

IMPACTO DE LA MIXOMATOSIS EN LA CUNICULTURA ESPAÑOLA. ANÁLISIS DE LAS CAUSAS Y PROPUESTA DE ACTUACIONES. INFORME DE ACTIVIDADES 2009

Kevin P. Dalton y Francisco Parra.

Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias (IUBA).

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Oviedo.



INTRODUCCIÓN

Actualmente no existe un programa de vacunación frente a la mixomatosis de aplicación general en las granjas españolas por lo que cada productor se adapta a las recomendaciones del veterinario responsable del programa sanitario para su explotación. A pesar de que muchas de ellas realizan "a priori" una correcta profilaxis vacunal, continúan observándose casos de mixomatosis con cierta frecuencia debido tal vez a una vacunación ineficaz (por ejemplo por mal manejo de la vacuna), a la pérdida de protección por falta de revacunación o por disminución de la capacidad de respuesta frente a la variante vírica en cuestión. Con la tecnología disponible en la actualidad resulta una tarea muy compleja la distinción entre los distintos virus mixoma circulantes en el campo así como entre éstos y los virus vacunales atenuados comúnmente empleados en España. Del mismo modo no es posible distinguir entre los anticuerpos de origen vacunal y los estimulados por un virus campo lo que plantea dificultades a la hora de evaluar la etiología de los brotes de mixomatosis por métodos serológicos, para la realización de estudios



**HEMOS DE AMPLIAR
LA RED DE
COLABORADORES Y
CONSEGUIR MÁS
MUESTRAS DE LAS
REGIONES MÁS
OCCIDENTALES DE LA
PENÍNSULA**



Figura 1: Embalaje y componentes del kit para la toma de muestras.

epizootiológicos y para clasificar las explotaciones como establece el RD 1547/2004.

En el presente informe de las actividades realizadas durante el año 2009 se recogen, de forma muy resumida, los principales resultados y conclusiones obtenidas así como las propuestas de actuación para el próximo año 2010.

Recogida y análisis de muestras. Con este propósito se organizó una red de técnicos colaboradores, a los que el laboratorio IUBA envió 5 kits (ver Figura 1) de toma de muestras de sangre y tejidos.

Hasta el momento de realizar el informe se han recibido muestras de 14 granjas (Figura 2) enviadas por 8 de los colaboradores.

En general el estado de los muestras de tejido recibidas fue bueno y en todos los casos fue posible la extracción de DNA de MV y su posterior amplificación mediante PCR.

Con las primeras cinco muestras de tejido recibidas se intentó el aislamiento viral en cultivos celulares, resultando fácil para tres de ellas pero no para las dos restantes en las que el proceso resultó muy laborioso. No obstante todas resultaron positivas para MV por PCR.



Figura 2: Distribución geográfica de las muestras recibidas (triángulos). Se indican con números las localidades de aislamiento de las cepas de MV silvestres descritas por Bárcena et al., 2000, utilizadas para tipificar los genomas de MV (ver más adelante).



**LOS ANÁLISIS
RÁPIDOS DE LAS
MUESTRAS DE
CAMPO CONSISTIRÁN
EN UNA
PCR MÚLTIPLE**

Partiendo de estas experiencias en el año 2010 nos proponemos Intensificar la toma de muestras procurando obtener algunas de las regiones mas occidentales de la península y modificar el protocolo de análisis del laboratorio en el sentido de no someter todas la muestras a intentos de aislamiento viral. En su lugar se realizará una PCR múltiple, utilizando 3 regiones genómicas seleccionadas.

Análisis de los perfiles antigénicos de los viriones purificados. Se trata de identificar proteínas virales para su uso como antígenos en nuevos diagnósticos diferenciales. Los análisis preliminares (Western) indican que, si bien parecen detectarse algunos antígenos diferenciales (Figura 3) no es posible afirmar con seguridad su utilidad ante la variabilidad observada utilizando los reactivos de los que disponemos en la actualidad. Puede verse en el ejemplo que las bandas detectadas por los sueros de dos animales distintos infectados con el mismo tipo de virus (cepa Lausanne) son muy distintas entre sí (Figura 3, L1 y L2). Del mismo modo los perfiles detectados por tres sueros de campo

(Figura 3, C1-C3) son también muy distintos a la hora de reconocer antígenos de MV.

Para poder concluir si el patrón antigenico obtenido en este tipo de ensayos (Figuras 3) es debido al tipo de virus infectivo o a otros factores tales como el nivel de anticuerpos presente en distintos momentos de la infección nos planteamos obtener durante el año 2010 series de sueros específicos, procedentes de animales vacunados con cada una de las tres preparaciones vacunales comercializadas en España, siguiendo las patuas recomendadas por los fabricantes.

Selección y expresión de genes ausentes o truncados en las cepas vacunales. El objetivo

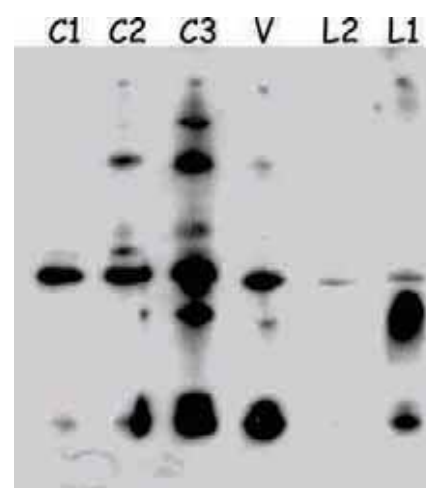


Figura 3: Inmunodetección de antígenos de MV (cepa Lausanne) utilizando sueros de animales infectados por cepas silvestres (C1-C3), el virus de referencia Lausanne (L1-L2) o inmunizados con un virus vacunal comercializado en España (V).

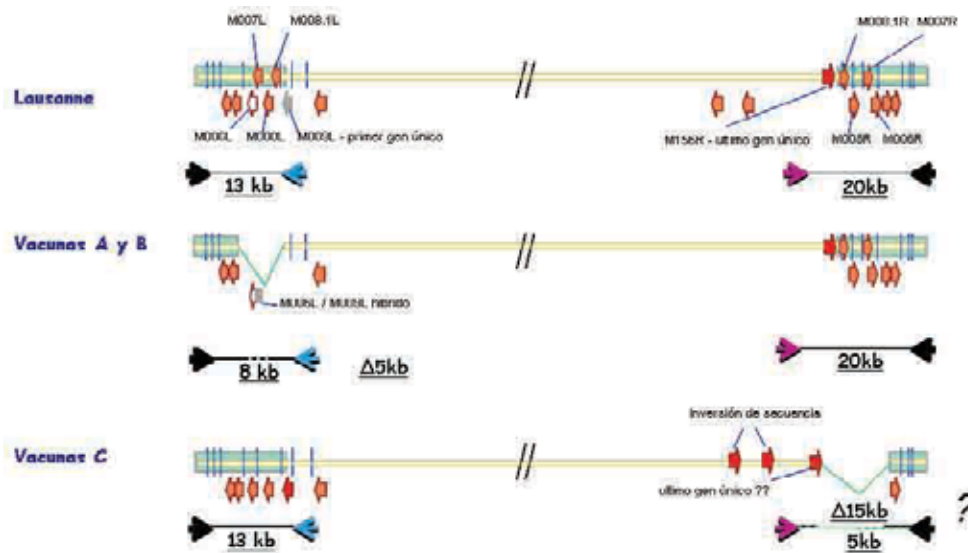


Figura 4: Esquema de la organización del genoma de MV cepa Lausanne y los de las tres cepas vacunales (A, B y C) comercializadas mayoritariamente en España.



**ES POSIBLE
DISTINGUIR LOS VIRUS
VACUNALES COMERCIALES
UTILIZADOS EN
ESPAÑA MEDIANTE
PCRS ESPECÍFICAS**

que se plantea es la identificación de alteraciones en las cepas de MV vacunales que conduzcan a la deleción parcial o total de las regiones codificadoras de algunos antígenos que pudieran en consecuencia ser utilizados para diseñar un diagnóstico diferencial entre animales vacunados e infectados por virus silvestres. Para evitar el uso de marcas en lo sucesivo nos referiremos a las tres vacunas comerciales analizadas como A, B y C.

Nuestros análisis muestran la existencia de una gran deleción (aprox. 5kpb) en la región terminal repetida (LTR) izquierda (Figura 4) de los virus vacunales A y B lo que da lugar, entre otros cambios importantes, a la fusión entre los genes M006 y M009. En el caso de la tercera cepa vacunal (C) se ha detectado una deleción mucho mayor (aprox. 15 kpb) en la región LTR derecha.

Además de los análisis de los extremos LTR se han amplificado 16 regiones genómicas de las tres cepas vacunales y de varios aislados silvestres de MV previamente caracterizados por su nivel de virulencia y transmisibilidad (Bárcena et al., 2000). Estas secuencias incluyeron 20 genes (14 secuenciados por completo y 6 parcialmente) y 7 regiones intergénicas que en conjunto representan un 10% del genoma viral completo.

Tras el análisis de las secuencias, basándose en los datos publicados por otros autores (Guerin et al., 1998, Cameron et al., 1999) y, principalmente a partir de las diferencias encontradas entre los aislados de campo y las cepas vacunales, se seleccionaron varios genes (M009, M010/M011, M141, M144 y M148) para su expresión heteróloga inicialmente utilizando baculovirus recombinantes y células de insecto (Sf9). Los trabajos para la expresión, purificación y análisis de los distintos antígenos están en diferentes fases de desarrollo. Para algunos se están diseñando los sistemas de vectores y hospedador más adecuados, en otros se están clonando las correspondientes regiones codificadoras en los vectores de expresión y en otros casos se investigan los niveles de expresión y los procedimientos más adecuados para su purificación.

A modo de ejemplo se muestran algunos resultados preliminares (Figura 5) obtenidos tras la expresión de varios de estos genes utilizando baculovirus recombinantes en células Sf9 y su detección con sueros de animales vacunados (Figura 5C) o infectados con MV silvestre (Figura 5B).

Los antígenos de las calles 2 (M071L) y 5 (M115L)

pueden ser buenos candidatos para la detección general de animales infectados por virus mixoma. Por otro lado el antígeno de la calle 8 (M144R) no es reconocido por el suero del animal vacunado, apuntando a un posible candidato para la detección diferencial de animales vacunados e infectados.

Se han encontrado dificultades considerables para la expresión a altos niveles y posterior purificación de los antígenos por lo que en el próximo año 2010 abordaremos la clonación de algunos de estos genes en distintos sistemas de vectores, con promotores de distintas características y etiquetas peptídicas (ej. GST) que permitan una mejor expresión y purificación.

Utilización de PCR-secuenciación y/o RFLP para la tipificación viral. Debido al gran tamaño del genoma del MV (161,8 kpb) los análisis RFLP han constituido el procedimiento más utilizado para la caracterización molecular de distintos aislados de MV (Saint et al., 2001 Kerr et al., 2003). Otros estudios más recientes se han centrado en la secuenciación de diversos fragmentos del genoma viral (Muller et al., 2009, Alda et al., 2009). En la actualidad solamente se conocen las secuencias completas de dos genomas de MV, la cepa virulenta Lausanne (Cameron et al., 1999) y la atenuada 6918 (Morales et al., 2009). Ante la falta de un número suficiente de aislados virales caracterizados a nivel molecular durante el año 2009 hemos estudiado el genoma de 9 aislados de MV obtenidos de conejos silvestres cuyo grado de virulencia y transmisibilidad había sido previamente caracterizado experimentalmente (Barcena et al., 2000). Para ello se han amplificado mediante PCR 16 regiones que incluyeron 20 genes (14 secuenciados por completo y 6 parcialmente) y 7 regiones intergénicas que representan aproximadamente un 10% del genoma viral completo.

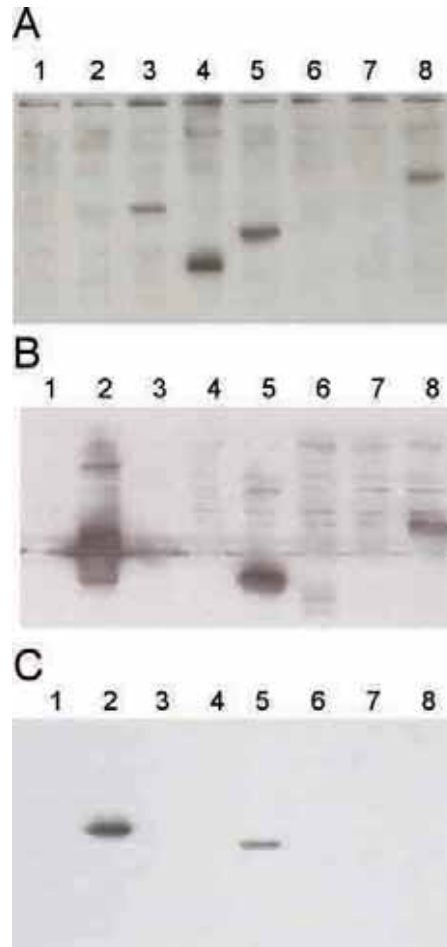


Figura 5: Inmunodetección de antígenos recombinantes de MV producidos en Sfg como fusiones con una cola de histidina utilizando antisueros frente a la etiqueta de His (A), un suero de un animal infectado con MV Lausanne (B) o un suero de un animal vacunado (C). (1) M055R, (2) M071L, (3) M083L, (4) M107L, (5) M115L, (6) M121R, (7) M122R, (8) M144R.

De entre los 20 genes secuenciados seis (M034, M069, M071, M122, M130 and M135) resultaron ser idénticos en todas las cepas de MV con respecto al genoma de Lausanne o el de la cepa atenuada 6918. Cuatro genes (M002, M009, M036 and M017) contenían inserciones o deleciones que daban lugar a la interrupción de las correspondientes pautas abiertas de lectura (ORFs).

Con este tipo de análisis hemos podido comprobar en las muestras enviadas por los técnicos colaboradores que los virus circulantes actualmente tienen diferencias importantes con respecto a la cepa Lausanne y a las cepas vacunales. A modo de ejemplo puede verse como el gen M009 de la mayoría de los MV circulantes actualmente en las granjas tiene una deleción de 21 nucleótidos con

EX | Extensión
de norma

Orden ARM/1677/2008

Este proyecto de Investigación está financiado por el MARM y fondos recaudados a través de la ORDEN ARM/1677/2008, de 22 de mayo, por la que se extiende el acuerdo de la organización interprofesional para impulsar el sector cunícola.



Figura 6: Secuencia parcial del gen Moog de varios MV de animales de granja (Ej. Sor, Soria; Ter, Te-ruel, etc.) enviados por los técnicos colaboradores y de la cepa de referencia Lausanne (Lu). Las líneas de trazos indican los residuos delecionados.

respecto a la cepa de referencia (Figura 6).

También estamos desarrollando una PCR múltiple para la amplificación simultánea de varios genes que permita la diferenciación entre cepas silvestres y vacunales. En el ejemplo (Figura 7) pueden verse tres fragmentos cuando el DNA procede de la cepa de referencia Lausanne y solamente dos en el caso de tratarse de una de las cepas vacunales utilizadas en España.

Dada la gran cantidad y complejidad de los resultados obtenidos se procurará hacer un análisis exhaustivo de los mismos para proponer un procedimiento simplificado de análisis genómico que permita su utilización para la tipificación de muestras de campo.

Agradecimientos: Estas investigaciones han sido cofinanciadas en parte por INTERCUN, el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino así como por el INIA (FAU2006-00214-CO2-01).

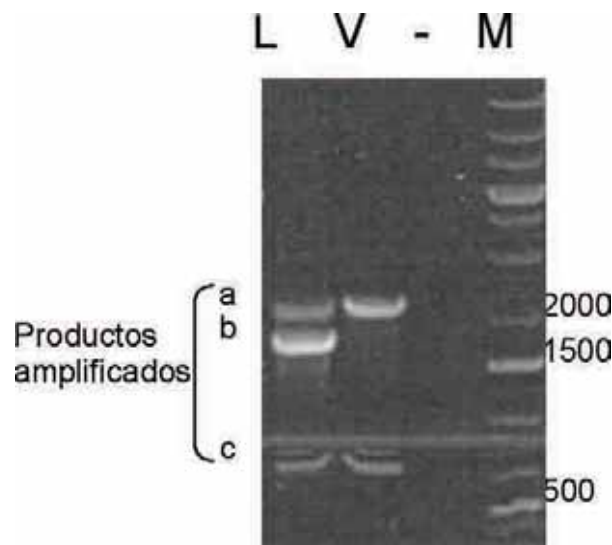


Figura 7: Análisis electroforético en gels de agarosa de los fragmentos amplificados en una PCR múltiple dirigida a los genes Mo36, Moog y Moo4. La letras minúsculas indican los amplicones esperados (a), Mo36, 2,2 kpb; (b), Moog, 1,7 kpb; (c), Moo4, 0,7 kpb. Las amplificaciones se realizaron en ausencia de molde (-) o en presencia de DNA de la cepa Lausanne (Lu) o la cepa vacunal comercial de tipo A (V). (M) marcadores de tamaño del DNA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Alda F, Gaitero T, Suárez M, Doadrio I. Molecular characterisation and recent evolution of myxoma virus in Spain. Arch Virol. 2009 Sep 21.
- Bárcena J, Pagés-Manté A, March R, Morales M, Ramírez MA, Sánchez-Vizcaino JM, Torres JM. solution of an attenuated myxoma virus field strain that can confer protection against myxomatosis on contacts of vaccinates. Arch Virol. 2000;145(4):759-71.
- Cameron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L., Barrett, J., Cao, J.X., Macaulay, C., Willer, D., Evans, D., McFadden, G., 1999. The complete DNA sequence of myxoma virus. Virology 264, 298-318.
- Guerin , J.L., Petit, F. Van Es, A. Gelfi, J. Py, R. Bertagnoli, S. Boucraut-Baralon, C. 1998. Analyse moléculaire des souches vaccinales SG33 et Poxlap du virus myxomatoux: implications prophylactiques et épidémiologiques. 7èmes Journ. Rech. Cunicole Fr., pp.53-56
- Kerr, P.J., Merchant, J.C., Silvers, L., Hood, G.M., Robinson, A.J., 2003. Monitoring the spread of myxoma virus in rabbit *Oryctolagus cuniculus* populations on the southern tablelands of New South Wales, Australia. II. Selection of a strain of virus for release. Epidemiol. Infect. 130, 123-133.
- Morales, M., Ramírez, M.A., Cano, M.J., Parraga, M., Castilla, J., Perez-Ordoy, L.I., Torres, J.M., Barcena, J., 2009. Genome comparison of a nonpathogenic myxoma virus field strain with its ancestor, the virulent Lausanne strain. J. Virol. 83, 2397-2403.
- Muller A, Silva E, Abrantes J, Esteves PJ, Ferreira PG, Carvalheira JC, Nowotny N, Thompson G. Partial sequencing of recent Portuguese myxoma virus field isolates exhibits a high degree of genetic stability. Vet Microbiol. 2009 Aug 8.
- Saint KM, French N, Kerr P, 2001. Genetic variation in Australian isolates of myxoma virus: an evolutionary and epidemiological study. Arch Virol. 2001; 146, 1105-1123.