

PATOLOGÍA

DIAGNÓSTICO de MIXOMATOSIS en el PERIODO PRESINTOMÁTICO mediante PCR

A. I. Pagès-Manté*, E. Martínez, M. Roca y J. Maldonado

*Hipra, S.A., Avda de la Selva 135, 17170 Amer, Girona.
apm@hipra.com

La mixomatosis es una enfermedad infecciosa muy frecuente en el área mediterránea tanto en conejos silvestres como en conejos industriales. El agente etiológico es un poxvirus de la familia *Leporipoxvirus* con consecuencias fatales para el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*). La mixomatosis fue introducida ilegalmente en Francia en 1952 y de allí paso a otros países europeos que la utilizaron igualmente como arma biológica frente a la plaga de conejos silvestres.

Existen diferentes grados de patogenicidad en las cepas aisladas con una tendencia clara a la prevalencia de cepas menos agresivas. Lamentablemente en conejos industriales debido a su alto nivel de estrés y a las deficiencias estructurales de la mayoría de explotaciones, sigue siendo fatal tanto en su forma clásica como en su forma pulmonar o amixomatosa.

La transmisión de la mixomatosis se produce principalmente por artrópodos —pulgas, mosquitos, etc— pero en fases agudas hay que tener en cuenta también el contagio directo. Los aspectos clínicos de la enfermedad son muy notorios en la piel del animal, sobre todo alrededor de los orificios naturales tales como conjuntivas, labios, nariz, orejas y ano. Desde el punto de entrada, el virus progresa al ganglio linfático regional y tras un proceso de viremia se disemina por todo el organismo produciendo infinidad de mixomas secundarios característicos que son los que fácilmente

nos hacen evidenciar los signos clínicos de la mixomatosis.

Dentro de la epidemiología de la mixomatosis, el periodo más crítico es el asintomático en el cual el animal portador no presenta síntomas clínicos, pero influye enormemente en la evolución de la enfermedad al resto de la explotación según el manejo realizado. Como es obvio el animal sintomático se retira de la explotación y se maneja con mayor bioseguridad sin embargo el animal asintomático puede permanecer en la granja perpetuando la mixomatosis.

Debido a este hecho se estudió intentar detectar antígeno de mixomatosis antes del periodo clínico sintomático apoyados por técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) tan pronto sea posible para evitar posibles contagios y/o establecer una profilaxis vacunal.

La mixomatosis fue introducida ilegalmente en Francia y de allí pasó a otros países europeos

El Material y Métodos utilizados fueron los siguientes:

1. Animales. Se utilizaron para esta prueba tres conejos híbridos de 60 días de edad con agua y pienso de engorde industrial *ad libitum*. Para facilitar el referenciado de las muestras se marcaron con colores el dorso de los animales: conejo 1 con color azul; conejo 2 con rojo y conejo 3 con verde. Los conejos utilizados estaban libres de anticuerpos a mixomatosis y procedían de una explotación libre de enfermedad.

La transmisión de la mixomatosis se produce principalmente por artrópodos pero en fases agudas hay que tener en cuenta también el contagio directo



Tabla 1. Resultados de PCR en las muestras recogidas.

| Referencia conejo | Horas post-inoculación | Swab Ocular | Swab Anal | Muestra sangre periférica |
|-------------------|------------------------|--------------|--------------|---------------------------|
| Azul | 64 h | negativo (-) | negativo (-) | negativo (-) |
| | 72 h | - | - | - |
| | 96 h | - | - | - |
| | 117 h | positivo | - | - |
| | 138 h | positivo | - | - |
| Rojo | 64 h | - | - | - |
| | 72 h | - | - | - |
| | 96 h | - | - | - |
| | 117 h | positivo | - | - |
| | 138 h | positivo | - | - |
| Verde | 64 h | - | - | - |
| | 72 h | - | - | - |
| | 96 h | - | - | - |
| | 117 h | positivo | - | - |
| | 138 h | positivo | - | - |

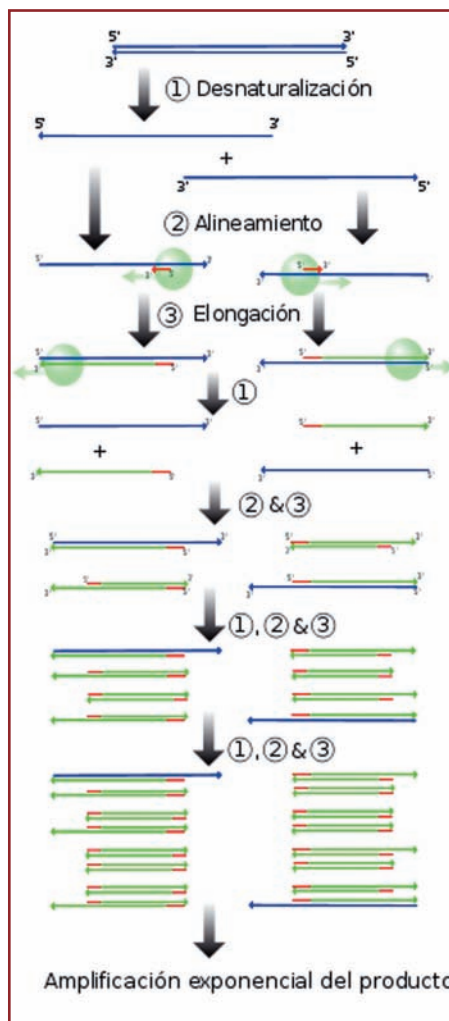
El periodo más crítico es el asintomático en el cual el animal portador no presenta síntomas clínicos

2. Ambiente. Para evitar riesgos de contagios externos, los conejos se instalaron en una unidad de aislamiento acondicionada para los enfrentamientos víricos ubicada en el Centro de Experimentación y Control de Laboratorios Hipra S.A.

3. El virus de mixomatosis empleado para la infección experimental fue la cepa Lausanne (O62 ET- 97-RK-13) a la dosis de 10 a la 3,5 TCID50 por conejo en 0,2ml repartidos 0,1ml por vía subcutánea en la espalda y 0,1 ml por vía intradérmica en el pabellón auricular.

4. Técnicas de PCR de mixomatosis utilizadas. Se utilizaron kits comerciales de análisis de PCR.

Siguiendo el objetivo previsto se tomaron muestras para este estudio de los conejos infectados experimentalmente de mixomatosis de tres fuentes diferentes: *Swab* ocular (SO); *Swab* anal (SA); *Swab* de sangre periférica de la oreja (S). La razón de estas



muestras fue pensando sobretudo en que la analítica tiene que ser sencilla y de fácil obtención, pues de lo contrario perderíamos la principal utilidad que se busca, la rapidez y sencillez del muestreo.

La recogida de las muestras se empezó a los tres días (64 horas) post inoculación del virus, repitiéndose a los 72 horas, 96h, 117h y 138h en los tres conejos. El periodo que conocemos como asintomático en cepas velogénicas de mixomatosis podría cifrarse entre 1 y 6 días (24-144 horas) post-inoculación. Esto representa que se realizaron un total de 45 PCR's directos y 9 PCR's más como control de confirmación de los resultados con otra técnica de PCR.

Los resultados obtenidos se expresan esquemáticamente en la tabla 1.

Tal como se puede apreciar con los resultados obtenidos solamente las muestras de *swabs* oculares recogidas a las 117h y 138 h post-inoculación han resultado positivas a presencia de antígeno de mixomatosis en los tres



El animal sintomático se retira de la explotación y se maneja con mayor bioseguridad, sin embargo, el animal asintomático puede permanecer en la granja perpetuando la mixomatosis

conejos utilizados. Los *swabs* oculares recogidos a las 64 h, 72 h y 96 h así como el resto de *swabs* anales y sanguíneos han dado resultados negativos. La reconfirmación de los *swabs* sanguíneos en las 96 h 117 h y 138 h con otra técnica de PCR de MV también ha dado negativo.

Glosario de palabras técnicas:

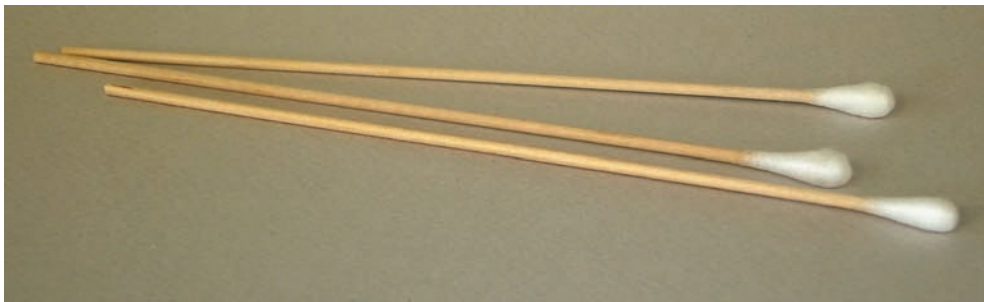
Patogenicidad: Es la capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped -conejo- susceptible.

Prevalencia: Es el número de casos de una enfermedad en una población —cunícola— y en un momento dado.

Viremia: Presencia de virus en la sangre.

Swab: algodón con el que se recogen muestras para el laboratorio.

Cepa lentogénica, mesogénica o velogénica: es la diferenciación en la que los virus manifiestan síntomas. Velogénicas síntomas entre 6 y 12 días, Mesogénicas entre 15 y 25 días y Lentogénicas más de 35 días.



Swabs para toma de muestras

Esto estaría de acuerdo con estudios anteriores que indican que la conjuntivitis es una condición anterior a la generalización de la mixomatosis y por tanto los fluidos conjuntivales anteriores a la inflamación conjuntival serían los candidatos más interesantes a evidenciar antígeno de mixomatosis en las primeras fases y como consecuencia a ser PCR positivos.

Respecto a los *swabs* anales es conocido que el virus se excreta tras un periodo de viremia y que las lesiones anales confirmatorias aparecen poco después de las conjuntivales, pero no hay ninguna referencia acerca del periodo en el que se encuentra. Sería lógico pensar que dada la naturaleza del ano en un periodo presintomático friccionado por la salida de las cagarrutas o por la propia prensión del conejo de los cecotrofos pudiera estar más limitado y limpio en cantidad antigénica a diferencia de la conjuntiva siempre húmeda y más cóncava que obviamente puede mantener sus secreciones naturales y posiblemente mayor cantidad de mixomatosis.

Es posible realizar mediante PCR una evaluación antigénica anterior al periodo sintomático, pero para darle un sentido práctico sólo sería operativo en cepas mesogénicas y lentogénicas

Respecto a las muestras de sangre deberíamos ser muy críticos tanto con los resultados obtenidos pues no concuerdan con la bibliografía consultada en la cual la viremia se establece a partir del 2º día post-inoculación y persiste durante el día 3º y 4º. Posiblemente la negatividad se deba al proceso de toma de muestras y procesamiento realizado, ya que una pequeña cantidad de sangre fue absorbida en un *swab* aunque no se descarta también posibles interferencias con algún componente de la sangre.

Como conclusión podríamos decir que es posible realizar mediante PCR una evaluación antigénica anterior al periodo sintomático pero que la distancia entre un periodo y otro de sólo 21h es corta para darle un sentido práctico en las explotaciones que nos permitiera evaluar el estado sanitario de los animales. Seguramente en la aplicación de cepas mesogénicas o lentogénicas podría tener un mayor interés al disponer de un mayor periodo de tiempo. ♦

