHIJNDEL J., BRUTON B, SUTTON D., VAN DER WAART L. & VAN DE ZANDE S. (2020). Novel Trivalent Vectored Vaccine for Control of Myxomatosis and Disease Caused by Classical and a New Genotype of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus. *Vaccines*, **8**, 441. doi: 10.3390/vaccines8030441.
- 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.
- 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.
- VELARDE R., CAVADINI P., NEIMANIS A., CABEZÓN O., CHIARI M., GAFFURI A., LAVÍN S., GRILLI G., GAVIER-WIDÉN D., LAVAZZA A. & CAPUCCI L. (2017). Spillover events of infection of brown hares (*Lepus europaeus*) with rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) caused sporadic cases of an European Brown hare syndrome like-disease in Italy and Spain. *Transbound. Emerg. Dis.*, **64**, 1750–1761. doi:10.1111/tbed.12562
- 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.
- YANG L., WANG F., HU B., XUE J., HU Y., ZHOU B., WANG D. & XU W. (2008). Development of an RT-PCR for rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and the epidemiology of RHDV in three eastern provinces of China. *J. Virol. Methods*, **151**, 24–29. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.04.003.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OMSA para la enfermedad hemorrágica del conejo (puede consultarse la página web de la OMSA: <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)
Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OMSA para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la enfermedad hemorrágica del conejo

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2023.