

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**  
**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**  
**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL**



**Enfermedad hemorrágica del conejo**

Por:

**CITLALLY MORENO VILLEDA**

**MONOGRAFÍA**

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Torreón, Coahuila

Octubre 2020.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Enfermedad hemorrágica del conejo

Por:

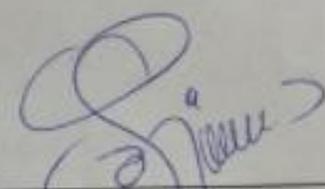
Citlally Moreno Villeda

MONOGRAFÍA

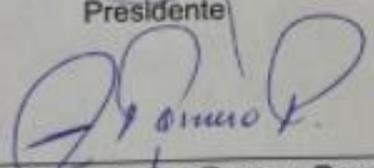
Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito  
parcial para obtener el título de:

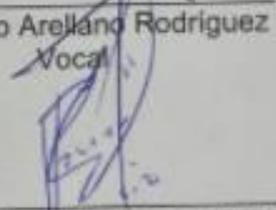
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:

  
MC. Silvestre Moreno Avalos  
Presidente

  
MC. Gerardo Arellano Rodríguez  
Vocal

  
MC. Jaime Isaias Romero Paredes Rubio  
Vocal

  
MC. Carlos Raúl Rascón Díaz  
Vocal Suplente

  
MC. J. Guadalupe Rodríguez Martínez  
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila  
Octubre, 2020.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

**Enfermedad hemorrágica del conejo**

Por:

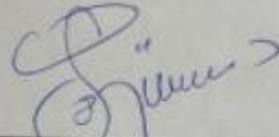
Citlally Moreno Villeda

**MONOGRAFÍA**

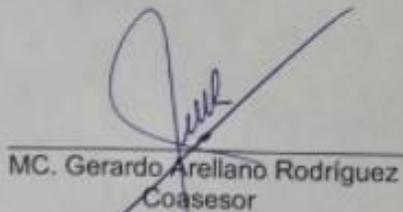
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**MÉDICO VETERINARIO ZOTECNISTA**

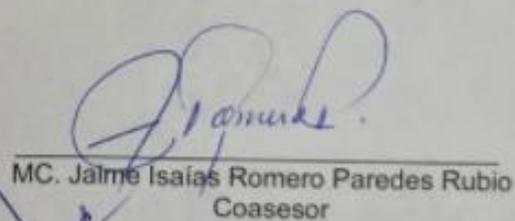
Aprobada por el Comité de Asesoría:



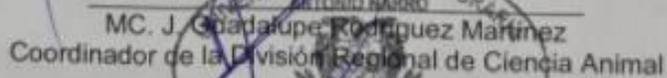
MC. Silvestre Moreno Avalos  
Asesor Principal



MC. Gerardo Arellano Rodríguez  
Coasesor



MC. Jaime Isaías Romero Paredes Rubio  
Coasesor



MC. J. Guadalupe Rodríguez Martínez  
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila  
Octubre, 2020.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios misericordioso por la dicha y bendición de concluir mis estudios.

Así que acerquémonos con fiadamente al trono de la gracia para recibir misericordia y hallar la gracia que nos ayude en el momento que más la necesitemos.

Hebreos 4:16

A mis padres y hermanos por su apoyo y entrega en estos 5 años.

A mí querida alma mater, por brindarme un techo, alimentos y educación científica.

Al grupo de docentes que me brindaron su apoyo.

Al MC. Silvestre Moreno Avalos por su apoyo y dedicación para concluir este trabajo de investigación.

## **DEDICATORIAS**

A mi padre quien siempre confió en mí, quien me apoyo con mucho amor y trabajo.

A mi madre y hermanos.

¡Gracias familia, lo hemos logrado!

## RESUMEN

La enfermedad hemorrágica del conejo (RHD) está producida por un calicivirus que afecta a conejos adultos, en los que provoca una enfermedad de curso generalmente agudo, alcanzando tasas de morbilidad del 100% y tasas de mortalidad que oscilan entre el 40 y el 100%. Los conejos afectados por el virus experimentan signos clínicos de tipo inespecífico tales como fiebre, apatía, anorexia y congestión de las membranas mucosas, que se agravan en pocas horas dando lugar a una intensa sintomatología nerviosa. Los signos que se pueden observar en esta fase de la enfermedad son ataxia, postración, vocalizaciones y convulsiones, y los animales mueren de forma súbita poco tiempo después. Entre las alteraciones orgánicas que se encuentran en estos animales destaca la presencia de una marcada hepatomegalia y esplenomegalia, acompañadas de otros signos viscerales como edema pulmonar, congestión vascular, petequias, hemorragias, ascitis y hemotórax. El RHDVb es la nueva variante del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) y produce una enfermedad de curso similar en los gazapos, resistentes al RHDV. El virus coloniza los órganos, especialmente el hígado, bazo, riñones e intestino y provoca alteraciones hemodinámicas y necrosis hepática, letal en la mayor parte de los casos. La aparición de brotes de RHDV se ha controlado eficazmente mediante el uso de vacunas inactivadas. Estas vacunas, obtenidas a partir de suspensiones hepáticas de conejos infectados experimentalmente con el virus, resultan efectivas tanto en la prevención de la enfermedad como en la vacunación de emergencia.

**Palabras clave:** Conejo, Hemorragia, Calicivirus, Sistema respiratorio, Sangrado.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	i
DEDICATORIAS .....	ii
RESUMEN .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 JUSTIFICACIÓN .....	3
2. ANTECEDENTES HISTORICOS DEL CONEJO .....	4
2.1 Evolución y taxonomía de la especie.....	4
3. SITUACIÓN ACTUAL DE LA CUNICULTURA NACIONAL Y MUNDIAL .....	6
3. ANTECEDENTES DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA VIRAL DE LOS CONEJOS (EHVC) .....	7
4. DESARROLLO HISTORICO DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA VIRAL DE LOS CONEJOS (EHVC) .....	8
5. ETIOLOGÍA.....	9
6. PATOGENIA.....	11
7. TRANSMISIÓN .....	15
8. SIGNOS .....	16
9. LESIONES.....	20
10. DIAGNÓSTICO.....	24
11. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL .....	28
12. TRATAMIENTO .....	30
13. CONTROL Y PREVENCIÓN.....	31
15. BIOSEGURIDAD .....	32
16. SITUACION ACTUAL DE LA ENFERMEDAD EN MEXICO .....	33
17. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomía de los lagomorfos (adaptado de Suckow et al., 2012).....	5
Figura 2 (A) Micrografía de RHDV teñido negativamente y purificado .....	10
Figura 3. Diferentes grados de epistaxis observados en animales afectados por el virus.....	19
Figura 4. Congestión de la conjuntiva en un conejo afectado por el RHDVb (A). Conjuntiva de un conejo sano (B). .....	19
Figura 5. Imagen macroscópica de las cavidades orgánicas de un conejo no infectado por el RHDVb, .....	21
Figura 6. Imagen de la cavidad abdominal .....	21
Figura 7. Imagen macroscópica de la cavidad celómica de un conejo infectado con RHDVb. ....	22
Figura 8. Imagen macroscópica de corazón y pulmones de 4 animales afectados por RHDVb.....	22
Figura 9. Aspecto macroscópico del hígado de 4 animales infectados por el RHDVb.....	23

## 1. INTRODUCCIÓN

El lugar de origen del conejo, o al menos donde existían en abundancia en el albor de la historia, según está reconocido y publicado, fue en la Península Ibérica (Fox, 1979).

Desde el punto de vista de la cunicultura, sólo una especie puede denominarse conejo y es la que se denomina científicamente "*Oryctolagus cuniculus*", que es la única en explotación intensiva a nivel mundial, con docenas de razas dirigidas por el hombre, con distintos formatos, colores y especialización, etc., pero todas procedentes de una única especie, el conejo silvestre europeo, aunque debiera denominarse ibérico (Camps, 1994).

Actualmente, entre los usos comerciales de esta especie, se deben mencionar la producción de carne, piel, pelo y proteínas terapéuticas, siendo muchas razas criadas exclusivamente como animal de compañía. El conejo es también utilizado como modelo animal en investigación biomédica al presentar numerosas patologías hereditarias comunes a la especie humana (cataratas, arterioesclerosis, cardiomiopatías, hipertensión, espina bífida, osteoporosis, etc.). Finalmente, el conejo es habitualmente utilizado en trabajos de fertilización in vitro, embriología, y organogénesis (ASEMUCE, 2015).

La carne de conejo constituye una fuente de proteína animal muy apreciada para la alimentación humana, debido a que es una carne blanca, magra, una fuente importante de proteína, grasa polinsaturada, buen balance de omegas 3 y 6, baja en sodio y rica en potasio, vitaminas y minerales, entre otras cualidades. En México, el consumo per cápita de carne de conejo apenas alcanza los 100 gramos por persona (ANCUM, 2010).

La cunicultura se define como el proceso de cría, engorda y reproducción del conejo en forma económica para obtener el máximo beneficio en la venta de sus productos y subproductos. Es una actividad económicamente favorable para campesinos o población con escasos recursos, debido a su fácil manejo, la rapidez en la recuperación de la inversión y a la posibilidad de generar ingresos.

Ofrece ventajas que pueden ser aprovechadas en algunas regiones para afrontar problemas de alimentación que afectan a sectores de la población con escasos recursos económicos, además de representar una alternativa para satisfacer la demanda de carne en centros urbanos con mayor capacidad de consumo (Gamboa, 2001).

En México la carne de conejo es muy apreciada por su precio accesible, su sabor y calidad, convirtiéndose en un alternativa en la alimentación como fuente de proteína en la población más vulnerable (SENASICA, 2015).

El RHDV se describió por primera vez en conejos domésticos en 1984, cuando se observó una hepatitis infecciosa necrotizante con una tasa de mortalidad de hasta el 90% en conejos de angora en China (Liu et al., 1984).

El primer brote de EHVC reportado en el Hemisferio Occidental, corresponde al ocurrido en México a mediados de diciembre de 1988, provocado por la importación ilegal de canales de conejo originarias de China y procedentes de los Estados Unidos de América. El foco primario apareció el 12 de diciembre, en la granja "El Marfil", ubicada en el poblado de Boxtha, cercano a la población de Actopan, en el estado de Hidalgo.

En México, el padecimiento fue inicialmente detectado por los Servicios Veterinarios, el 22 de enero de 1989, en pequeñas explotaciones ubicadas en el poblado de Ecatepec, Estado de México, donde un cuadro caracterizado por alta morbilidad y mortalidad produjo, en pocos días, la muerte de 1600 animales, de una población de 2000 conejos. En esta fecha el padecimiento ya se encontraba ampliamente distribuido prácticamente en todo el Valle de México.

El operativo de emergencia implantado, detuvo el avance de la enfermedad, la cual fue oficialmente declarada como erradicada el 14 de enero de 1993, después de que transcurrieron 22 meses desde la presentación del último foco activo y la conclusión del estudio que mostró la ausencia de animales serológicamente positivos en las áreas del país que habían estado afectadas (Gay, 2004).

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

La Enfermedad Hemorrágica del Conejo o también conocida como Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo fue una problemática en la sanidad animal en los años 80's a nivel mundial, registró una alta mortalidad en las poblaciones cunícolas caracterizada por muerte súbita, el primer caso en el hemisferio occidental fue en México por la importación clandestina de canales de conejo provenientes de China, en donde debido a la gran distribución del problema no fue posible calcular la cantidad exacta de las muertes generadas por la enfermedad.

Después de declararse erradicada en México en el año de 1993, la organización mundial de sanidad animal (OIE) notifico el inicio de la enfermedad en el Condado de San Juan, San Juan, Washington Estados Unidos de América, el 8 de julio del 2019, confirmándolo para el 17 de julio del 2019. Este evento consistió en un solo caso: un conejo de compañía entregado a una clínica veterinaria local. Los Servicios de Inspección Veterinaria y Fitosanitaria (APHIS, por sus siglas en inglés) del USDA y el Departamento de Agricultura del Estado de Washington [actualmente] están llevando a cabo una investigación epidemiológica integral sobre este evento. Se ha informado de la muerte de conejos europeos silvestres (*Oryctolagus cuniculus*) en la zona del brote (OIE, 2019).

Por lo tanto, esta investigación consiste en una recopilación de información sobre el impacto que genera un brote de la enfermedad, las pérdidas que conlleva y el cómo se podría evitar.

## 2. ANTECEDENTES HISTORICOS DEL CONEJO

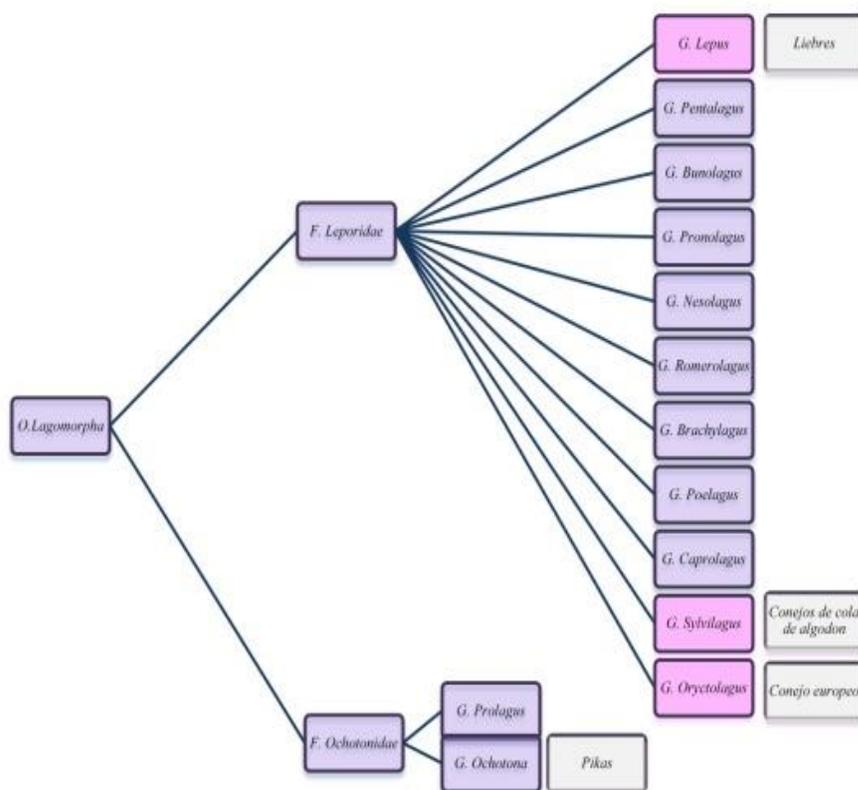
### 2.1 Evolución y taxonomía de la especie

El conejo europeo, *Oryctolagus cuniculus*, es un pequeño mamífero originario de la Península Ibérica (Pinheiro et al., 2016; Suckow et al., 2012), cuyo ecosistema natural es el monte mediterráneo. Los primeros restos de conejo de los que se tiene constancia proceden del Sur de España, concretamente de Andalucía, y pertenecen a la especie *Oryctolagus laynensis*, considerado el ancestro más remoto del conejo actual (Alda et al., 2009; López-Martínez, 2008; Suckow et al., 2012). Se estima que *Oryctolagus laynensis* ocupó Iberia hace 3 millones de años, y a pesar de la coexistencia de otras especies relacionadas, como *O. lacosti* y *O. burgi*, de mayor tamaño y robustez, se considera que es la especie más próxima a la *O. cuniculus* (Alda et al., 2010; Cabezas et al., 2011). Al final del Paleolítico, todas las especies, excepto *O. cuniculus* se habían extinguido (Suckow et al., 2012). Se cree que esta especie se extendió hacia Europa y el Norte de África, quedando aislada en la Península Ibérica durante un período glacial que determinó su localización definitiva en la península (López-Martínez, 2008). Parece probable que durante esta etapa se diferenciaron las dos subespecies de conejo que existen en la actualidad en la Península y sus islas (Branco et al., 2000; Branco et al., 2002). Por un lado, *Oryctolagus cuniculus cuniculus*, que se extendió por el Noreste de la península, y dio lugar a todas las poblaciones europeas, y por otro *Oryctolagus cuniculus algerus*, que se distribuyó hacia el Suroeste de la Península, alcanzando además las islas atlánticas de España y Portugal (Pinheiro et al., 2016). La línea imaginaria que une el noroeste y el sureste de la península fue ocupada por una población mixta formada por ambas especies (Branco et al., 2000; Branco et al., 2002; Suckow, 2012), en la que se supone que ambas subespecies han podido hibridar.

La clasificación taxonómica de los lagomorfos ha sido controvertida desde sus inicios, debido en parte a las similitudes morfológicas que presenta respecto a las liebres y los roedores. Tradicionalmente se han asimilado al mismo grupo que los

roedores, debido a sus características físicas (Meng y Wyss, 2005) y la creación de un único grupo denominado *Glires*, que incluyera a todos estos mamíferos. El término *Lepus cuniculus* para señalar el grupo compuesto por las liebres, el conejo europeo y el conejo de cola de algodón; en 1873 se distinguió como *Oryctolagus cuniculus* del resto de lagomorfos del grupo, aunque siguió incluido en el género *Lepus* (Angermann, 1990; Hoffman, 1993). En la actualidad, el conejo europeo, el de cola de algodón y la liebre pertenecen a 3 géneros diferentes de la misma Familia, como se aprecia en la Figura 1.

Figura 1. Taxonomía de los lagomorfos (adaptado de Suckow et al., 2012)



### **3. SITUACIÓN ACTUAL DE LA CUNICULTURA NACIONAL Y MUNDIAL**

La cunicultura es una actividad que se ha desarrollado a nivel mundial presentando un mayor incremento en zonas de Europa. A pesar de todas las bondades biológicas de esta especie, el consumo de su carne en México es muy inferior comparado con varios países europeos mediterráneos como Francia, España, Italia y Malta. A nivel comunitario España es, tras Francia, la segunda productora, representando un 25,5% de la producción total de carne de conejo de la Unión Europea (UE). Esta producción tiene además un fuerte componente cultural que hace que sólo se consuma en unos pocos países de la UE. Así, toda la producción y consumo, está concentrada en nueve países de la UE, y fundamentalmente en los tres primeros productores (Francia, España, Italia), que abarcan más del 85% de la producción comunitaria. La evolución productiva en los últimos años ha venido condicionada por la profesionalización de la actividad, registrándose un importante descenso de la producción local, ligada al autoconsumo y a los circuitos cortos de distribución, y la consolidación de los cunicultores profesionales, reduciéndose considerablemente el número de explotaciones (MAPA, 2019).

Actualmente existen más de 50 razas de conejo que se crían para la producción de carne, piel y pelo (González, 2016). Además, es un recurso cinegético habitual y de investigación muypreciado, que hoy en día constituye un animal de compañía completamente integrado en la sociedad occidental.

### 3. ANTECEDENTES DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA VIRAL DE LOS CONEJOS (EHVC)

La aparición del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo fue denominada “Viral Haemorrhagic Disease”, o “Enfermedad Vírica-Hemorrágica” (RHDV), se inició en 1984 en la Provincia de Jiangsu de la República Popular de China, propagándose rápidamente a través de las poblaciones de conejos (*Oryctolagus cuniculus*). En menos de un año, la RHD mató a 140 millones de conejos domésticos en China y se extendieron sobre un área de 50 000 km<sup>2</sup>. Corea fue el siguiente país en reportar brotes de RHD asociados con la importación de pieles de conejo desde China (Yuan *et al.* 2013). Se cree que el origen de la epidemia fue un lote de conejos importados de Alemania, ya que existen evidencias que sugieren que la aparición de enfermedad asintomática inicio en Europa antes del brote en China (Chasey *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 2002). Sin embargo, el primer brote en Europa se informó en Italia hasta el año 1986 (Duarte *et al.* 2014; Zhu *et al.*, 2015; Esteves *et al.*, 2015), convirtiéndose en endémica en varios países. En la Península Ibérica, donde se originaron los conejos europeos y donde constituyen una especie clave del ecosistema, los primeros brotes se remontan a 1988 para España y a 1989 para Portugal y causaron una severa reducción de las poblaciones silvestres. Al mismo tiempo, las poblaciones nacionales de varios países del norte de África experimentaron brotes de RHD. En las Américas, los primeros brotes se registraron en México en 1988 después de la importación de productos de conejo de China. Sin embargo, México es actualmente el único país que ha logrado erradicar con éxito la RHD con el último brote ocurrido en 1992 (Abrantes *et al.*, 2012; Capucci *et al.*, 2017; Edenm *et al.*, 2015; Du, 1991; Leuthold *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2012; Westcott y Choudhury, 2014; Yang *et al.*, 2015).

#### 4. DESARROLLO HISTORICO DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA VIRAL DE LOS CONEJOS (EHVC)

El origen exacto y la evolución del RHDV sigue siendo desconocido. Aunque el primer registro proviene de China, varios estudios han sugerido que el RHDV se originó en Europa, donde el virus había estado circulando mucho antes de que se informara la primera epidemia en 1984. Análisis más recientes sugieren la fecha de origen el período entre 1970-1981, poco antes de la primera epidemia que tuvo lugar en 1984 (Rocha *et al.*, 2017).

Posteriormente en la primera década del siglo XXI se generó una situación de equilibrio, en la que el número de brotes notificado había descendido y se manejaba de forma eficaz (Le Gall-Reculé, 2011 a, b). Sin embargo, en el año 2011, en algunas granjas de conejos en España se descubrió una nueva variante de RHDV, causando altas tasas de mortalidad. (Hall *et al.*, 2016, Lavazza *et al.*, 2015). Desde 2012, la nueva variante de RHDV se ha detectado en la mayoría de las granjas de conejos y en varias poblaciones silvestres distribuidas en España y Portugal, lo que sugiere que el nuevo virus devolvió el protagonismo a la infección al diseminarse rápidamente en Europa y que se ha extendido rápidamente por toda la Península Ibérica. Esta variante afecta tanto a las subespecies de conejos salvajes (*O. cuniculus cuniculus* y *O. c. algirus*), y a diferencia de la forma clásica de RHDV, mata conejos de tan solo 11 días de edad y conejos que han sido vacunados contra RHDV clásico. (Delibes-Mateos *et al.*, 2014, Dalton, *et al.*, 2017, Duarte *et al.*, 2015 b; Calvete *et al.*, 2014). La última región en ser alcanzada por el virus de la enfermedad vírica hemorrágica fue Canadá, donde se notificó un caso de la enfermedad en un conejo doméstico, en 2012 (Gould, 2012; Esteves *et al.*, 2014).

Actualmente, la enfermedad es endémica en Europa, Asia y América, con graves repercusiones tanto económicas como ecológicas a nivel global (Dalton *et al.*, 2017).

## 5. ETIOLOGÍA

El agente etiológico de la enfermedad es un Calicivirus (CV), estos son pequeños virus redondos que varían de 27 a 32 nm de diámetro. Son algunos de los virus patógenos en animales más pequeños, y originalmente se denominaban SRSV (ronda pequeña virus estructurados). Su superficie muestra una estructura en forma de copa del cual se deriva el nombre "calicivirus" (Rohayem *et al.* 2010). El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) reconoce cuatro géneros en la familia *Caliciviridae*: *Lagovirus*, *Vesivirus*, *Norovirus* y *Sapovirus*. Recientemente se propusieron tres géneros más como parte de esta familia: *Nabovirus* / *Becovirus*, *Recovirus* y *Valovirus*, pero aún no son reconocidos por el ICTV (Rocha *et al.* 2017; Abrantes *et al.* 2012; Calvete *et al.* 2018; Calvete *et al.* 2019; Martín-Alonso *et al.* 2016). El virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) es causada por la especie *Caliciviridae lagovirus europaeus* (genotipo GI.1) (DeSheng *et al.*, 2015). El serotipo único de RHDV se divide en 2 subtipos, RHDV clásico y RHDVa (Dalton *et al.* 2012)

El lagovirus es un virus de ARN positivo monocatenario, de forma icosaédrica, no envuelto, de aproximadamente 40 nm de tamaño. La cápside del virus comprende 180 copias (90 dímeros) de una sola subunidad de la cápside (Moreno *et al.* 2016; Zheng *et al.*, 2016). El genoma viral está compuesto por un ARN genómico de 7,5 kb y un ARN subgenómico de 2,2 kb. El ARN genómico contiene dos marcos de lectura abiertos superpuestos (ORF 1 y 2). ORF1, que comprende los nucleótidos 10–7044, codifica una poliproteína de aproximadamente 257 kDa, que se escinde en varias proteínas no estructurales maduras (incluyendo una helicasa, proteasa, entre otras) (Liu *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2017) y una proteína estructural principal (la cápside VP60) que también puede expresarse a partir del ARN subgenómico. ORF2, este comprende los nucleótidos 7025-7378, codifica una proteína estructural menor (VP10), que también está codificada por los 3 extremos del ARN genómico (Zhu *et al.* 2015). Cada monómero de cápside tiene tres dominios, la N-terminal arma (NTA, 1-65 aa), la cubierta (S, 66-229 aa) y la protuberancia (P, 238-579 aa), que están unidas por una región bisagra (230–237 aa) (Hu *et al.*, 2010;

Wang *et al.* 2013). El dominio P también puede subdividirse en dos subdominios, P1 (238–286 aa, 450–466 aa, 484–579 aa) y P2 (287–449 aa y 467–483 aa), similares a otros virus (Hu *et al.*, 2010). Además, los subdominios P2 de RHDV muestran el mayor grado de variación genética (Chen *et al.* 2014; Kinnear y Linde, 2010; Wang *et al.*, 2013; Cheng *et al.* 2013).

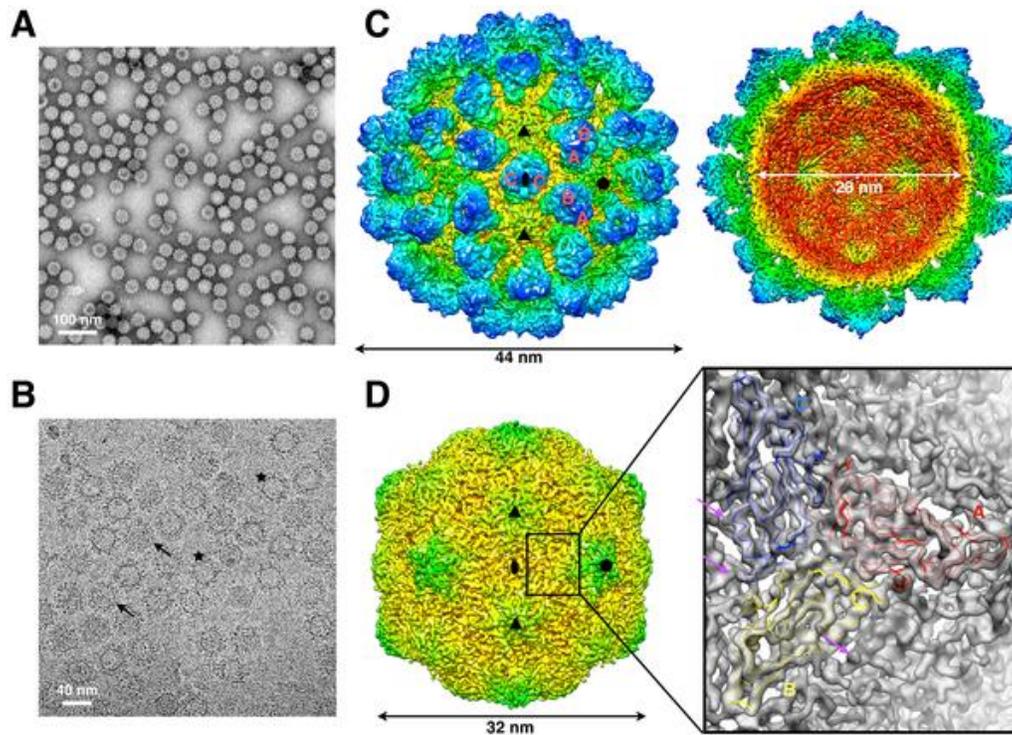


Figura 2 (A) Micrografía de RHDV teñido negativamente y purificado (barra = 100 nm). (B) Micrografía Cryo-EM (crioscopia electrónica de partículas individuales) de RHDV purificado (barra = 40 nm, las flechas negras y las estrellas apuntan a partículas de RHDV con diferentes cantidades de densidad interna). (C) Mapa Cryo-EM reconstruido del virión RHDV, codificado por colores por radio (los ejes icosaédricos de 2, 3 y 5 veces se indican con símbolos negros y se identifican los capsómeros AB y CC. A la derecha, se ha eliminado la mitad más cercana del mapa de densidad para revelar características internas en el mapa de densidad RHDV. El umbral de contorno del mapa Cryo-EM aquí se estableció en  $3.3\sigma$  por encima de la media). (D) Igual que (C) pero con la densidad del capsómero eliminada para mostrar solo la carcasa interna del RHDV. (Se Insertó: una región del mapa de densidad se muestra como una isosuperficie gris transparente en la que se ajustan las estructuras principales de los dominios S de tres copias de la proteína principal de la cápside RHDV, VP60: A en rojo, B en amarillo y C en azul. Las flechas magentas apuntan a algunas características de densidad representativas que representan cadenas laterales de residuos).

## 6. PATOGENIA

La enfermedad hemorrágica del conejo (RHD) es una enfermedad infecciosa mortal altamente contagiosa y aguda en conejos que causa apoptosis hepatocelular y coagulación intravascular diseminada (Hu *et al.* 2016).

Durante los primeros brotes de la enfermedad se observó una morbilidad del 100% y tasas de mortalidad superiores al 90% en adultos (Parra y Prieto 1990; OIE, 2015). Sin embargo, se ha comprobado que estos parámetros fluctúan entre cepas, considerándose que la morbilidad se encuentra entre el 30-100% y la mortalidad entre el 40-100% en adultos (OIE, 2016; Gao, 2013). Los animales menores de 2 meses son menos susceptibles a la enfermedad, y los menores de 4 semanas son resistentes (OIE, 2015). En cuanto a la variante RHDVb, inicialmente se describió como una infección que cursaba con tasas de mortalidad del 80-90%, tanto en animales domésticos como silvestres, menores de 30 días (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013; Dalton *et al.*, 2014). En la actualidad, se considera que las tasas de mortalidad pueden oscilar entre el 5-70%, siendo lo más habitual que se sitúen alrededor del 20% (OIE, 2015), tanto en la infección natural como experimental. Los animales que han mostrado mayor predisposición a sufrir la enfermedad son los gazapos de 15-25 días (Puggioni, *et al.*, 2013; Capucci *et al.*, 2017).

El período de incubación de la enfermedad varía entre 1 y 3 días y de 3-5 días en el RHDVb (OIE, 2016), los conejos generalmente sucumben entre 12 a 36 h después del inicio de la fiebre ( $> 40^{\circ} \text{C}$ ). Dependiendo de la evolución clínica de la enfermedad, pueden ocurrir tres cursos clínicos diferentes (Abrantes *et al.*, 2012; OIE, 2012; Trzeciak-Ryczek *et al.*, 2015). La enfermedad hemorrágica del conejo (RHD) es rápidamente mortal, con tasas de mortalidad del 70% al 100% en conejos adultos (Mahar *et al.*, 2016; Marques *et al.* 2010; Merchan *et al.*, 2011); los conejos jóvenes no se ven afectados o están subclínicamente infectados (Marques *et al.* 2012). Esta diferencia en la susceptibilidad a la enfermedad es poco conocida, pero puede deberse a cambios en los receptores específicos de tejido que ocurren cuando los conejos jóvenes se desarrollan hasta la edad adulta

(Dalton *et al.* 2015; Fernández *et al.*, 2011). La susceptibilidad a la enfermedad comienza en la semana 5-6 de la vida de los conejos y aumenta constantemente hasta la semana 8-9 cuando se vuelven completamente susceptibles. La RHD se caracteriza principalmente por un curso agudo / agudo con alta mortalidad, hasta 80-100%, en 48 a 96 h (Nystrom *et al.* 2011; Teixeira *et al.*, 2012; Wang *et al.* 2012). Durante un brote, del 5 al 10% de los conejos pueden mostrar evolución subaguda / crónica de la enfermedad. Pueden morir 1 o 2 semanas después, probablemente debido a una disfunción hepática, o recuperarse y seroconvertir con títulos de anticuerpos muy altos (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013).

Se demostró que la infección por RHDV induce la producción de IL-6, que es una de las cascadas de citocinas secundarias y actúa como un potente inductor de proteínas de fase aguda en el hígado de conejos. Sin embargo, hasta hace poco, RHDV no podía ser propagado en tejido o cultivo celular. Por lo tanto, el mecanismo detrás de IL-6 la inducción por RHDV es desconocido. Un estudio previo demostró el uso de la genética inversa para producir RHDV *in vitro*. Por lo tanto, dicho método puede utilizarse para estudiar el mecanismo de la inducción de IL-6 durante la infección por RHDV. Para inducir la expresión de citocinas inflamatorias, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR), lo que resulta en la activación del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), AP-1, y otros factores de transcripción a través de varias vías de señalización tales como la vía NF- $\kappa$ B y la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) cascada. IL-6 es una citocina proinflamatoria prototípica codificada por el Gen IL-6. IL-6 es una citocina multifuncional con un papel central en Diversos procesos inflamatorios e inmunológicos. Muchas células tipos, incluidos monocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos, son capaces de producir IL-6. La expresión de IL-6 en estas células puede ser estimulada por varios factores (Liu *et al.*, 2016; Rosell *et al.*, 2016; Suckenow *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2014).

El rápido progreso de la infección por calicivirus en hepatitis fulminante en conejos adultos hace que difícil mapear la secuencia de cambios celulares que ocurre

como resultado de calicivirus inoculación, ya que la mayoría de los animales están muertos en menos de 48 horas después de la inoculación. Además, los valores de los marcadores bioquímicos de daño hepático han demostrado que la RHD progresa a un ritmo diferente en el individuo (Marques *et al.*, 2010).

Un tema central en la patogénesis del RHD es comprender esta resistencia relacionada con la edad, una infección viral fatal en animales adultos. Pertinente a este problema, RHDV es capaz de unir antígenos del grupo histo-sanguíneo (HBGA) que se expresan en la mucosa de las vías respiratorias superiores y tractos digestivos de conejos adultos, y han postulado que la densidad de estos factores de apego en las células mucosas es esencial para que los conejos adultos sean susceptibles a la infección por RHDV. De acuerdo con su punto de vista, encontraron solo una débil unión de partículas de virus a los mismos tejidos mucosos en conejos jóvenes, lo que indica esa baja expresión de HBGA podría explicar la resistencia de animales jóvenes a RHD. Sin embargo, y a pesar de esta evidencia, recientemente informaron que la baja expresión de estos factores facilitadores de la infección, a nivel de epitelio, solo confiere protección parcial contra la infección por RHDV. También mostraron que los hepatocitos, su principal objetivo de la replicación de RHDV, no exprese HBGA, lo que los llevó a sugerir la existencia de hígado adicional receptor (s) celular para el virus. Además, se demostró que conejos jóvenes infectados con RHDV por la ruta intramuscular desarrolla exactamente el mismo hígado leve enfermedad que habíamos observado en conejos jóvenes infectados con RHDV. Esto nos hizo considerar que la resistencia de los conejos jóvenes a RHD puede depender de factores supuestos adicionales (Marques *et al.* 2014; Nyström *et al.*, 2015).

Los conejos australianos están comenzando a desarrollar resistencia genética al RHDV, por mecanismos que no son completamente entendidos, se ha demostrado que los antígenos del grupo HistoBlood (HBGA) en los revestimientos epiteliales del tracto gastrointestinal de conejo actúan como factores de unión para RHDV. Los HBGA se sintetizan por la enzima # 1, 2 fucosiltransferasa, que en los conejos está codificada por tres genes funcionales, Fut1, Fut2 y Sec1 que tienen

experimentado múltiples eventos de conversión de genes durante la evolución. Trabajos recientes sugieren que diferentes RHDV las cepas se unen preferentemente a diferentes ligando de HBGA, y los conejos que expresan fenotipos de HBGA de unión más débil son encontrados con mayor frecuencia en poblaciones de conejos salvajes que fueron los siguientes brotes de RHDV. Por lo tanto, si la población de conejos salvajes está parcialmente protegida de RHDV (la cual es una letal infección), por protección cruzada inmunológica de un calicivirus no patógeno, esto puede reducir la presión selectiva hacia conejos genéticamente resistentes con debilitadores fenotipos vinculantes HBGA como un medio para evitar letales Infección por RHDV (Strive *et al.*, 2013).

Además, los estudios han demostrado la participación del sistema inmune en la patogénesis de RHD, especialmente el papel de leucocitos de sangre periférica (PBL). Tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa de los conejos diferían dependiendo de la cepa de RHDV utilizada para la infección. Además, distintos perfiles de glóbulos blancos y rojos poblaciones, así como diferentes tasas de mortalidad se han observado en el curso de la infección causada por diferentes cepas de RHDV. Animales infectados puede mostrar una mayor infiltración de leucocitos en el hígado, causando inflamación unida a la producción de citocinas y provocando una fase aguda de reacción. Hasta ahora, la investigación se ha centrado en papel de las citocinas durante la infección por RHDV y su expresión en hepatocitos; sin embargo, no hay datos sobre la expresión de citoquinas en PBL de conejos infectados (Trzeciak-RyczeK *et al.*, 2016).

## 7. TRANSMISIÓN

Las posibles rutas para la transmisión de la enfermedad son la oral, nasal, conjuntival y parenteral, ya que los insectos que se alimentan de sangre también han demostrado ser vectores mecánicos eficientes (Duarte, *et al.* 2015 a). La transmisión de RHDV puede ocurrir a través del contacto directo con un animal infectado, ya que los conejos infectados pueden arrojar partículas virales en sus secreciones y excreciones (Westcott *et al.*, 2015), o indirectamente por medio de alimentos, ropa de cama, agua, ropa, jaulas y equipos contaminados como fómites (Merchan *et al.* 2011; Tung *et al.* 2015) -o transmisión transmitida por vectores mediante la búsqueda de mamíferos, aves e insectos (Mahar *et al.*, 2016). Se ha sugerido que las puertas naturales para la entrada viral se ubican en el tracto respiratorio superior y digestivo. En infecciones naturales, la ruta fecal se considera el modo de transmisión preferencial (Leuthold *et al.*, 2014). En el campo, los cadáveres de conejos infectados con RHDV pueden ser una fuente importante de propagación viral, ya que el virus parece ser altamente resistente y estable cuando se expone a condiciones ambientales adversas. De hecho, se ha descubierto que los cadáveres de conejos infectados con RHDV expuestos a condiciones ambientales contienen partículas virales viables durante y hasta tres meses (Westcott *et al.*, 2014). Esta capacidad es primordial para la epidemiología de la RHD y respalda la importancia de las rutas indirectas en la transmisión. También se ha sugerido que los factores ambientales tienen un impacto en la efectividad de la RHD en poblaciones de conejos. La temperatura y la humedad parecen ser las variables climáticas más importantes. De hecho, en Australia, las tasas de mortalidad por RHD son más altas en las zonas áridas y semiáridas del interior que en las regiones costeras húmedas que experimentan temperaturas más suaves y la enfermedad se activa durante la temporada de reproducción, alcanza su punto máximo a principios de la primavera y está ausente en el verano. Las variables climáticas pueden contribuir a la estacionalidad geográfica y observada para los brotes de RHDV al afectar la abundancia y la actividad de los vectores involucrados en la transmisión de RHDV. También se ha sugerido que

otros factores no climáticos contribuyen al patrón variable del impacto de la RHD en las poblaciones de conejos, como el momento de la temporada de reproducción, la presencia de un calicivirus similar y protector de RHDV en las poblaciones de conejos o la interacción negativa de los brotes de mixomatosis en las poblaciones (Abrantes *et al.*, 2012; Strive *et al.*, 2010).

Sin embargo, el propietario informó la presencia de ratas en el área, lo que generó dudas sobre su posible papel en la transmisión de RHDV-2 de las poblaciones de conejos salvajes. Además, la contaminación viral de los fómites puede haber ocurrido ya que el propietario trabaja mucho en la agricultura y las granjas. Aunque los vectores mecánicos, como los mosquitos y las moscas, que involucra tanto a especies de moscas silvestres (*Musca vetustissima*) como de moscas voladoras (*Calliphoridae*) en Australia, lo que permite una mayor duración y distancia, son menos activos durante esta época del año, debe considerarse su papel hipotético en la transmisión de RHDV-2 de conejos salvajes a domésticos (Duarte *et al.*, 2015c; Edenm *et al.* 2015b; Hall *et al.* 2015; Mahar *et al.*, 2016).

El principal se cree que las fuentes de infección son la transmisión directa de conejos infectados, conejos jóvenes de menos de 20 días que logran sobrevivir a la enfermedad (Rocha *et al.*, 2017). Además, el RHDV es especialmente resistente al medio ambiente en condiciones secas y hasta la fecha no hay evidencia de que RHDV pueda infectar otras especies (Nystrom *et al.*, 2011)

## 8. SIGNOS

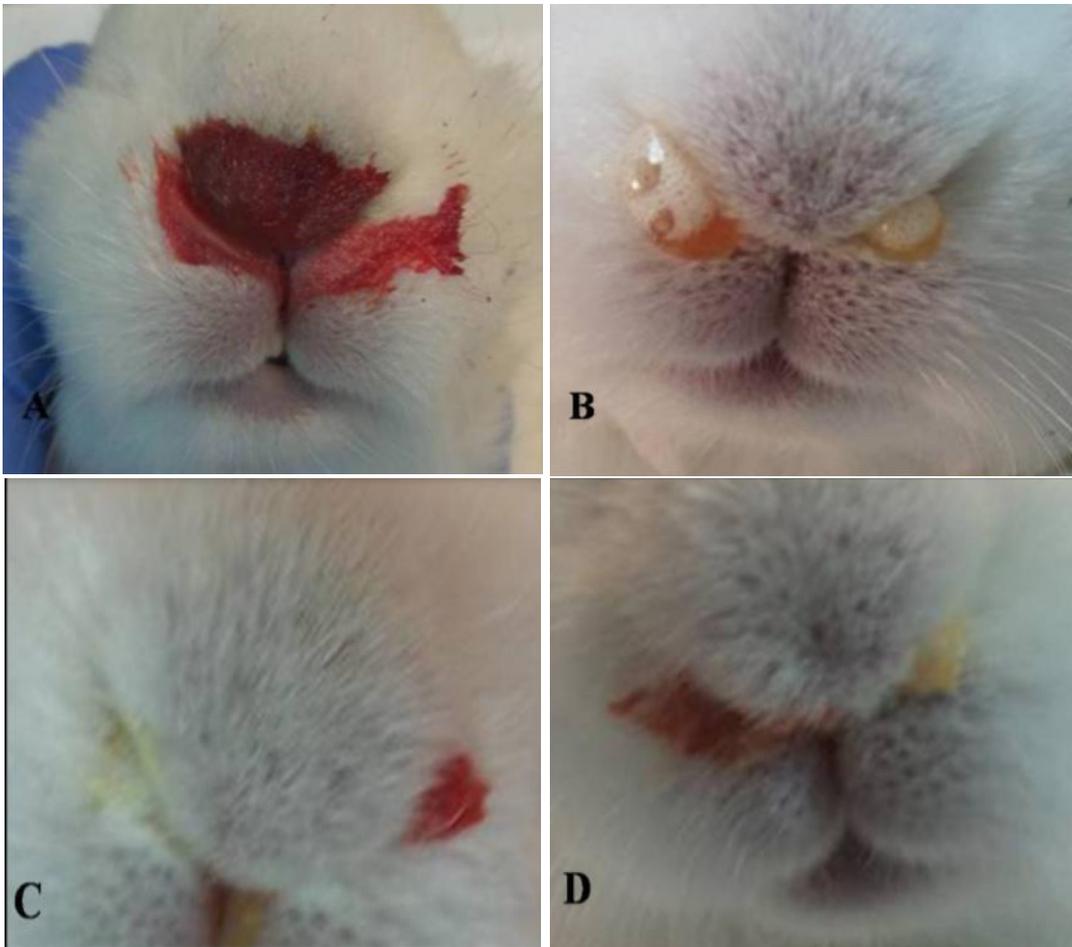
Los animales infectados no muestran signos clínicos y mueren repentinamente los conejos adultos mueren dentro de los 3 días de Infección por RHDV, ya que muestra sin signos de la enfermedad hasta unas pocas horas antes de la muerte (Marques *et al.* 2014). Las infecciones agudas se acompañan de anorexia, apatía y congestión de la conjuntiva palpebral y también se pueden observar síntomas

neurrológicos como opistótonos, excitación, parálisis y ataxia. Ocasionalmente hay algunos signos respiratorios (traqueítis, disnea y cianosis) y secreción nasal espumosa y sanguinolenta; también pueden ocurrir lagrimeo, hemorragias oculares y epistaxis (Figura 3 y 4). Las formas subagudas de la enfermedad presentan síntomas clínicos similares, pero más leves y la mayoría de los conejos sobreviven. Los conejos que experimentan infecciones subagudas desarrollan anticuerpos contra el RHDV que confieren protección contra la reinfección. Además, se ha informado que durante un brote de RHD, un bajo porcentaje de conejos puede experimentar una forma crónica de la enfermedad con síntomas que incluyen ictericia severa y generalizada, anorexia y letargo. Estos animales tienden a morir 1-2 semanas después, pero los animales que superan la enfermedad presentan una seroconversión potente (Abrantes *et al.*, 2012).

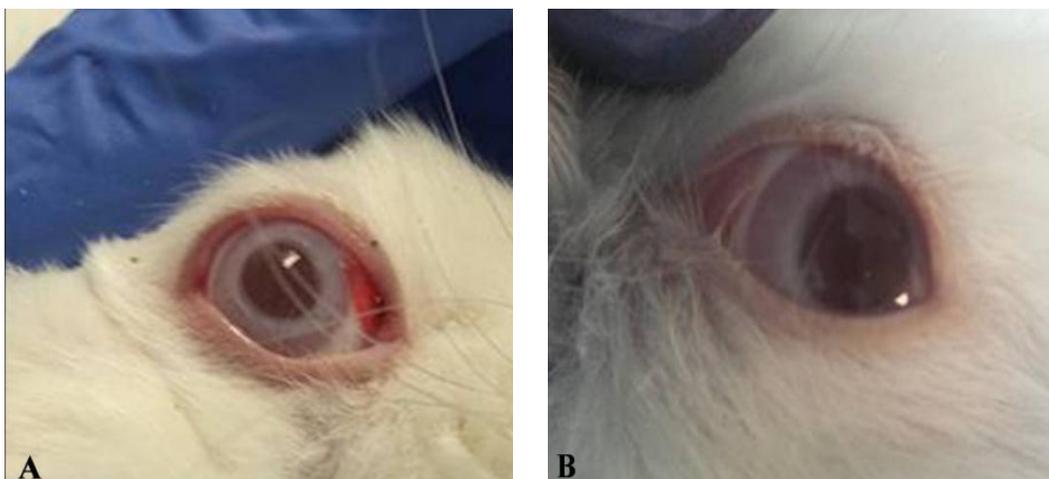
Hay tres cursos clínicos diferentes de RHD:

- **Sobreagudo:** Común cuando la enfermedad ingresa por primera vez a una explotación, distinguiéndose por muerte súbita dentro de las primeras doce horas sin señales de antecedentes clínicos, en algunos casos pudiéndose observar hipertermia (41° C) entre las seis y ocho horas, ocasionalmente relajamiento de esfínteres, salida de heces con mucosidad blanquecina, que queda pegada alrededor del ano, así como aborto en algunas hembras gestantes (SAGARPA, 2015)
- **Aguda:** Este cuadro implica depresión, anorexia, apatía, respiración rápida, anemia (figura 3) y algunos animales muestran signos de malestar abdominal. Los animales mueren después de uno a tres días. Durante la fase agónica, los animales yacen en decúbito lateral, presentando movimientos de marcha. A la muerte se observa cianosis en labios y ollares, así como salida de un líquido espumoso sanguinolento de los ollares de algunos animales. Como en la forma sobreaguda, pueden observarse abortos y la presencia de heces con mucosidad blanquecina, pegada alrededor del ano (SAGARPA, 2015).

- **Sub aguda:** Común en casos experimentales o en explotaciones en las que se encuentran animales parcialmente inmunes. En el primer caso los signos son comparables a los de la forma aguda, aunque por lo general más benignos, presentándose, entre las treinta y cuarenta y ocho horas post inoculación. Implica síntomas clínicos leves y los animales recuperarse en 2–3 días (Nystrom *et al.*, 2011, SAGARPA, 2015). En Europa se ha descrito el padecimiento como de tipo agudo, caracterizado por postración, depresión, anorexia, congestión conjuntival (Figura 4), edema palpebral, convulsiones, ataxia y parálisis en algunos casos, así como taquicardia, taquipnea, respiración abdominal y muerte, que en los casos experimentales se produce entre las treinta y seis y setenta y dos horas post inoculación, acompañada de convulsiones, chillidos, y epistaxis en muchos de los cadáveres (SAGARPA, 2015)



*Figura 3. Diferentes grados de epistaxis observados en animales afectados por el virus. (A) Epistaxis profusa. (B) Exudado nasal espumoso, sero-sanguinolento. (C, D) Exudado nasal mixto, sero-mucoso y sanguinolento.*



*Figura 4. Congestión de la conjuntiva en un conejo afectado por el RHDVb (A). Conjuntiva de un conejo sano (B).*

## 9. LESIONES

El RHDV causa la enfermedad hemorrágica del conejo (RHD), que es una enfermedad altamente infecciosa y mortal de conejos caracterizada por necrosis hepática, intestinal y linfóide y coagulación intravascular terminal masiva (DeSheng *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2016). La enfermedad hemorrágica del conejo es rápidamente mortal, altamente infecciosa. Provoca altas tasas de mortalidad (> 90%) en conejos adultos, pero los conejos jóvenes generalmente son naturalmente resistentes a la infección letal (Calvete *et al.* 2018; Zhu *et al.* 2015).

Las principales lesiones histopatológicas encontradas en la necropsia son hepatitis aguda debida a la pérdida de células hepáticas como resultado de la apoptosis inducida por RHDV y esplenomegalia (Hukowska-Szematowicz *et al.* 2013; Lopes *et al.*, 2015 a, b; Selleri *et al.*, 2014). Se pueden observar hemorragias difusas y congestiones en varios órganos, particularmente en los pulmones, el corazón, los riñones, músculos, así como el sistema nervioso central, como resultado de una coagulación intravascular diseminada masiva (DIC) que generalmente es la causa de la muerte, apareciendo la mayoría probable como consecuencia de la pérdida de células hepáticas a través de la apoptosis inducida por RHDV (Figura 7,8,9). Los conejos adultos infectados mueren dentro de las 48–72 h posteriores a la infección, lo que se asocia con hepatitis necrotizante aguda, hemorragia y bazo congestionado y agrandado (Abrantes *et al.*, 2012; Chen *et al.* 2014; Dalton *et al.* 2014; Hu *et al.*, 2010; Camarda *et al.*, 2014; Le Gall-Reculé *et al.*, 2011a; Leuthold *et al.*, 2014; Strive *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2012; Trzeciak-RyczeK *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2015).

Los conejos son caracterizados por insuficiencia hepática aguda (ALF), tendencia de sangrado, encefalopatía e hipertensión intracraneal (Liu *et al.*, 2014)

Todos los conejos muestran las principales lesiones clásicas de RHD, un hígado pálido, hinchado y friable, negro oscuro y agrandado bazo y hemorragias petequiales en los pulmones y riñones, la tráquea presentaba hemorragias y una espuma, mucosidad sanguinolenta (Figura 10,11). Además, se observó enteritis

del intestino delgado. Histológicamente, el hígado mostró más lesiones significativas con necrosis coagulativa multifocal, esteatosis y un modesto infiltrado mononuclear periportal (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2014; Puggioni *et al.*, 2013; Simpson *et al.*, 2014).

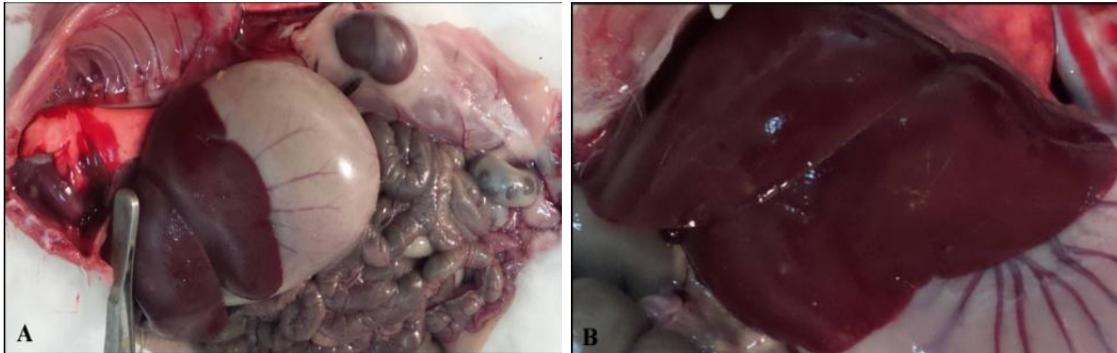


Figura 5. Imagen macroscópica de las cavidades orgánicas de un conejo no infectado por el RHDVb, donde se aprecia la coloración uniforme y rojiza del hígado (A). Detalle de la superficie hepática de un conejo sano (B).

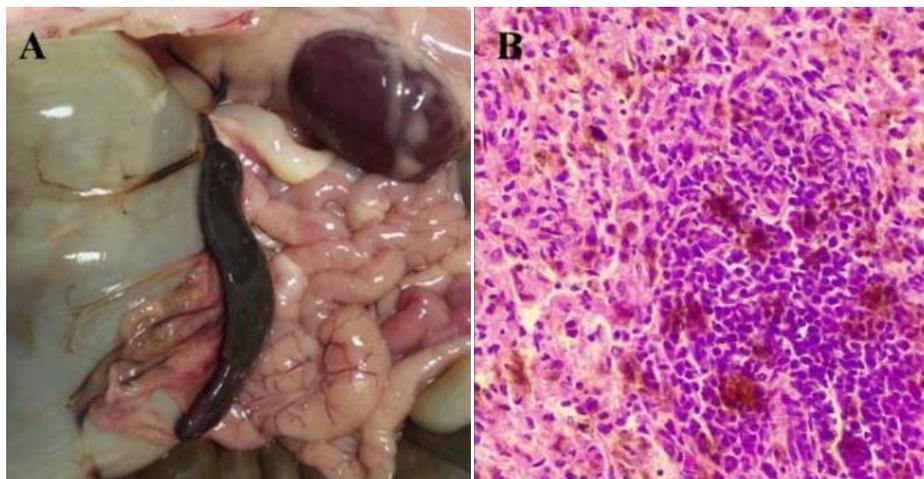


Figura 6. Imagen de la cavidad abdominal (A) donde se aprecia el incremento en el tamaño relativo del bazo. (B) Imagen microscópica del tejido esplénico en la que se observan signos de hemosiderosis. H&E. 20x

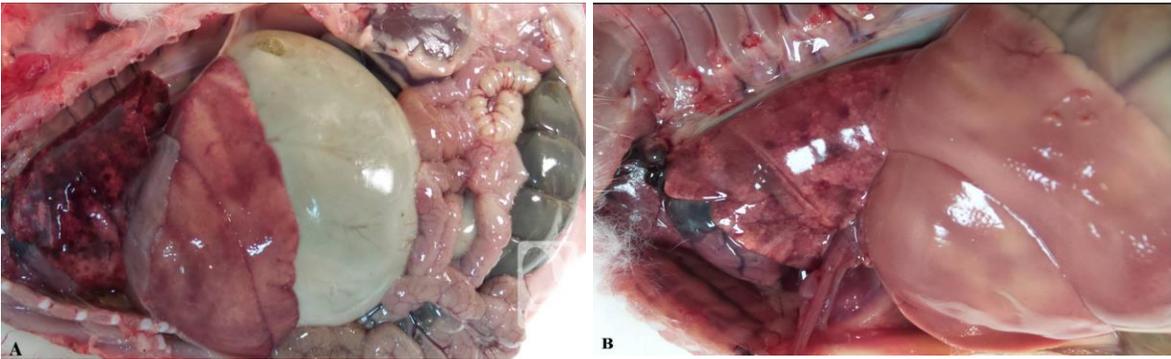


Figura 7. Imagen macroscópica de la cavidad celómica de un conejo infectado con RHDVb. (A) Se aprecia una intensa hepatomegalia asociada con una fuerte decoloración de la superficie hepática (áreas de necrosis). Los pulmones muestran una superficie de coloración oscura e irregular, con presencia de numerosas hemorragias en la superficie pleural. Presencia de abundante líquido ambarino libre en cavidad torácica. (B)

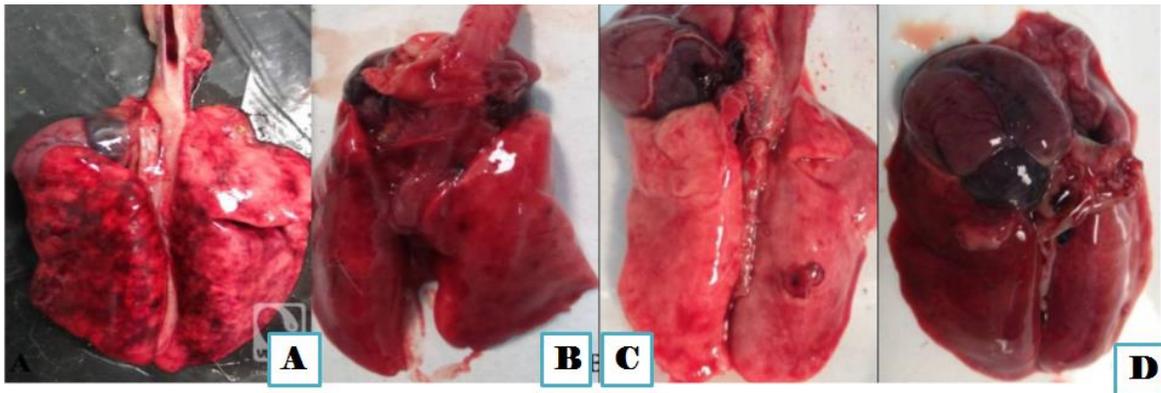
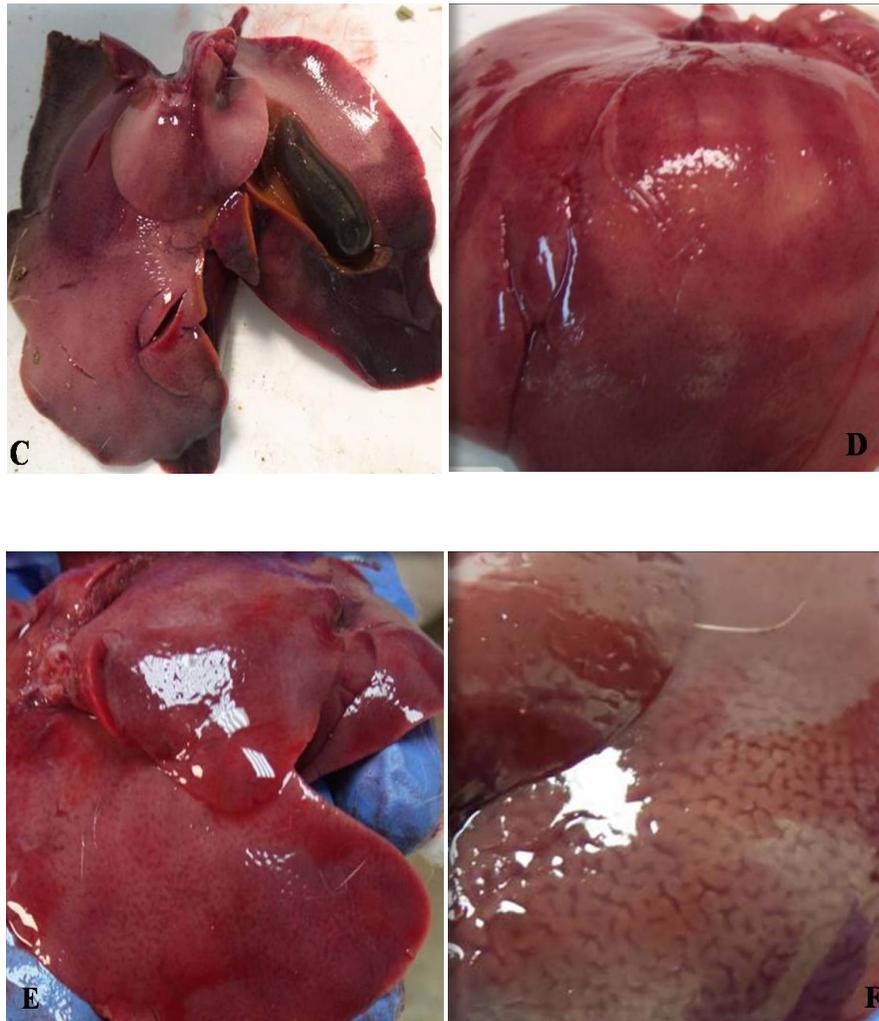


Figura 8. Imagen macroscópica de corazón y pulmones de 4 animales afectados por RHDVb. Se aprecia cómo los pulmones no aparecen colapsados (pulmón de shock). Imagen parcheada con coloración irregular de la superficie pulmonar (Figura A, C con presencia de abundantes focos de hemorragia.) Intensa congestión (B, D). El corazón muestra congestión vascular en todos los casos.





*Figura 9. Aspecto macroscópico del hígado de 4 animales infectados por el RHDVb. Se observa incremento de tamaño del órgano (A, B, D), textura friable (A, B), decoloración superficial difusa tanto en la cara parietal (A, B, D) como visceral (C) y patrón lobulillar marcado (E, F). Este hallazgo es recurrente en animales infectados por el virus.*

## 10. DIAGNÓSTICO

La infección por RHDV puede diagnosticarse mediante la detección de una respuesta de anticuerpos específica. Como la respuesta humoral tiene una gran importancia en la protección de los animales contra la RHD, la determinación del título específico de anticuerpos después de la vacunación o en animales convalecientes es predictivo de la capacidad de los conejos para resistir la infección por RHDV (OIE. 2012).

Se aplican tres técnicas básicas para el diagnóstico serológico de RHDV: inhibición de la hemaglutinación (HI), ELISA indirecto (I-ELISA) y C-ELISA. Cada uno de estos métodos tiene ventajas y desventajas. Con respecto a la disponibilidad de reactivos y la complejidad técnica de realizar la prueba, HI es el método más conveniente, seguido de I-ELISA y C-ELISA, respectivamente. Por otro lado, ambos ELISA son más rápidos y fáciles que el HI, particularmente cuando hay una gran cantidad de muestras. La especificidad del C-ELISA es notablemente más alta que las logradas con los otros dos métodos. Se ha descrito un método alternativo de C-ELISA para mejorar interpretación serológica y para clasificar correctamente el estado inmunológico de conejos, una combinación de ELISA. También están disponibles técnicas que distinguen las respuestas de anticuerpos IgA, IgM e IgG. Algunas otras pruebas adicionales podrían utilizarse para investigaciones y cuando se necesite un mayor nivel de sensibilidad para detectar anticuerpos en especies no objetivo, o anticuerpos inducidos por agentes de reacción cruzada de tipo RHDV.

Son:

- I-ELISA: el antígeno está unido a la fase sólida por un MAb específico de RHDV (1H8). Tiene un poco más alto sensibilidad que C-ELISA, lo que hace posible la medición de anticuerpos altamente reactivos cruzados 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 deformación del virus, los epítomos

internos están expuestos. Por lo tanto, detecta un espectro más amplio de anticuerpos y tiene alta sensibilidad y baja especificidad. Por estas razones, también se puede usar para serología EBHSV.

- Sandwich ELISA para detectar IgM e IgG en muestras de hígado o bazo ya examinadas con la prueba virológica: Dicha prueba es particularmente útil en aquellos animales que mueren por la forma "crónica" de la enfermedad, cuando la detección del virus puede ser difícil. En este caso, un nivel alto de IgM específica para RHDV y un nivel bajo, si lo hay, de IgG son los marcadores inequívocos de positividad para RHD (OIE. 2012).
- Ensayo inmunosorbente ligado a enzimas: La detección de virus por ELISA se basa en una técnica de "sandwich" y varias variaciones de esto han sido descritos. Este procedimiento utiliza los reactivos, soluciones, tiempos y temperatura que se utilizan en ELISA competitivo (C-ELISA), excepto que la concentración de 20 es doble (0.1% [v / v]). La microplaca utilizada debe ser de alta capacidad de adsorción (por ejemplo, Nunc Maxisorp inmunoplaqueta). El homogeneizado de hígado es una suspensión al 10% (p / v) en PBS estándar; 50 µl / pozo es el estándar volumen a usar en cada paso. El tampón de ELISA utilizado para todos los pasos es PBS con extracto de levadura al 1% (o bovino albúmina sérica [BSA]) y 20 al 0,1%, pH 7,4. Todos los pasos de incubación son de 50 a 60 minutos a 37 ° con agitación suave. Después de todos los pasos, se deben realizar tres lavados de 3 a 5 minutos usando PBS con 0.05% Tween 20. Se debe utilizar un homogenato de hígado de conejo RHD positivo y negativo como controles. El conjugado de peroxidasa (HRPO) podría purificarse IgG a partir de un suero policlonal específico o MAbs. Los MAb anti-RHDV se han producido en varios laboratorios y se pueden usar en lugar de conejos sueros policlonales. Los MAbs que reconocen epítopos específicos expresados solo por la variante RHDVa también fueron producido. Para caracterizar mejor la antigenicidad de los aislamientos de RHD mediante ELISA en sándwich, es aconsejable probar cada muestra en cuatro réplicas, y luego para usar cuatro conjugados HRPO diferentes, es decir,

dos MAb que reconocen el mismo determinante antigénico presente en la superficie del virus y expresado alternativamente por la cepa "clásica" o por la variante RHDVa, un suero policlonal hiperinmune anti-RHDV (que podría identificar potencial 'nuevo variante o calicivirus correlacionado, como EBHSV) y un grupo de MAb que reconocen epítomos internos que pueden detectar VLPs suaves y degradadas, así como EBHSV. Un ELISA de captura de antígeno alternativo describe el uso de un ovino anti-RHDV como anticuerpo de captura y un MAb para la detección de RHDV (Liu *et al.*, 2012 a, b).

- Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos: Varios han descrito la aplicación de RT-PCR para la detección de ácido nucleico específico de RHDV. Debido al bajo nivel de variación de secuencia entre RHDV aislados y la alta sensibilidad de la PCR, la transcripción inversa (RT) -PCR representa un diagnóstico rápido ideal prueba de RHD. Este método se lleva a cabo en muestras de órganos (óptimamente hígado), orina, heces y sueros utilizando diferentes cebadores oligonucleotídicos derivados de la región de la cápside del genoma RHDV (porción N-terminal). PCR en tiempo real basada en sonda Taqman (RT-qPCR) diseñada para la detección específica de cepas de RHDV2 que proporciona una respuesta de diagnóstico clara en menos de 3 h. (Duarte *et al.* 2015a; Niedzwiedzka-Rystwej *et al.*, 2012).
- Microscopio de electrones: La EM de tinción negativa se puede realizar utilizando el llamado "método de caída". Una rejilla recubierta de carbono se coloca sobre una gota de suspensión de órganos y se deja durante 5 minutos. Después eliminando el exceso de líquido con el borde de un trozo de papel de filtro roto, la rejilla se pone a flotar en una gota del 2% fosfotungstato de sodio (NaPT), pH 6,8, durante 1,5 minutos. El exceso de manchas se elimina y la rejilla finalmente se observado a  $\times 25,000$  aumentos (OIE. 2012). Para fines de diagnóstico y especialmente cuando otros métodos dan resultados dudosos, el mejor método EM es una técnica inmuno-EM (IEM). Este método utiliza un suero hiperinmune anti-RHDV,

obtenido de conejo u otras especies, o MAbs específicos, que se incuban con un volumen igual de la muestra durante 1 hora a 37 ° C antes de la ultracentrifugación. La reacción inmunológica induce la aglomeración de las partículas virales en agregados que son identificados rápida y fácilmente por EM. Los métodos de Immunogold también se pueden aplicar para mejorar Identificar viriones y proteínas virales. EBHSV también se puede identificar en muestras de diagnóstico mediante examen EM. Además, el método IEM usando se puede utilizar suero convaleciente anti-EBHSV o MAbs anti-EBHS específicos para identificar el EBHSV. Mediante el uso antisueros específicos para EBHSV y RHDV, es posible diferenciar entre los dos virus (OIE, 2012).

- Prueba de Hemaglutinación: PH fue la primera prueba que se usó para el diagnóstico de laboratorio de rutina de RHD. Debería ser realizado con glóbulos rojos (RBC) humanos del Grupo O, recién recolectados, almacenados durante la noche en solución de Alsever y se lavó en PBS al 0,85% a pH 6,5 (rango 6-7,2). PA es menos evidente o inexistente cuando los glóbulos rojos de otras especies se utilizan. Los glóbulos rojos lavados se suspenden al 0,75% en PBS. Una dilución doble del clarificado el sobrenadante de un 10% de tejido homogeneizado de hígado o bazo se incubaba con un volumen igual de lavado GR en una placa de microtitulación de fondo redondo sellada a, preferiblemente, 4 ° C. Después de 1 hora (rango de 20 minutos a 2 horas) de incubación, la aglutinación a una dilución de punto final > 1/160 se considera positiva. Los títulos inferiores deben considerarse sospechosos y deben verificarse utilizando otros métodos (OIE, 2012).

## 11. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Es difícil distinguir clínicamente la enfermedad hemorrágica de los conejos con otras enfermedades, por lo tanto, se debe de realizar siempre la confirmación del diagnóstico en un laboratorio oficial.

El virus de la enfermedad hemorrágica del conejo que pertenece al género *Lagovirus* también incluye la enfermedad del síndrome de la liebre marrón europea (EBHSV), ambas enfermedades comparten proximidad filogenética, así mismo como el grupo de *Calicivirus* del conejo no patógenos (RCV), que causa seroconversión asintomática en conejos y se considera un posible antepasado de RHDV. Recientemente se ha creado un nuevo calicivirus descrito, llamado el calicivirus de conejo de Michigan (MRCV), que causa infecciones subclínicas y cuyo genoma muestra un promedio similitud del 79% con RHDV. Sin embargo, más allá los estudios han cuestionado este hallazgo y han propuesto en su lugar que MRCV no es un nuevo calicivirus sino una nueva variante del grupo similar a RCV no patógeno (Merchan *et al.* 2011; OIE, 2012).

Tabla1. Cuadro diferencial de la enfermedad RHDV.

Enfermedades	Signos	Lesiones
Mixomatosis	Nódulos cutáneos, con inflamación alrededor de los ojos (enfermedad de la cabeza grande) y genitales, al mismo tiempo puede haber una inmunosupresión grave que permite la aparición de infecciones bacterianas secundarias, por lo que	La muerte por neumonía, caracteriza por la producción de tumores o mixomas, conjuntivitis y descarga ocular mucopurulenta (Pinheiro, 2016).

	son comunes los signos de neumonía. A medida que la enfermedad progresa, el animal aparece más decaído y Se ha señalado también una forma respiratoria de la enfermedad sin lesiones cutáneas.	
Enfermedad de la fiebre marrón	Anorexia, apatía ,ataxia, ictericia, respiratorios, pérdida de peso y letargia	Se observan hemorragias internas y externas, así como necrosis hepática debido a la degeneración de los hepatocitos.
Salmonelosis	Enteritis/diarrea, septicemia y abortos.	Se observan focos necróticos (muerte de las células) e inflamación crónica (granulomas) en el hígado, riñón, bazo y pulmones (OIE, 2018).
Enterotoxemias	Diarrea, timpanismo, presencia de moco no constantes	Dilatación del estómago, duodeno debido a la presencia de líquido y gas (OIE, 2018).
Coccidiosis	Diarreas, pérdida de peso.	Mortalidad y lesiones características en el hígado (OIE, 2018).

<p>MRCV (Michigan Rabbit Calicivirus)</p>	<p>Congestión conjuntival con descarga ocular, cianosis, apatía, diarrea, ataxia, vocalización y opistótonos</p>	<p>Petequias y equimosis orgánicas, así como hemorragias en pulmón, intestino y útero. El hígado aparece necrótico y la vesícula biliar puede presentar fibrosis periductal. (Suckow, 2012). El virus se detecta fundamentalmente en hígado (Abrantes, 2012).</p>
---	--	---

## 12. TRATAMIENTO

En la actualidad, no existe tratamiento médico para la enfermedad provocada por el RHDV y el RHDVb. En el caso de animales domésticos que se consideran mascotas, se ha descrito la posibilidad de aplicar un tratamiento de soporte, si bien las garantías de éxito son limitadas (Dalton *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2013). Debido al elevado coste y las escasas posibilidades de supervivencia, este tipo de tratamientos no se aplican en animales de producción. En casos de emergencia sanitaria, la vacunación de emergencia es la única medida aplicable.

### 13. CONTROL Y PREVENCIÓN

Asimismo, es fundamental la existencia de programas de vacunación adaptados a cada caso (tipo de sistema de explotación o animal de compañía) tanto frente al RHDV como frente al RHDVb (Boucher, 2015; Dalton *et al.* 2017). El desarrollo de vacunas comerciales eficientes que protegen totalmente contra la enfermedad ha permitido su control en conejos (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013; Leuthold *et al.*, 2014). Las autoridades sanitarias podrán elaborar el protocolo vacunal más conveniente para cada región (OIE, 2015). Algunos estudios recomiendan sólo la vacunación de animales cuyo estado sanitario es conocido, puesto que la aplicación generalizada de vacunas no ofrece ventajas sobre la supervivencia de los animales (Calvete, 2004; Rouco, 2016).

El uso de un agente de biocontrol viral para una especie de vertebrado ha sido y sigue siendo controvertido, pero hay pocas dudas de que, desde su lanzamiento, el RHDV ha generado cerca de \$ 6 mil millones en ahorros para la industria agrícola australiana, así como algunos muy necesarios (Jahnke *et al.* ,2010).

Australia es única en su uso de patógenos virales como agentes de biocontrol, y es crítico medir la capacidad evolutiva de estos patógenos como un indicador de su efectividad a largo plazo y su carrera armamentista coevolutiva con el huésped conejo. Tanto MYXV como RHDV han suprimido significativamente el número de conejos durante largos períodos de tiempo y han proporcionado beneficios agrícolas combinados estimados en AUD70 mil millones (Cooke *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de estas medidas de control combinadas, la pérdida excedente anual para Australia debido a los conejos se calcula en AUS206 millones (Kovaliski *et al.* 2014).

En México está prohibida la vacunación contra la Enfermedad Hemorrágica del Conejo (OIE, 2018).

## 15. BIOSEGURIDAD

Después de un brote de RHD, incluso si se adoptan medidas estrictas de higiene y sanitarias, incluida la limpieza y desinfección, eliminación segura de los cadáveres y un intervalo antes de la reposición, se recomienda encarecidamente vacunar animales de carne a la edad de 40 días, porque la incidencia de reinfección es muy alta. Solo después en varios ciclos de producción es aconsejable detener la vacunación de los animales de carne. Para verificar la persistencia de RHD infeccioso dentro de la unidad, un número variable de conejos, comenzando con un pequeño grupo centinela, no debe ser vacunado. En algunas situaciones en particular, puede incluirse estrategias de emergencia, se aplica cuando se produce RHD en aquellas granjas que tienen cobertizos separados y donde hay buenas medidas de bioseguridad regularmente aplicadas. De hecho, mejores resultados limitan la difusión de la enfermedad y reducen las pérdidas económicas, podría obtenerse mediante el uso de la seroterapia a través de la administración parenteral de anti-RHDV hiperinmune, que produce una protección rápida, pero de corta duración, contra la infección por RHDV. (OIE, 2012).

## 16. SITUACION ACTUAL DE LA ENFERMEDAD EN MEXICO

Derivado de la vigilancia epidemiológica que realiza el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), en puntos de contacto y a través de la aplicación "AVISE", se notificó de forma inmediata por ser una enfermedad de la lista de la OIE, el día 3 de abril del 2020, 30 conejos adultos de traspatio en el municipio de Nuevo Casa Grandes, Chihuahua, con fines para la reproducción y pie de cría la presencia de signos clínicos sugerentes a la enfermedad (disnea y hemorragia nasal) y mortalidad súbita, atendiendo a esto se hizo la prueba de hemoaglutinación (HA) y técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) reportando resultados positivos a la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos, por parte del laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 del SENASICA el día 8 de abril del 2020. México es libre de la enfermedad desde 1992, por lo que el SENASICA derivado de este foco realiza las labores contra epidémicas necesarias para evitar su dispersión por el territorio nacional, tras su notificación se implementaron a cabo las siguientes medidas:

- El predio fue despoblado en su totalidad y se realizó una limpieza y desinfección de las instalaciones, equipos o instrumentos que hayan estado en contacto con los conejos infectados.
- Eliminación oficial de canales, subproductos y desechos de origen animal.
- Sacrificio sanitario
- Cuarentena
- Se realizó la vigilancia dentro de la zona de contención o zona de protección.
- La vacunación fue prohibida y ningún tratamiento para los animales afectados.

Y como medida a implementar será la vigilancia fuera de la zona de contención o de protección (OIE, 2020 a, b).

## 17. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrantes, J., Van der Loo, W., Le Pendu, J. y Esteves, P. J. 2012. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Veterinary Research*. 43:12. pp. 1-19.
2. Alda F, Gaitero T, Suárez M, Doadrio I. 2009. Molecular characterisation and recent evolution of myxoma virus in Spain. *Arch Virol* 154. pp.1659–1670.
3. Alda F, Gaitero T, Suárez M, Merchán T, Rocha G, Doadrio I. 2010. Evolutionary history and molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the Iberian Peninsula and Western Europe. *BMC. Evol Biol*. 10. pp.347.
4. Angermann R. 1990. Overview of the lagomorphs. Rabbits, hares and pikas. Status survey and conservation plan. IUCN/SSC.
5. Asociación de Seleccionadores y Multiplicadores Cunicolas de España (ASEMUCE). 2015. Historia, caracterización y situación actual del conejo Antiguo Pardo Español.
6. Asociación Nacional de Cunicultores de México (ANCUM). 2010. Prospectiva. <http://www.ancum.org.mx/prospectiva.html>.
7. Boucher, S., Rubeaux, D., Le Gall-recule, G., Rigaudeau, A. 2015. Cartographie des cas de VHD à RHDV2 (virus variant 2010) à partir des virus isolés depuis 2010 de lapins domestiques en France métropolitaine, sur l'île de la Réunion et en Espagne à l'aide d'une technique de RT-PCR temps réel. 16èmes Journées de la Recherche Cunicole. pp. 1-4.
8. Branco, M., Ferrand, N., Monnerot, M. 2000. Phylogeography of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in the Iberian Peninsula inferred from RFLP analysis of the cytochrome b gene. *Heredity*. 85. pp. 307–317.
9. Branco, M, Monnerot, M, Ferrand, N, Templeton A.R. 2002. Postglacial dispersal of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) on the Iberian peninsula reconstructed from nested clade and mismatch analyses of mitochondrial DNA genetic variation. *Evolution* 56. pp.792–803.

10. Cabezas, S., Calvete, C. y Moreno, S. 2011. Survival of translocated wild rabbits: importance of habitat, physiological and immune condition. *Animal Conservation*. 14. pp. 665–675.
11. Calvete C, Estrada R, Lucientes J, Osacar JJ, Villafuerte R. 2004. Effects of vaccination against viral haemorrhagic disease and myxomatosis on long-term mortality rates of European wild rabbits. *Vet Rec*. 155 (13). pp. 388-92.
12. Calvete, C., Mendoza, M., Alcaraz, A., Sarto, M. P., María, P. Jiménez, de B. M. P., Calvo, J. A., Monroy, F., Calvo, H. J. 2018. Rabbit haemorrhagic disease: cross-protection and comparative pathogenicity of GI.2/RHDV2/b and GI.1b/RHDV lagoviruses in a challenge trial. *VETMIC*. 18. pp. 30-109.
13. Calvete, C., Mendoza, M., Sarto, M. P., De Bagüe, M. P. J., Lujan, L., Molin, J., Calvo, A. J., Monroy, F. y Calvo, J.H. 2019. Detection of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus GI.2/RHDV2/b in the Mediterranean Pine Vole (*Microtus duodecimcostatus*) and WhiteToothed Shrew (*Crocidura russula*). *Journal of Wildlife Diseases*. 55:2. pp. 467–472.
14. Calvete, C., Sarto, P., Calvo, A.J., Monroy, F., Calvo, J.H. 2014. Could the new rabbit haemorrhagic disease virus variant (RHDVb) be fully replacing classical RHD strains in the Iberian Peninsula? *World Rabbit Sci*. 22: pp. 91-91.
15. Camarda, A., Pugliese, N., Cavadini, P., Circella, E., Capucci, L., Caroli, A., Legretto, M., Mallia, E., Lavazza, A. 2014. Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Italian hare (*Lepus corsicanus*). *Research in Veterinary Science*. 97. pp. 642–645.
16. Camps, J. 1994. Lugar de origen del conejo. *Cunicultura*. 108:74-78.
17. Capucci, L., Cavadini, P., Schiavitto, M., Lombardi, G., Lavazza, A. 2017. Increased pathogenicity in rabbit haemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2). *Veterinary Record*. 10. pp. 1-2.
18. Chasey D, Lucas M, Bishop C. 1994. Rabbit haemorrhagic disease. *Vet Rec* 134 (5). pp.123.

19. Chen, M., Songa, Y., Fana, Z., Jiang, P., Hua, B., Xuea, J., Wei, H., Wang, F. 2014. Immunogenicity of different recombinant rabbit hemorrhagic diseasevirus-like particles carrying CD8+ T cell epitope from chickenovalbumin (OVA). *Virus Research*. 183. pp. 15–22.
20. Cheng, Y., Chen, Z., Li, C., Meng, C., Wu, R., Liu, G. 2013. Protective immune responses in rabbits induced by a suicidal DNA vaccine of the VP60 gene of rabbit hemorrhagic disease virus. *Antiviral Research* 97 227–231.
21. Cooke, B., Chudleigh, P., Simpson, S., Saunders, G. 2013. The economic benefits of the biological control of rabbits in Australia, 1950–2011. *Australian Economic History Review*. 53. pp. 91–107.
22. Dalton K. P., Abrantes J., Lopes A. M., Nicieza I., Álvarez A. L., Esteves P. J., Parra F. 2015. Complete genome sequence of two rabbit hemorrhagic disease virus variant b isolates detected on the Iberian Peninsula. *Arch Virol*. 160. pp. 877–881.
23. Dalton, K. P., Nicieza, I., Abrantes, J., Esteves, P. J., Parra, F. 2014. Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula. *Veterinary Microbiology*. 169. pp.67–73
24. Dalton, K. P., Nicieza, I., Podadera, A., de Llano, D., Alonso J. M. M., de los Toyos, J. R., Garcia, O. M., Vazquez-Villa, F., Velasco, B., Landeta, O., Parra, F. 2017. *Transbound Emerg Dis*. 10. 1–3.
25. Dalton, K.P., Nicieza, I., Balseiro, A., Muguera, M. A., Rosell, J. M., Casais, R., Álvarez, A. L., y Parra, F. 2012. Variant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus in Young Rabbits, Spain. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 18 No. 12. pp. 2009-2012.
26. Delibes-Mateos, M., Ferreira, C., Carro, F., Escudero, M. A. y Gortáza, C. 2014. Ecosystem Effects of Variant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus, Iberian Peninsula. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 20. No. 12. pp. 2166-2168.
27. DeSheng, K., HuaiRan, L., JiaSen, L., Zuo, Y., Qian, J., DongChun G., XiaoLiang H., FengJie W., QianQian H., LianDong, Q. 2015. Identification

- of two novel rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) B cell epitopes and evaluation of its immunoprotection against RHDV. *Microbiol Biotechnol.* pp. 1-16.
- 28.** Du NX. 1991. Molecular biology of the viral haemorrhagic disease virus of rabbits. *Rev Sci Tech* 10 (2). pp. 325-36.
- 29.** Duarte, D. M., Carvalho, C. L., Silvia, C. Barrosa S. C., Henriquesa, A. M., Ramosa F., Fagulhaa T., Luísa T., Duarte E. L., Fevereiro, M. A. 2015. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *Journal of Virological Methods.* pp.1-6 (a).
- 30.** Duarte, D. M., Henriques M. A., Barros S., Luís T., Fagulha, T., Ramos F., Fevereiro, M. 2014. New insight into the epidemiology of rabbit hemorrhagic disease viruses in Portugal: Retrospective study reveals the circulation of genogroup 5 (G5) in Azores and discloses the circulation of G1 and G6 strains in mainland until 2008. *Infection, Genetics and Evolution.* 27. pp. 149–155.
- 31.** Duarte, M., Carvalho, C., Barros, S. V., Benevides, S., Flor, L. Monteiro, M., Marques I., Henriques M., Sílvia, C. B. Fagulha, T., Ramos F., Luís T., Fevereiro, M., y Bernardo, S. 2015. Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) outbreak in Azores: disclosure of common genetic markers and phylogenetic segregation within the European strains. 24. pp. 1-23 (b).
- 32.** Duarte, M., Henriques, M., Barros, S. C., Fagulha, T., Barros, S.V. y Ramosm F., Luísm, T., Fevereiromm, M., Varvalhom, C., Benevidesm, S., Florm, L. y Bernardom, S. 2015. Detection of RHDV variant 2 in domestic rabbits in Azores. *Veterinary Record.* Vol. 176. pp. 499-500. (c).
- 33.** Edenm, J. H., Readm, A. J., Duckworthm, J. A., Strivem, T., Holmesam, E. C. 2015. Resolving the Origin of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus: Insights from an Investigation of the Viral Stocks Released in Australia. *Journal of virology.* Vol.89. No. 23. Pp. 12217- 12220. (A)
- 34.** Edenm, J-S., Kovaliskic, J., Duckworthc, J. A., Swaina, G., Mahara, J. E., Strivec, T., Holmesa, E.C. 2015. Comparative phylodynamics of rabbit

- haemorrhagic disease virus (RHDV) in Australia and New Zealand. *J. Virol.* 247. pp. 1-34. (B)
35. Esteves, P. J., Abrantes, J., Bertagnoli, S., Cavadini, P., Gavier-Widén, D., Jean-Sébastien, G., Lavazza, A., Lemaitre, E., Letty, J., Lopes, A.M., Neimanis, A.S., Ruvoën-Clouet, N., Pendu, J.L., Marchandeu, S., Le Gall-Reculé, G. 2015. Emergence of Pathogenicity in Lagoviruses: Evolution from Pre-existing Nonpathogenic Strains or through a Species Jump?. *Plos Pathogens.* 11 (11). pp. 1-8.
  36. Esteves, P. J., Lopes, A. M., Magalhães, M.J., Pinheiro, A., Gonçalves, D. y Abrantes, J. 2014. Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Detected in Pico, Azores, Portugal, Revealed a Unique Endemic Strain with More Than 17 Years of Independent Evolution. *Viruses.* 6. pp. 2698-2707.
  37. Fernández, E., Toledo, J. R., Chionga, M., Parra, F., Rodríguez, E., Montero, C., Méndez, L., Capucci, L., Farnós, O. 2011. Single dose adenovirus vectored vaccine induces a potent and long-lasting immune response against rabbit hemorrhagic disease virus after parenteral or mucosal administration. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 142. pp. 179– 188.
  38. Fernández, E., Toledo, J. R., Méndez, L., Gonzalez, N., Parra, F., Martín-Alonso, J. M., Limonta, M., Sánchez, K., Cabrales, A., Estrada, M. P., Rodríguez-Mallon, A., Farnos, O. 2013. Conformational and Thermal Stability Improvements for the Large-Scale Production of Yeast-Derived Rabbit Hemorrhagic Disease Virus-Like Particles as Multipurpose Vaccine. *Vol. 8: 2.* pp. 1-16.
  39. Fox, R. R. 1979. "Genetics of the rabbit". *Proceedings World Lagomorph Conference.* Guelph. 9-15.
  40. Gamboa, R.C. 2001. Estudio de mercado de la carne de conejo en el municipio de Texcoco. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Moentecillo, Texcoco, México. 143 p.
  41. Gao, J., Meng, C., Chen, Z., Li, C., Liu, G. 2013. Codon optimization of the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) capsid gene leads to increased

- gene expression in *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) cells. *J. Vet. Sci.* 14(4). pp. 441-447.
- 42.** Gay, G. J. 2015. Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC) su Erradicación en México. SAGARPA. 1-130.
- 43.** González R. 2016. La importancia de las razas autóctonas en la moderna cunicultura.(17/04/2020).(http://axoncomunicacion.net/news/new/IdNew/349/Option/3.%20).
- 44.** Gould, E.A. 2012. First case of rabbit haemorrhagic disease in Canada: contaminated flying insect, vs. long-term infection hypothesis. *Molecular Ecology*. Vol. 21. pp. 1042–1047.
- 45.** Hall, R. N., Mahar, J. E., Haboury, S., Stevens, V., Holmes, E. C., Strive, T. 2015. Emerging Rabbit Hemorrhagic Disease Virus 2 (RHDVb), Australia. *Letters*. Vol. 21, No. 12. pp. 2276-2278.
- 46.** Hall, R. N., Peacock, D. E., Kovaliski, J., Mahar, J. E., Mourant, R., Piper, M., Strive, T. 2016. Detection of RHDV2 in European brown hares (*Lepus europaeus*) in Australia. *Veterinary Record*.4. pp. 1-2.
- 47.** Hoffman RS. 1993. Order Lagomorpha. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Smithsonian Institution Press, Washington.
- 48.** Hu, B., Wang, F., Fan, Z., Song, Y., Abrantes, J., Zuo, Y., Esteves, P. J. 2016 Recombination between G2 and G6 strains of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) in China. *Arch Virol*. 6. pp. 1-4.
- 49.** Hu, Z., Tian, X., Zhai, Y., Xu, W., Zheng, D., Sun, F. 2010. Cryo-electron microscopy reconstructions of two types of wild rabbit hemorrhagic disease viruses characterized the structural features of Lagovirus. *Protein & Cell*, 1(1). pp. 48–58.
- 50.** Hukowska-Szematowicz, B., Tokarz-Deptuła, B., Deptuła, W. 2013. Analysis of genetic variability and phylogenetic analysis of selected Czech and French strains of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *J Appl Genetics* 54. pp. 235–248.

51. Jahnke, M., Holmes, E. C., Kerr, P. J., Wright, J. D., y Strive, T. 2010. Evolution and Phylogeography of the Nonpathogenic Calicivirus RCV-A1 in Wild Rabbits in Australia. *Journal of Virology*. 10. pp. 12397–12404.
52. Kinnear, M. y Linde, C. C. 2010. Capsid gene divergence in rabbit hemorrhagic disease virus. *Journal of General Virology*. 91. pp. 174–181.
53. Kovaliski, J., Sinclair, R., Mutze, G., Peacock, D., Strive, T., Abrantes, J., Esteves, P.J. y Holmes, E. C. 2014. Molecular epidemiology of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus in Australia: when one became many. *Molecular Ecology*. Vol. 23. pp. 408–420.
54. Lavazza, A., Cavadini, P., Barbieri, I., Tizzani, P., Pinheiro A., Abrantes, J. Esteves, P. J., Grilli, G., Gioia, E., Zanoni, M., Meneguz, P. G., Guitton, J-G., Marchandeu, S., Chiari, M. y Capucci, L. 2015. Field and experimental data indicate that the eastern cottontail (*Sylvilagus floridanus*) is susceptible to infection with European brown hare syndrome (EBHS) virus and not with rabbit haemorrhagic disease (RHD) virus. *Veterinary Research*. Vol. 4. pp. 1-10.
55. Le Gall-Reculé, G., Lavazza, A., Marchandeu, S., Bertagnoli, S., Zwingelstein, F., Cavadini, P., Martinelli, N., Lombardi, G, Guérin, J-L., Lemaitre, E., Decors, A., Boucher, S., Normand, L. y Capucci, L. 2013. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Veterinary Research*. Vol. 44:81. pp. 1-13.
56. Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Boucher, S., Le Normand, B., Plassiart, G., Portejoie, Y., Decors, A., Bertagnoli, S., Guérin, J-L. y Marchandeu, S. 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Veterinary Record*. Vol. 168. pp. 137-138. (a)
57. Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Fages, M-P., Bertagnoli, S., Gelfi, J., Aubineau, J., Roobrouck, A., Botti, G., Lavazza, A., Marchandeu, S. 2011. Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV. *Virology*. Vol. 410. pp. 395–402. (b)

58. Leuthold, M. M., Dalton, K. P., Hansmana, G. S. 2014. Structural Analysis of a Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Binding to Histo-Blood Group Antigens. *Journal of Virology*. Vol. 89 Num. 4. pp. 2378-2387.
59. Li, Z. X., Hu, W. D., Li, B. C., Tian, L. Y., Zhou, X. Y., Zhang, Z. 2014. Egg yolk IgY against RHDV capsid protein VP60 promotes rabbit defense against RHDV infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 157. pp. 97– 104.
60. Liu, S.J., Xue, H.P., Pu, B.Q., Qian, N.H., 1984. A new viral disease in rabbits. *J. Vet. Diagn. Invest.* [in Chinese] 16, 253–255.
61. Liu, J., Fordham, D. A., Cooke, B. D., Cox, T., Mutze, G., Strive, T. 2014. Distribution and Prevalence of the Australian Non-Pathogenic Rabbit Calicivirus Is Correlated with Rainfall and Temperature. *PLOS ONE*. 9 (12). pp. 1-15.
62. Liu, J., Kerr J. P., Strive, T. 2012. A sensitive and specific blocking ELISA for the detection of rabbit calicivirus RCV-A1 antibodies. *Virology Journal*. 9 (182). pp. 1-5 (a).
63. Liu, J., Kerr, P. J., Wright J. D., Strive T. 2012. Serological assays to discriminate rabbit haemorrhagic disease virus from Australian non-pathogenic rabbit calicivirus. *Veterinary Microbiology*. 157. pp. 345-354 (b).
64. Liu, X., Hu, B., Wang, F., Song, Y., Fan, Z., Wei, H., Qiu, R., Xu, W. 2016. Molecular cloning of the rabbit interleukin 6 promoter: Functional characterization of rabbit hemorrhagic disease virus response elements in RK-13 cells. *Developmental and Comparative Immunology*. 65. pp. 280-288.
65. Lopes, A. M., Correira, J., Abrantes, J., Melo, P., Ramada, M., Magalhaes, M. J., Alves, P.C., Esteves, P. J. 2015. Is the New Variant RHDV Replacing Genogroup 1 in Portuguese Wild Rabbit Populations? *Viruses*. 7 (1). pp. 27-36. (a)
66. Lopes, A. M., Dalton K. P., Magalhães M. J., Parra, F., Esteves, P. J., Holmes, E. C., Abrantes, J. 2015. Full genomic analysis of new variant

- Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDVb) revealed multiple recombination events. *Journal of General Virology*. 96 (6). pp. 1-29. (b)
- 67.** Lopes, A. M., Magalhaes, M. J., Alves, P. C., Esteves, P. J., Abrantes, J. 2017. An update on the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) strains circulating in Portugal in the 1990s: earliest detection of G3-G5 and G6. *Archives of Virology*. 162. pp. 2061-2065.
- 68.** Lopes, A. M., Marques, S., Silvia, E., Magalhaes, M. J., Pinheiro, A., Alves, P. C., Pendu, J. L., Esteves, P. J., Thompson G., Abrantes, J. 2014. Detection of RHDV strains in the Iberian hare (*Lepus granatensis*): earliest evidence of rabbit lagovirus cross-species infection. *Veterinary Research*. 45 (94). pp. 1-7.
- 69.** Lopez-Martinez N. 2008. The lagomorph fossil record and the origin of the European rabbit. *Lagomorph Biology: Evolution, Ecology, and Conservation*. Springer-Verlag, Berlin.
- 70.** Mahar, J. E., Nicholson, L., Eden, J-S., Duchene, S., Kerr, P. J., Duckworth, J., Ward, V. K., Holmes, E. C., Strive, T. 2016. Benign Rabbit Caliciviruses Exhibit Similar Evolutionary Dynamics to their Virulent Relatives. *Journal of Virology*.
- 71.** Marques, R. M., Costa-e-Silvia, A., Aguas, A. P., Teixeira, L., Ferreira, P. G. 2010. Early acute depletion of lymphocytes in calicivirus-infected adult rabbits. *Vet Res Commun*. 34 (8). pp. 659-668.
- 72.** Marques, R. M., Costa-e-Silvia, A., Aguas, L.P., Teixeira, L., Ferreira, P.G. 2012. Early inflammatory response of young rabbits attending natural resistance to calicivirus (RHDV) infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 150. pp. 181-188.
- 73.** Marques, R. M., Teixeira, L., Aguas, A. P., Ribeiro, J. C., Costa-e-Silvia, A., Ferreira, P. G. 2014. Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD). *Veterinary Research*. 45 (14). pp. 1-6
- 74.** Martin-Alonso, A., Martin-Carrillo, N., Garcia-Livia, K., Valladares, B., Foronda, P. 2016. Emerging rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2)

- at the gates of the African continent. *Infection, Genetics and Evolution*. 44. pp. 46-50.
- 75.** Meng J, Wyss AR. 2005. Glires (Lagomorpha, Rodentia). The Rise of Placental Mammals: Origins and Relationships of the Major Extant Clades. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- 76.** Merchan, T., Rocha, G., Alda, F., Silvia, E., Thompson, G., Hidalgo de Trucio, S., Pages, A. 2011. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in nonspecific vertebrate hosts sympatric to the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Infection, Genetics and Evolution*. 11. pp. 1469-1474.
- 77.** Ministerio de agricultura, pesca y alimentación (MAPA). 2019. El sector cunícola español en 2018: principales magnitudes e indicadores económicos. (mar2020) <http://publicacionesoficiales.boe.es/>
- 78.** Moreno, N., Mena, I., Angulo, I., Gómez, Y., Crisci, E., Montoya, M., Caston, J. R., Blanco, E., Barquera, J. 2016. Rabbit hemorrhagic disease virus capsid, a versatile platform for foreign B-cell epitope display inducing protective humoral immune responses. *Scientific Reports*. 6 (31844). pp. 1-14.
- 79.** Moss S.R., Turner S.L., Trout R.C., White P.J., Hudson P.J., Desai A., Armesto M., Forrester N.L., Gould, E.A. 2002. Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus. *J Gen Virol* 83 (Pt 10). pp. 2461-7.
- 80.** Niedzwiedzka-Rystwej, P., Deptuła, W. 2012. Apoptosis of peripheral blood leukocytes from rabbits infected with non-haemagglutinating strains of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 149. pp. 54-57.
- 81.** Nyström, K., Abrantes, J., Lopes, A. M., Le MoullacVaidye, B., Marchandeau, S., Rocher, J., Ruvoën-Clouet, N., Esteves, P. J., Pendu, J.L. 2015. Neofunctionalization of the Sec1  $\alpha$ 1, 2fucosyltransferase Parologue in Leporids Contributes to Glycan Polymorphism and Resistance to Rabbit Hemorrhagic Disease Virus. *Plos Pathogens*. 11 (4). pp. 1-25.

- 82.** Nystrom, K., Le Gall-Recule. G., Grassi, P., Abrantes, J., Ruvoe'n-Clouet, N., Le Moullac-Vaidye, B., Lopes, A. M., Esteves, P. J., Strive, T., Marchandea, S., Dell, A., Haslam, S.M., Pendu, J.L. 2011. Histo-Blood Group Antigens Act as Attachment Factors of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Infection in a Virus Strain-Dependent Manner. *Plos Pathogens*. 7 (8). pp. 1-23.
- 83.** OIE. 2012. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). 2. SEVENTH EDITION. pp. 941-957
- 84.** OIE. 2015. Technical Disease Cards. Rabbit Haemorrhagic Disease, (FEB, 2020).  
([http://web.oie.int/eng/maladies/Technical%20disease%20cards/RHD\\_FINAL.pdf](http://web.oie.int/eng/maladies/Technical%20disease%20cards/RHD_FINAL.pdf)).
- 85.** OIE. 2016. Terrestrial Manual. Chapter 2.6.2 Rabbit Hemorrhagic Disease, (FEB,2020).([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.06.02\\_RHD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.06.02_RHD.pdf)).
- 86.** OIE. 2018. Auto-declaración de México como país históricamente libre de la enfermedad hemorrágica del conejo. (10/04/2020).  
[https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/Self-declarations/ESP\\_Mexico\\_selfdec\\_EHC\\_Nov2018.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Self-declarations/ESP_Mexico_selfdec_EHC_Nov2018.pdf).
- 87.** OIE. 2020. Rabbit haemorrhagic disease, Mexico. (10/04/2020).  
([https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=33957\(a\)](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=33957(a))).
- 88.** OIE. 2020. Technical Disease Card for RHD. (15/04/2020).  
[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/Disease\\_cards/RHD.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/RHD.pdf) (b).
- 89.** Parra, F., Prieto, M. 1990. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of the lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol*. 64 (8): pp. 4013-5.
- 90.** Pinheiro A, Neves F, Lemos de Matos A, Abrantes J, van der Loo W, Mage R, Esteves PJ. 2016. An overview of the lagomorph immune system and its genetic diversity. *Immunogenetics* 68 (2). pp. 83-107.

91. Puggioni, G., Cavadini, P., Maestrale, C., Scivoli, R., Botti, G., Ligios, C., Gall-Reculé, G.L., Lavazza, A., Capucci, L. 2013. The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Veterinary Research*. 44 (96). pp. 1-7.
92. Rocha, G., Alda, F., Pages, A., Merchan, T. 2017. Experimental transmission of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDVa) from rabbit to wild mice (*Mus spretus* and *Apodemus sylvaticus*) under laboratory conditions. *Infection, Genetics and Evolution*. 47. pp. 94-98.
93. Rohayem, J., Bergmann, M., Gebhardt, J., Gould, E., Tucker, P., Mattevi, A., Unge, T., Hilgenfeld, R., Neyts, J. 2010. Antiviral strategies to control calicivirus infections. *Antiviral Research*. 87. pp. 162-178.
94. Rosell, J. M., Fuente, L. F. 2016. Causes of mortality in breeding rabbits. *Preventive Veterinary Medicine*. 127. pp. 56-63.
95. Rouco, C., Moreno, S., Santoro, S. 2016. A case of low success of blind vaccination campaigns against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease on survival of adult European wild rabbits. *Preventive Veterinary Medicine*. 133. pp. 108-113.
96. Selleri, P., Girolamo, N. D., Vogtlin, A., Fileccia, I., Hoop, R., Bongiovanni. 2014. Cutaneous lesions in pet rabbits following subcutaneous administration of a novel bivalent vaccine against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. *Vet Dermatol*. 25 (6). pp. 563-e100.
97. SENASICA. 2015. Manual de Buenas Prácticas de Producción de Carne de Conejo. Primera Edición. México DF. 64p.
98. Simpson, V., Everest, D., Westcott, D. 2014. RHDV variant 2 and *Capillaria hepatica* infection in rabbits. *Veterinary Record*. 174 (19). pp. 486.
99. Strive, T., Elsworth P., Lui, J., Wright, J.D., Kovaliski, J., Capucci, L. 2013. The non-pathogenic Australian rabbit calicivirus RCV-A1 provides temporal and partial cross protection to lethal Rabbit Haemorrhagic Disease Virus infection which is not dependent on antibody titres. *Veterinary Research*. 44 (51). pp. 1-11.

100. 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.
101. Strive, T., Wright, J., Kovaliski, J., Botti, G., Capucci, L. 2010. The non-pathogenic Australian lagovirus RCV-A1 causes a prolonged infection and elicits partial cross-protection to rabbit haemorrhagic disease virus. *Virology*. 398. pp. 125-134.
102. Suckenow Y, Jin C, Zhan F, Wang X, Liang M, Zhang Q, Ding S, Guan X, Huo X, Li C, Qu J, Wang Q, Zhang S, Zhang Y, Wang S, Xu A, Bi Z, Li D. 2012. Host cytokine storm is associated with disease severity of severe fever with thrombocytopenia syndrome. *J. Infect. Dis.* 206(7). pp. 1085-94.
103. Suckow M. A., Stevens A. K. Wilson R. P. 2012. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. Edit. 1 pp. 978.
104. Teixeira, L., Marques, R.M., Águas, A. R., Ferreira, P.G. 2012. Regulatory T cells are decreased in acute RHDV lethal infection of adult rabbits. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 148. pp. 343-347.
105. Trzeciak-Rydzek A, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. 2015. The importance of liver lesions and changes to biochemical and coagulation factors in the pathogenesis of RHD. *Acta Biochim Pol* 62 (2). pp.169-71.
106. Trzeciak-Rydzek, A., Tokarz-Deptuła, B., Deptuła, W. 2016. Expression of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10, TNF- $\beta$  and GM-CSF in peripheral blood leukocytes of rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Veterinary Microbiology*. 186. pp. 71-81.
107. Tung, T., Phalen, D., Toribio, J-ALML. 2015. Adverse reactions in a population of Sydney pet rabbits vaccinated against rabbit calicivirus. *Australian Veterinary Journal*. 93 (11). pp. 405-411.
108. Wang, X., Qiu, L., Hao, H., Zhang, W., Fu, X., Zhang, H., He, S., Zhang, S., Du, E., Yang, Z. 2012. Adenovirus-based oral vaccine for rabbit hemorrhagic disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 145. pp. 277-282.

109. Wang X, Xu F, Liu J, Gao B, Liu Y, Zhai Y, Ma J, Zhang K, Baker TS, Schulten K, Zheng D, Pang H, Sun F. 2013. Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography. *PLoS Pathog* 9 (1). pp. e1003132.
110. Westcott, D. G., Choudhury, B. 2014. Rabbit haemorrhagic disease virus 2-like variant in Great Britain. *Veterinary Record*. 176 (3). pp. 1-4.
111. Westcott, D. G., Choudhury, B. 2015. Update on rabbit haemorrhagic disease virus 2-like variant in Great Britain. *Veterinary Record*. 178 (26). pp. 662-663.
112. Yang, D-K., Kim, H-H., Nah, J-J., Song, J-Y. 2015. Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Variant Recombinant VP60 Protein Induces Protective Immunogenicity. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25 (11). pp. 1960-1965.
113. Yuan, D., Qu, L., Liu, J., Guo, D., Jiang, Q., Lin, H., Si, C. 2013. DNA vaccination with a gene encoding VP60 elicited protective immunity against rabbit hemorrhagic disease virus. *Veterinary Microbiology*. 164. pp. 1-8.
114. Zheng, X., Wang, S., Zhang, W., Liu, X., Yi, Y., Yang, S., Xia, X., Li, Y., Zhang, Z. 2016. Development of a VLP-based vaccine in silkworm pupae against rabbit hemorrhagic disease virus. *International Immunopharmacology*. 40. pp. 164-169.
115. Zhu, J., Wang, B., Miao, Q., Tan, Y., Li, C., Chen, Z., Guo, H., Liu, G. 2015. Viral Genome-Linked Protein (VPg) Is Essential for Translation Initiation of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV). *Plos One*. 10 (11). pp. 1-13.