



6º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

6CFE01-265

Montes: Servicios y desarrollo rural
10-14 junio 2013
Vitoria-Gasteiz



Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Vitoria-Gasteiz, 10-14 junio de 2013
ISBN: 978-84-937964-9-5
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Hiperinmunización frente a la Enfermedad Hemorrágica Vírica utilizando virus de campo en las poblaciones de conejo de monte

CALVO CERRATO, A.¹, MONROY FERNÁNDEZ, F.¹, LUQUERO RAMOS, L.² y CALVETE MARGOLLES, C.³

¹ TRAGSATEC. Gerencia de Sanidad Animal

² Subdirección de I+D+i, TRAGSA

³ CITA de ARAGÓN. Unidad de Sanidad Ambiental

Resumen

El conejo silvestre (*Oryctolagus cuniculus*) es una especie clave de los ecosistemas mediterráneos ibéricos y una de las principales especies de caza menor. Para conservar la biodiversidad y potenciar la actividad cinegética, durante las últimas décadas se han venido realizando actuaciones dirigidas a recuperar sus poblaciones, con la consiguiente inversión económica. Sin embargo, el éxito de estas actuaciones a medio y largo plazo está frecuentemente modulado, de forma negativa, por el impacto de la enfermedad vírico-hemorrágica del conejo (RHD) que, en su forma clásica, suele cursar con elevadas mortalidades en aquellas poblaciones con reducida inmunidad natural. El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar un protocolo (kit) de hiperinmunización poblacional frente a RHD clásica con el fin de poder crear poblaciones de alta densidad y con elevada inmunidad natural a la enfermedad, no procedente de vacunación. Para ello se promovió la circulación del virus campo en poblaciones experimentales durante la época de reproducción de la especie con el fin de incrementar la incidencia de la infección entre los animales más jóvenes (8-12 semanas de vida) en los cuales la letalidad es considerablemente menor que en animales mayores. Las poblaciones hiperinmunizadas mostraron, en general, mayor prevalencia de anticuerpos frente al virus RHD, mayor densidad poblacional y mayor productividad.

Palabras clave

Sanidad, inmunidad, anticuerpos, epidemiología, vacuna, virus, productividad.

1. Introducción

Son varias las razones por las que el conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus*) tiene importancia en la conservación de los ecosistemas mediterráneos; bien por ser la base alimentaria de más de 30 especies depredadoras de la península ibérica, entre ellas el águila imperial (*Aquila adalberti*) o el lince ibérico (*Lynx pardinus*) como especies amenazadas de peligro de extinción; o bien por ser una de las principales especies de caza menor en nuestro país (Delibes-Mateos et al., 2008). Sin embargo el impacto de enfermedades como la mixomatosis o la enfermedad vírico-hemorrágica o RHD (*Rabbit Haemorrhagic Disease*), en su forma clásica, han producido un importante descenso poblacional llegando incluso a la cuasi extinción de muchas de sus poblaciones (Reddiex et al., 2002; Calvete et al., 2006).

Para hacer frente al problema causado por el impacto de las enfermedades se han realizado actuaciones encaminadas a fomentar las poblaciones mediante la realización de campañas de vacunación o la translocación de ejemplares vacunados a las zonas deficitarias

(Calvete et al., 1997; Moreno et al., 2004). Sin embargo el éxito de estas actuaciones ha sido desigual debido, en gran medida, a la RHD, ya que en muchas situaciones, la protección de la población frente a esta enfermedad ha perdurado mientras ha existido inmunidad vacunal - inmunidad que es pasajera-, mientras que en otras zonas, la densidad poblacional se ha visto incrementada aún en presencia de la enfermedad.

Por otro lado, desde la aparición de la RHD clásica, a finales de los años ochenta, se ha venido observando que existen poblaciones de conejos que, de forma natural, se han recuperado del impacto inicial de la enfermedad, mientras que otras han visto comprometida su viabilidad como consecuencia de la misma. Simultáneamente, estudios realizados han demostrado que la RHD clásica se caracteriza por una elevada letalidad (90% aproximadamente) en conejos con edades superiores a ocho semanas de vida, mientras que en conejos más jóvenes la infección cursa con enfermedad leve o inaparente y prácticamente sin mortalidad (Argüello et al., 1988). Otros autores sugieren que el impacto de la RHD a nivel de población, estaría inversamente relacionado con la fuerza de infección del virus, y en última instancia, por la propia densidad poblacional (Calvete., 2006).

Debido a la desigual evolución e impacto de la RHD clásica observados en las poblaciones de conejos silvestres, desde diferentes ámbitos científicos y de la conservación del medio natural se considera fundamental investigar sobre la epidemiología de esta enfermedad en condiciones naturales para comprender los mecanismos epidemiológicos implicados en la modulación de la viabilidad de las poblaciones a largo plazo, y poder llegar a establecer las condiciones que favorecen la aparición de núcleos poblacionales capaces de pervivir a elevada densidad en presencia de la enfermedad.

2. Objetivos

El objetivo principal del proyecto se ha centrado en conseguir poblaciones de conejo silvestre a elevada densidad en presencia del virus RHD y con una elevada inmunidad poblacional a la enfermedad, sin recurrir a la inmunización vacunal.

3. Metodología

El ensayo de campo se realizó en 4 poblaciones experimentales de conejos de monte alojadas en 4 cercados de 1ha. Estas poblaciones son de nueva creación, formadas en un primer momento a partir de la translocación de ejemplares de conejo silvestre. Dos de las poblaciones actuaron como control y a las otras dos se les administró un kit de hiperinmunización diseñado para incrementar la fuerza de infección del virus campo de RHD durante la época reproductora (diciembre a mayo), época en la que está indicado su uso con el objetivo de que el virus infecte al mayor número de animales jóvenes sin que ello conlleve un incremento en la mortalidad de la población expuesta. A excepción de la implementación del kit, el manejo y alimentación en todos los cercados fue el mismo.

El kit se basa principalmente en la utilización de una suspensión de virus RHD que es presentada adecuadamente para facilitar el contacto de los conejos a la misma. En este caso, para la elaboración de la suspensión vírica se partió de aislados de virus de RHD clásica obtenidos de conejos silvestres encontrados muertos por la enfermedad en la misma zona de estudio. Después de su caracterización molecular y titulación, la suspensión se almacenó congelada en viales alicuotados para su posterior uso y administración con un cebo apetecible

para los conejos. Previamente se comprobó en laboratorio que la letalidad del virus aislado fue superior al 90% en conejos adultos tanto domésticos como silvestres.

El intervalo temporal de administración de la suspensión vírica en las poblaciones de conejos fue de 3-6 semanas, ventana que se considera suficiente para que los gazapos que emergen de las madrigueras queden infectados por el virus antes de que superen la edad de 8-12 semanas de vida.

Antes y después del periodo reproductor se procedió a la captura/recaptura de todos los efectivos con el objeto de valorar el efecto de la administración del kit de hiperinmunización en la población. Para ello se realizaron toma de muestras de sangre de todos los conejos capturados para determinar la presencia de anticuerpos frente a la RHD.

Con el objetivo de observar lesiones compatibles con RHD y comprobar si las bajas eran provocadas por brotes de la enfermedad, a todos los cadáveres de conejos que se localizaron en los cercados se les realizó la necropsia y se les tomó muestras de tejido hepático para su posterior análisis en laboratorio y determinación de la presencia del virus RHD.

4. Resultados

En la Tabla 1 se muestran los resultados de prevalencia de anticuerpos frente a RHD obtenidos en los chequeos serológicos realizados después de aplicar el kit de hiperinmunización. Se muestran animales que se capturaron en primavera y otoño, periodos que se corresponden con la finalización del período reproductor y el inicio del siguiente respectivamente. Si bien en otoño todos los conejos fueron adultos o subadultos, los datos se han presentado según a la clase de edad a la que pertenecían en el muestreo de primavera.

Tabla 1. Prevalencia de anticuerpos por grupo de edad en los cercados: capturas de primavera y otoño

		primavera (mayo)				otoño (noviembre)			
		gazapos	juveniles	subadultos	adultos	gazapos	juveniles	subadultos	adultos
Cercado hiperinmunizado 1(c1)	% prevalencia anticuerpos	89	81	100	88	93	93	71	100
Cercado control 1(c2)		90	100	100	100	100	100	-	100
Cercado control 2 (c3)		78	34	64	100	89	100	100	100
Cercado hiperinmunizado 2 (c4)		72	75	64	100	93	79	65	100

En todos los grupos de edad, la prevalencia fue elevada, tanto en los cercados control como en los cercados a los que se les aplicó el kit, viéndose incrementada en el chequeo de otoño. La elevada prevalencia observada en los cercados control fue debido al desarrollo natural de la enfermedad RHD, provocando elevadas mortalidades, especialmente en el c2.

En el muestreo de otoño se capturaron animales seronegativos en tres de los cuatro cercados. Sin embargo, cuando se procedió a su desafío en laboratorio frente a la enfermedad,

la supervivencia fue del 100% para los individuos procedentes de los dos cercados hiperinmunizados e inferior para los procedentes de los cercados no hiperinmunizados (Tabla 2).

Tabla 2. Prevalencia de anticuerpos por grupo de edad en los cercados: capturas de otoño

	animales seronegativos	desafío con suspensión vírica en laboratorio	supervivencia	muerte
Cercado hiperinmunizado 1 (c1)	3	100%	100%	-
Cercado control 1(c2)	0		-	-
Cercado control 2 (c3)	15		40%	60%
Cercado hiperinmunizado 2 (c4)	8		100%	-

Con respecto a la evolución de la densidad poblacional de todos los cercados, se utilizó la tasa de deposición de excrementos, a través de la instalación de estaciones de conteo en los cercados, como estimador de la abundancia relativa, y la propia densidad real de los 4 cercados al inicio del ensayo; estas no parecieron estar correlacionadas probablemente debido a la presencia de excrementos viejos que se acumulan y/o al efecto confusor del viento y la lluvia.

Por ello, como estimador de la abundancia en los distintos cercados se tomó la media de animales capturados para ambos grupos (cercados control y cercados hiperinmunizados) cuando se realizó el muestreo de otoño, período correspondiente al inicio del período reproductor del siguiente año. Los resultados obtenidos arrojaron un 33 % más de animales en los cercados en donde se implementó el kit de hiperinmunización (64 ans/ha en cercados hiperinmunizadas frente a 44 ans/ha en cercados control).

5. Discusión

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que el impacto negativo de la RHD a nivel poblacional está inversamente relacionado con la fuerza de infección del virus y, por lo tanto, con la densidad poblacional. Una elevada densidad poblacional facilita la transmisión del virus, lo que implica una mayor fuerza de infección y, por lo tanto, una disminución de la edad media a la que los conejos se infectan, lo que conlleva que la letalidad media producida por la infección disminuya. En nuestro ensayo, las elevadas densidades existentes en las cuatro poblaciones experimentales, en comparación a las densidades que normalmente se encuentran en poblaciones naturales, facilitaron la transmisión natural del virus, lo que produjo que, incluso en los cercados control, tanto la densidad poblacional como la prevalencia de ejemplares seropositivos a la enfermedad fuesen muy elevadas.

La hipótesis se vio también respaldada, además, por el hecho de que en los cercados hiperinmunizados, la densidad poblacional y la prevalencia de ejemplares positivos fueron superiores a las de los cercados control, pudiéndose interpretar esta diferencia en base al

incremento de la fuerza de infección del virus como consecuencia de la introducción reiterada del mismo mediante el kit de hiperinmunización. Esta introducción controlada del virus durante el período reproductor, no sólo no produjo brotes de mortalidad por RHD, sino que, en comparación a los cercados control, limitó la intensidad de éstos, permitiendo un mayor incremento de la abundancia de conejos a lo largo del ciclo biológico anual.

No obstante, debido a que los cercados control fueron permeables a la entrada natural del virus campo, y a que las densidades de conejos fueron elevadas dentro de los cercados, en comparación a las que ocurren en la naturaleza, no es posible considerar a estas poblaciones como auténticos controles negativos, por lo que en la hipotética situación de haber podido emular densidades poblacionales menores, hubiera sido esperable una mayor diferencia en densidad y prevalencia de anticuerpos entre los cercados control y los hiperinmunizados.

Desde el punto de vista práctico, el hecho de no haberse apreciado reacciones adversas en los individuos ni en la dinámica poblacional, sugiere que la implementación del kit de hiperinmunización podría ser una alternativa real para controlar el impacto negativo de la RHD en poblaciones naturales de conejos. Hasta ahora, la única alternativa de gestión para minimizar el impacto de esta enfermedad ha sido intentar incrementar las densidades poblacionales, bien a base de repoblaciones o bien mediante medidas de gestión a largo plazo (ej. mejora del hábitat, control de predadores), que, necesariamente, no tienen porqué conllevar el incremento paralelo de la fuerza de infección del virus, supeditando, en gran medida, el éxito de la gestión al azar. La implementación del kit de hiperinmunización ensayado en el presente trabajo, por el contrario, sí que podría constituir una herramienta eficaz para incrementar drásticamente la fuerza de infección del virus, incluso a densidades poblacionales muy inferiores a las que tendría lugar de forma natural.

La administración de la suspensión vírica a la población a través de un cebo apetecible y el contacto de los animales con el virus durante la ventana temporal que hemos considerado en nuestra experiencia (durante el periodo reproductor), es determinante para que los individuos jóvenes puedan ser infectados sin sufrir tan apenas mortalidad, consiguiéndose con ello su protección permanente frente a la enfermedad de una manera natural sin necesidad de capturarlos. Además, en contraposición al uso de productos vacunales, la inmunidad otorgada por la infección es prácticamente de por vida y no limitada a la duración de la inmunidad vacunal. Por otro lado, debido a la elevada proporción de individuos que son infectados, se favorece la existencia de una considerable proporción de ejemplares portadores asintomáticos del virus y, por lo tanto, de posibles fuentes de virus en el futuro, lo que garantizaría que la fuerza de infección se mantuviese elevada. Ello supondría que a partir de una densidad poblacional determinada, el proceso de hiperinmunización se debería perpetuar de forma natural, sin necesidad de nuevas intervenciones, tal y como presumiblemente ocurre en aquellas poblaciones naturales a elevada densidad y con presencia de la enfermedad. De este modo, con el kit de hiperinmunización se minimizaría la mortalidad por RHD de toda la población tanto a corto como a largo plazo.

Esto nos lleva a considerar que en poblaciones naturales de conejos susceptibles de ser tratadas o, especialmente, en el caso de nuevas poblaciones creadas a partir de translocaciones, la implementación de dicha estrategia de control del impacto de la RHD, podría ser una opción a valorar, especialmente en aquellas zonas en las que año tras año se diezman sus poblaciones con la presentación de distintos brotes provocados por la RHD. Al mismo tiempo, se podrían evitar las cuantiosas pérdidas económicas (y los riesgos sanitarios y

genéticos) que suponen los traslados continuos de conejos desde las zonas conejeras a las zonas que se pretenden repoblar.

6. Conclusiones

En el ensayo realizado se pudo evidenciar que la implementación del kit de hiperinmunización, utilizando la ventana temporal de administración de 3-6 semanas en época reproductora, produjo la inmunidad esperada en la población a la que iba destinada (conejos de 8-12 semanas), por lo que el método empleado implica una reducción de la edad media de infección y, por lo tanto, una disminución de la mortalidad a nivel poblacional causada por la RHD clásica.

Además, en todos los cercados se observó que las elevadas densidades obtenidas han podido favorecer la diseminación del virus en la población, por lo que para valorar la eficacia del kit desarrollado, el ensayo debería realizarse en condiciones de campo donde la densidad por hectárea es menor a la conseguida en los cercados de 1ha construidos para tal fin.

Con este sistema, las coberturas de inmunización frente a la RHD clásica de la población se elevan drásticamente en comparación a las campañas de vacunación tradicionales, ya que para dispensarlo no es necesario capturar a todos y cada uno de los individuos. La suspensión se administra en el momento en el que se pueda inmunizar al mayor número de animales sin provocarles la muerte; pero provocando infección efectiva en los mismos, y al mismo tiempo, el uso de la cepa vírica de la zona asegura la no introducción de otras cepas distintas a las usadas en la población a gestionar.

7. Agradecimientos

Este trabajo es el resultado de un proyecto de I+D+i financiado por el Grupo TRAGSA y desarrollado con la colaboración del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) y la Gerencia de Sanidad Animal del citado Grupo.

8. Bibliografía

ARGÜELLO, J.L., LLANO, A., PÉREZ-ORDOYO, L.L.; 1988. Enfermedad vírica hemorrágica del conejo en España. *Med Vet* 5: 645-650.

CALVETE, C., 2006. Modeling the effect of population dynamics on the impact of rabbit hemorrhagic disease. *Conserv. Biol.* 20: 1232-1241.

CALVETE, C., PELAYO, E., SAMPIETRO, J., 2006. Habitat factors related to wild rabbit population trends after the initial impact of rabbit haemorrhagic disease. *Wild. Res.* 33:467-474.

CALVETE, C., VILLAFUERTE, R., LUCIENTES, J., OSACAR, J.J., 1997. Effectiveness of traditional wild rabbit restocking in Spain. *J. Zool.* 241: 271-277.

DELIBES-MATEOS, M., DELIBES, M., FERRERAS, P., VILLAFUERTE, R. 2008. Key role of European rabbits in the conservation of the western Mediterranean basin hotspot. *Conserv Biol.* 22:1106-17.

MORENO, S., VILLAFUERTE, R., CABEZAS, S., LOMBARDI, L., 2004. Wild rabbit restocking for predator conservation in Spain. *Biol. Conserv.* 118:183-193.

REDDIEX, B., HICKLING, G.J., NORBURY, G.L., FRAMPTON, C.M., 2002. Effects of predation and rabbit haemorrhagic disease on population dynamics of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in north Canterbury, New Zealand. *Wild. Res.* 29:627-633.