



REMITENTE DE LAS MUESTRAS

Manuel Martínez Casal
Presidente de la Sociedad de Caza y Pesca de Portas.
c/Rapeira 26
36658- Portas (Pontevedra)
Teléfono 606 856 853
tecordeportas@hotmail.com

ANTECEDENTES DEL CASO

Las muestras corresponden a bajas de un brote de enfermedad detectado el día 25 de mayo de 2007 en el criadero de conejos en semilibertad propiedad de la Sociedad de Caza y Pesca situado en el Tecor de Portas.

Se sospecha que podría tratarse de Enfermedad Vírica Hemorrágica del conejo (RHDV).

DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

Dos cadáveres enteros de conejo silvestre de unos tres meses de edad, procedentes del criadero, remitidas por transporte urgente en refrigeración en un recipiente isotermo el día de su recogida en el propio Tecor, 29 de mayo de 2007.

Posteriormente se recibieron desde los Laboratorios Syva de León otras cuatro muestras congeladas consistentes en homogenizados de hígado de animales procedentes del mismo criadero. También se recibieron dos muestras controles adicionales, un control SYVA (BS89) de aspecto más limpio y diluido que las anteriores y un control de hígado de animal infectado con la cepa AST-89.

ANÁLISIS SOLICITADO

Confirmación del diagnóstico presuntivo de RHDV.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS:

Con los animales recibidos enteros, se realizó la necropsia que mostró en ambos casos signos compatibles con enfermedad vírica hemorrágica. Se tomaron muestras de hígado, bazo y pulmón que se guardan congeladas a -80º para posteriores análisis.

Para las pruebas siguientes se parte de 1 g de hígado de cada animal que se homogeniza en PBS y se somete a dos procesos de centrifugación y ultra centrifugación con objeto de concentrar el virus y eliminar impurezas que puedan afectar a la PCR.

Las muestras de extracto de hígado recibidas de Laboratorios Syva se utilizaron directamente en los análisis siguientes.

ANÁLISIS REALIZADOS:

1.-DETECCIÓN DE GENOMA DEL RHDV:

Análisis mediante PCR anidada dirigida a la región que codifica el dominio E de la VP30 del RHDV. Se utilizan directamente (sin extracción previa del RNA) las muestras semipurificadas de hígado enviadas desde Galicia (Oviedo 1 y 2), los homogenizados enviados desde León (H1-H2-H3-H4) y los controles positivos SYVA, (BS89) y Oviedo (AST-89).

Se detecta la banda de amplificación esperada (529 pares de bases) en las muestras Oviedo 1 y 2 así como en los dos controles positivos BS89 y AST-89.



Comentario de los resultados:

La amplificación positiva en las muestras Oviedo 1 y 2, **confirma la presencia del virus RHDV** en los **animales recibidos enteros desde Galicia**. La ausencia de amplificación en las muestras de extracto de hígado recibidas desde León, se debe a inhibición de la PCR dado que un análisis similar de las muestras de Oviedo sin semipurificar, tampoco conduce a la amplificación positiva.

2.-DETECCIÓN DE ANTIGENO (VP60) POR WESTERN:

Se realiza una electroforesis de las seis muestras anteriores: las dos semipurificadas en Oviedo y los extractos de hígado recibidos de León, junto con los controles positivos utilizando geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Posteriormente se lleva a cabo un análisis Western de las proteínas separadas y transferidas a un filtro, utilizando anticuerpos específicos de la VP60 del RHDV. Se detecta el antígeno específico de 60kDa en todas las muestras recibidas (salvo en la H3) así como en los controles.

Comentario de los resultados:

Las muestras control AST-89 y BS89 muestran **una banda de aproximadamente 60kDa** que en el caso de la cepa BS89 es mucho más tenue dado la mayor dilución de la muestra. La presencia de este antígeno es un **signo positivo específico** de la presencia del RHDV. Las muestras semipurificadas Oviedo 1 y 2 también dan lugar a bandas intensas de este antígeno observándose en la Oviedo 1 **una banda adicional de 35kDa**, posiblemente consecuencia de la degradación de la VP60.

Los extractos **H1, 2 y 4** también dan **una banda positiva** de 60kDa mientras que la **H3** sólo muestra la **banda de 35kDa** indicando posiblemente un estado muy deteriorado de esta muestra.

CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, se **CONFIRMA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD VÍRICA HEMORRÁGICA DEL CONEJO** en las muestras recibidas del criadero de conejos de Portas.

Oviedo a 26 de Junio de 2007

Firma y sello



Profesor Dr D Francisco Parra
Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Oviedo
Edificio Santiago Gascón
Campus El Cristo. 33006 Oviedo.