

# EVOLUCION DEL BROTE DE MIXOMATOSIS EN LIEBRES EN ESPAÑA TEMPORADAS 2018-2019 Y 2019-2020



Buitrago, M.D.(2), Ruano, M.J.(1), Sánchez, A.(1), Bouzada, J.A.(1), Durán, M.(1) y Agüero, M.(1)  
 (1) Laboratorio Central de Veterinaria, Algete. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación  
 (2) TRAGSATEC Tecnologías y Servicios Agrarios SA.

## INTRODUCCION:

La mixomatosis es una enfermedad, no zoonótica, de los conejos, causada por el virus mixoma (MYXV) familia Poxviridae, género Leporipoxvirus. Es un virus de gran tamaño y complejidad, cuyo genoma es ADN de doble cadena de 160 Kb con secuencias repetidas invertidas (TIR) en ambos extremos y que codifica para unas 170 proteínas, 12 de ellas en las TIR (Fig.1).

En los conejos europeos, la enfermedad aparece en forma nodular (clásica) o mixomatosa (respiratoria), menos frecuente. La transmisión puede ser directa por contacto o indirecta por artrópodos hematofagos. Si bien la liebre es un animal susceptible, raramente sufre la enfermedad. En España la enfermedad es endémica en conejo silvestre y doméstico.

El Laboratorio Central de Veterinaria (LCV), situado en Algete, es el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para la mixomatosis. En Julio de 2018 se detectaron mortalidades anormales en liebres ibéricas (*Lepus granatensis*) en cotos de Córdoba, con ejemplares en el campo en estado moribundo, signos de ceguera, debilidad y desorientación. El LCV confirmó la presencia del virus mixoma en muestras de los animales afectados mediante PCR. Una semana más tarde se notificaron los primeros casos en liebres en Jaén (*García-Bocanegra et al., 2019*) y a principios de agosto de 2018, en Castilla-La Mancha. La enfermedad se fue extendiendo, hasta afectar a 25 provincias de 9 CCAA a finales de 2018, con un total de 260 casos confirmados hasta febrero 2019. Desde el mes de abril de 2019, inicio de la nueva temporada vectorial de la enfermedad, se han confirmado 98 casos en liebre ibérica en 21 provincias de 9 CCAA, incluyendo País Vasco, donde la enfermedad se detecta por primera vez en liebre ibérica en el mes de septiembre de 2019 (RASVE, 2019) (Fig.2).

La secuenciación del genoma completo, ha permitido determinar que el virus causante del brote de mixomatosis en liebres (ha-MYXV) presenta una inserción genómica de 2,8 kb, dentro del gen M009, que lo diferencia del virus mixoma clásico de los conejos (MYXV) (*Dalton et al., 2019; Águeda-Pinto et al., 2019*).

## VIRUS DEL MIXOMA

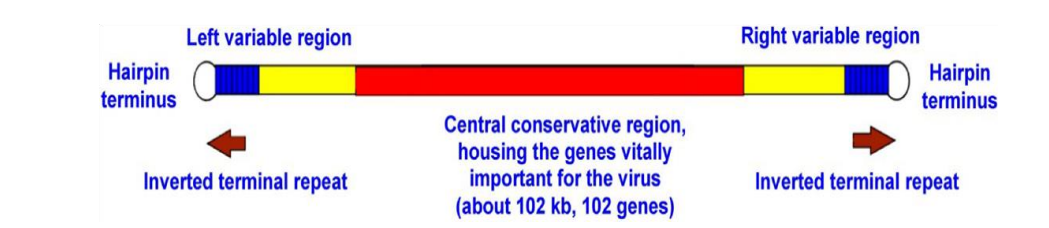
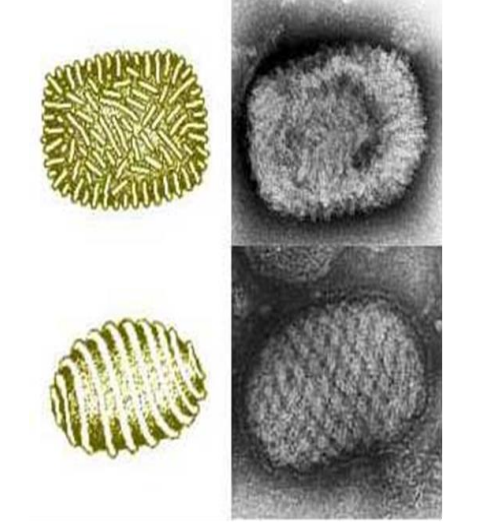


Fig1 . Virus del mixoma (MYXV) y esquema de su genoma.

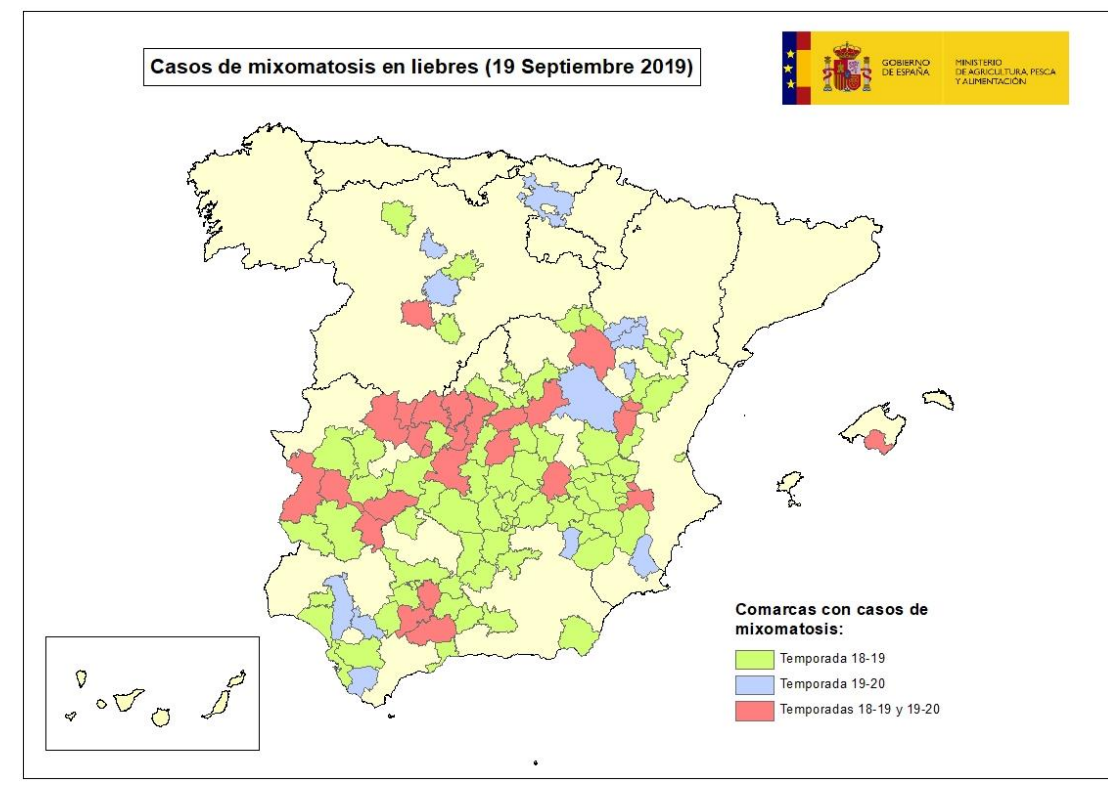


Fig. 2: Provincias afectadas 2018/19 y 2019/20.

## OBJETIVOS:

El objetivo de este trabajo ha sido realizar el diagnóstico diferencial de ha-MYXV/MYXV, basado en la inserción de 2,8 kb en el Gen M009L así como estudiar la estabilidad de la región genómica de la inserción del genoma de haMYXV, en una selección de aislados y/o muestras de liebres positivas, representativas de los casos confirmados a lo largo de 2018 y 2019, junto con conejos silvestres positivos coetáneos de zonas con liebres afectadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS:

Para el diagnóstico de mixomatosis en muestras de párpado y otros tejidos animales se utilizó una PCR dirigida al gen viral M071 (*Cavadini et al., 2010*). El diagnóstico diferencial de las muestras positivas (83 casos de liebres y 28 casos de conejos silvestres procedentes de zonas con liebres afectadas), se realizó mediante una PCR dirigida al gen M009 que incluye la región insertada en el genoma de ha-MYXV (*Dalton et al., 2019*).

La determinación molecular de la especie animal de procedencia de la muestra analizada se llevó a cabo por la técnica *SpinDel* (*Species Identification by Insertions/Deletions*), basada en el análisis mediante electroforesis capilar de regiones hipervariables de genes ribosómicos mitocondriales amplificadas mediante PCR múltiple (*Pereira et al., 2010*).

Los aislamientos virales se realizaron en cultivos celulares de células RK 13, células epiteliales de riñón de conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) (*Manual OIE 2019*).

La secuenciación del ADN de la región insertada de 29 muestras o aislados virales de liebres positivas se realizó por secuenciación Sanger, en un equipo *3730xl DNA Analyzer* de *ThermoFisher* utilizando los oligonucleótidos descritos en *Dalton et al., 2019* junto con cuatro parejas de oligonucleótidos diseñados en el LCV, para obtener la secuencia de la inserción del Ha-MYXV completa.

CCAA	Provincia	Especie
Andalucía	Córdoba	Liebre
	Jaén	Liebre
	Málaga	Liebre
	Sevilla	Liebre
	Granada	Liebre
	Cádiz	Liebre
	Huelva	Liebre
	Almería	Liebre
	Cuenca	Liebre
CLM	Ciudad Real	Liebre
	Toledo	Liebre
	Albacete	Liebre
C. Valenciana	Valencia	Liebre
	Guadalajara	Liebre
Extremadura	Badajoz	Liebre
	Caceres	Liebre
C. Madrid	Madrid	Liebre
	Murcia	Liebre
C y L	Soria	Liebre
	Valladolid	Liebre
Aragón	Zaragoza	Liebre
	Teruel	Liebre
Islas Baleares	Mallorca	Liebre
	P. Vasco	Alava

Fig. 6: Aislados obtenidos en células RK 13

## DIAGNÓSTICO DE MIXOMATOSIS EN LNR (LCV)

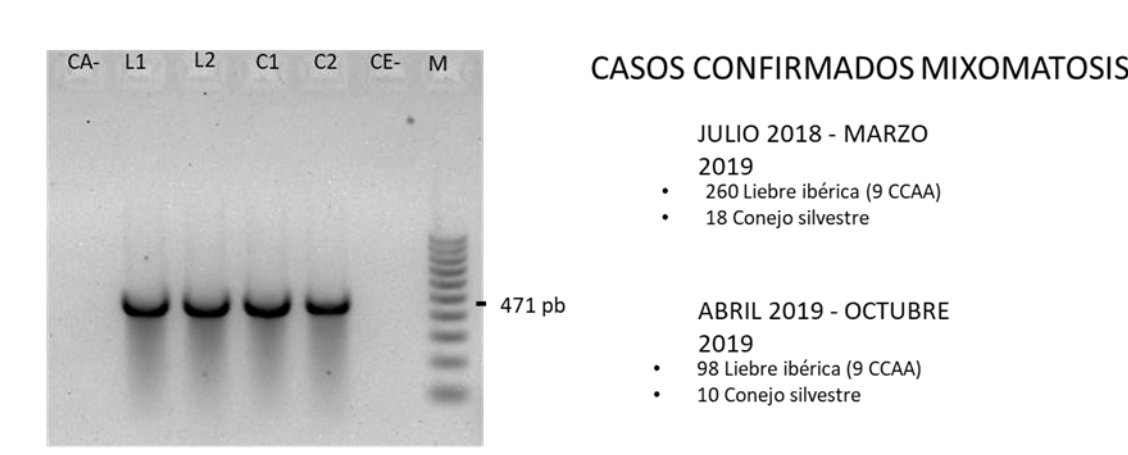


Fig. 3: Análisis diagnóstico de la mixomatosis en LNR.

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE haMYXV y MYXV

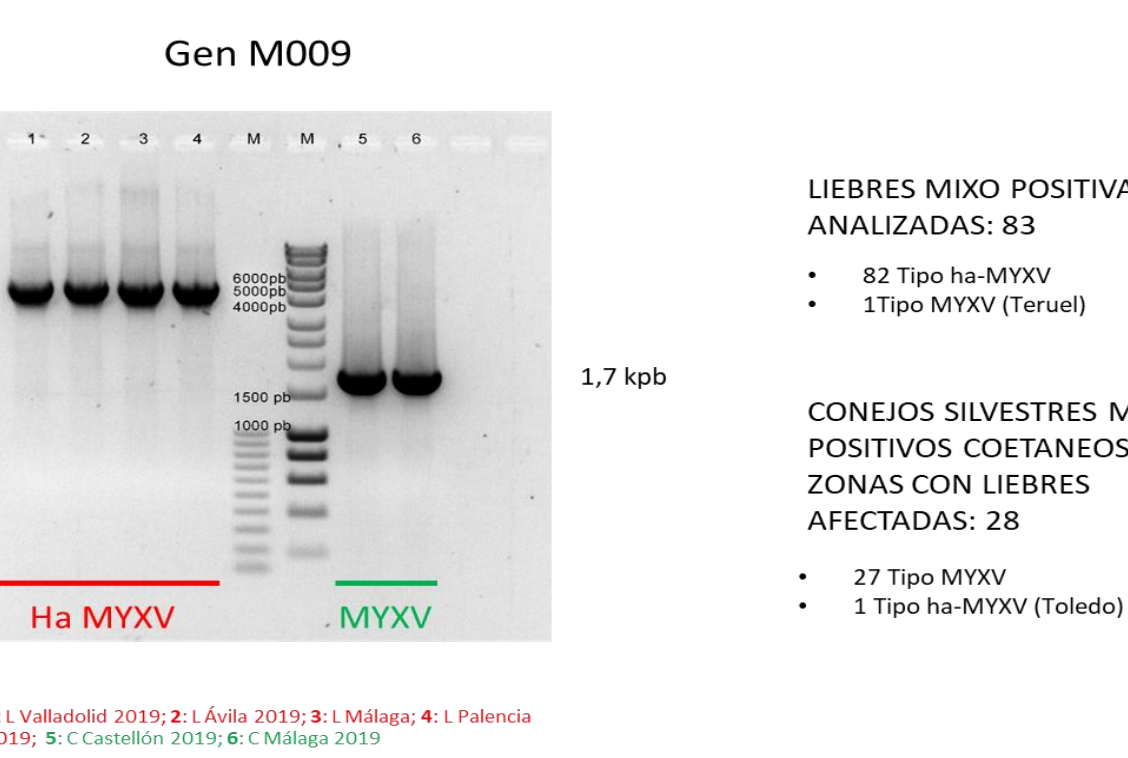


Fig. 4: Análisis diagnóstico diferencial MYXV/ha-MYXV

## RESULTADOS:

Se han diagnosticado 358 casos de mixomatosis en liebre ibérica y 28 casos en conejo silvestre, en el periodo julio 2018-octubre 2019, empleando la PCR dirigida al gen M071 (Fig. 3), de los cuales 111 (83 liebres y 28 conejos) han sido analizados mediante la PCR que permite diferenciar ha-MYXV de MYXV. En el diagnóstico diferencial los virus detectados en liebre ibérica han sido del tipo ha-MYXV, excepto en 1 liebre de Teruel, y los virus detectados en conejo silvestre del tipo MYXV, excepto en 1 conejo de Toledo (Fig.4).

Mediante *SpinDel* se ha confirmado molecularmente la especie de origen de las muestras con hallazgos atípicos respecto al virus detectado (conejo de Toledo y liebre de Teruel con virus atípicos), confirmándose en ambos casos la especie indicada en la información remitida con la muestra (Fig.5).

A partir de muestras positivas del primer brote diagnosticado en cada provincia afectada en las temporadas 2018-19 y 2019-2020, se han obtenido 48 aislados virales en células RK 13 (Fig. 6), que forman parte de la colección de aislados del LNR.

En el estudio para determinar la estabilidad de la región insertada, en 29 muestras o aislados virales de liebres positivas representativas de las diferentes zonas afectadas desde julio 2018-septiembre 2019, no se aprecian cambios significativos en el tamaño de la región estudiada. Se han encontrado cambios de nucleótidos puntuales y pequeñas adiciones-delecciones múltiple de 3, principalmente en la zona codificante de uno de los 4 hipotéticos genes (gen M064) contenidos en la inserción (Tabla 1).

## ESTABILIDAD DE LA INSERCIÓN DEL ha-MYXV

Genes	ha-m066								ha-m64				ha-m61	ha-m60	
	12838	12950	12966	12966	12969	13010	13020	13022	13414	13517	13520	13521	13533	14025	14744
ha-MYXV	T	T	T	T	A	A	C	G	CTCAT	TCATCA				TT	T
Rg. 2385-1-2018MURCIA															
Rg. 3273-3-2018SORIA															
Rg. 1981-4-2018TOLEDO															
Rg. 2258-5-2018MADRID															
Rg. 3532-8-2018BALEARES															
Rg. 2249-1-2018BADAJOS															
Rg. 2080-1-2018-TOLEDO															
Rg. 1844-4-2018JAEN															
Rg. 2281-3-2018BADAJOS															
Rg. 1196-1-2019VALENCIA															
Rg. 1308-4-2019ALBACETE															
Rg. 2467-23-2019-CUENCA															
Rg. 2488-4-2109BADAJOS															
Rg. 2534-1-2019-CADIZ															
Rg. 2534-3-2019-MALAGA															
Rg. 2534-8-2019-CORDOBA															
Rg. 2585-2-2019VALLADOLID															
Rg. 2614-1-2019VALLADOLID															
Rg. 2614-2-2019VALLADOLID															
Rg. 2614-3-2019VALLADOLID															
Rg. 2667-5-2019GRANADA															
Rg. 2678-1-2019ALAVA															
Rg. 2681-8-2019CACERES															
Rg. 2690-1-2019ZARAGOZA															
Rg. 2741-10-2019AVILA															
Rg. 2788-2-2019BALEARES															
Rg. 2815-1-2019AVILA															
Rg. 2864-4-2019VALENCIA															
Rg. 2879-4-2019TERUEL															

Tabla 1: Análisis de estabilidad. Cambios encontrados DEL (delección) INS (inserción)

## DETERMINACIÓN MOLECULAR DE ESPECIE *SpinDel*



Fig. 5: Determinación molecular de la especie animal (*SpinDel*)

## CONCLUSIONES:

- El virus de mixoma detectado en liebres, durante los brotes ocurridos en España desde julio 2018 hasta la actualidad presenta diferencias con el virus que ha circulado en la población de conejos en España, sobre todo en la región del gen M009L, que ha resultado truncado y con una inserción de 2,8kb que contiene 4 potenciales genes.
- Mediante una PCR de un fragmento que engloba la inserción se puede diferenciar entre el haMYXV y el MYXV observando el tamaño del fragmento amplificado tras la PCR. Se dispone por tanto de un marcador para diferenciar ambos tipos de virus.
- Todas las liebres estudiadas excepto una, presentan el virus tipo haMYXV, mientras que, todos los conejos silvestres, excepto uno, contienen el virus MYXV; lo que parece indicar que ambos tipos de virus presenta una gran especificidad respecto a su especie huésped.
- El tamaño de la región insertada del genoma de ha-MYXV ha permanecido estable en el virus circulante en el periodo julio 2018-septiembre 2019. Solo se han detectado algunas mutaciones puntuales y pequeñas delecciones/adiciones que están siendo estudiadas.



## REFERENCIAS

Águeda-Pinto A, et al. 2019. Genetic Characterization of a Recombinant Myxoma Virus in the Iberian Hare (*Lepus granatensis*). *Viruses*. 2019 Jun 7;11(6). pii: E530. doi: 10.3390/v11060530. PubMed PMID: 31181645;  
 Cavadini P, et al. 2010. Molecular characterization of SG33 and Borghi vaccines used against myxomatosis. *Vaccine*. 2010 Jul 26;28(33):5414-20. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.06.017.  
 Dalton KP, et al. 2019. Myxoma virus jumps species to the Iberian hare. *Transbound Emerg Dis*. 2019 Jul 19. doi: 10.1111/tbed.13296. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31322320.  
 García-Bocanegra I, et al. 2019. First outbreak of myxomatosis in Iberian hares (*Lepus granatensis*). *Transbound Emerg Dis*. 2019 Jul 10. doi: 10.1111/tbed.13289. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31293076.  
 Manual OIE 2019 (Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres, Capítulo 3.06.01)  
 Pereira F, et al. 2010. Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic Acids Res*. 2010 Dec;38(22):e203. doi: 10.1093/nar/gkq865. Epub 2010 Oct 4. PubMed PMID: 20923781  
 RASVE. Red de Alerta Sanitaria Veterinaria, MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 2019).

Agradecimientos: A todos los miembros del Dpto. de Diagnóstico Molecular y Dpto. de Virología 1 del Laboratorio Central de Veterinaria, Algete. **AVEDILA** XXIV SIMPOSIO 2019 **PAMPLONA**