

Estudio de patógenos, virus de la mixomatosis, RHDV y coccidios, que afectan al conejo, *Oryctolagus cuniculus*, en Tenerife.

Study of pathogens, myxomatosis virus, RHDV and coccidia that affect to rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, in Tenerife.



Trabajo de Fin de Grado

Natalia Martín Carrillo

Tutores: José María Fernández Palacios y Pilar Foronda Rodríguez.

Julio 2018.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 PRINCIPALES PATÓGENOS DEL CONEJO SILVESTRE.	2
□ 1.1.1 VIRUS DE LA MIXOMATOSIS.	2
□ 1.1.2 VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO (RHDV).	4
□ 1.1.3 COCCIDIOS.	5
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1 MATERIAL DE ESTUDIO.	6
3.2 OBTENCIÓN DE DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS:	7
3.3 PRUEBAS REALIZADAS.	8
3.3.1 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A MIXOMATOSIS.	8
3.3.2 DETECCIÓN ANTICUERPOS FRENTE RHDV.	8
3.3.3 DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE RHDV.	8
3.3.4 CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS RHDV.	9
3.3.5 IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE COCCIDIOS DE CONEJOS DE TENERIFE.	10
3.3.6 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.	11
3.3.7 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN.	11
3.3.8 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN.	12
3.3.9 ESTADÍSTICA.	12
4. RESULTADOS	12
4.1 MIXOMATOSIS: ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE A LA MIXOMATOSIS.	12
4.2 ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO: ESTUDIO DE SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE A LA RHD.	13
4.3 ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO: ESTUDIO DE ANTÍGENOS DE RHDV EN CONEJOS.	15
4.4 ENFERMEDAD HEMORRÁGICA DEL CONEJO: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE RHDV EN CONEJOS DE TENERIFE.	17
4.5 COCCIDIOSIS	18
4.5.1 DETERMINACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS MORFOLÓGICAS.	18
5. DISCUSIÓN	19
5.1. RHDV2 EN CONEJOS DE TENERIFE.	20
5.2 PRESENCIA DE INDIVIDUOS CON ANTICUERPOS FRENTE ALA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA	22
5.3 PAPEL DE LOS COCCIDIOS EN LAS POBLACIONES DE CONEJOS DE TENERIFE	23
6. CONCLUSIONES	24
7. CONCLUSSIONS	25
8. AGRADECIMIENTOS	26
9. BIBLIOGRAFÍA	26

Resumen:

El conejo europeo, *Oryctolagus cuniculus*, fue introducido en Canarias y actualmente es una especie de gran importancia cinegética, que presenta una serie de patologías de diferente naturaleza causando la merma de las poblaciones. En este trabajo se ha realizado el estudio de la situación de diversos patógenos que afectan a las poblaciones de conejos en la isla de Tenerife. Desde la década de los 90' se habían realizado estudios enfocados principalmente a las enfermedades víricas causantes de la mayor tasa de mortalidad. Con la realización de este estudio se ha comprobado, por un lado, un gran descenso en la prevalencia de la mixomatosis con respecto a los estudios anteriores. Sin embargo, respecto a la enfermedad hemorrágica, se ha podido comprobar un aumento en la prevalencia, que puede estar causando una mayor mortalidad en estos animales. Por otro lado, se ha detectado que la cepa clásica de este último virus, está siendo desplazada por una nueva variante denominada RHDV2, identificada por primera vez en la isla de Tenerife en este estudio. Finalmente, las infecciones por coccidios parásitos han demostrado tener una mayor incidencia de la que se le atribuía, pudiendo ser una de las principales causas de merma de las poblaciones de conejos en gran parte del territorio de la isla de Tenerife. **Palabras claves:** *Oryctolagus cuniculus*, mixomatosis, enfermedad hemorrágica del conejo, RHDV2, Coccidios, Tenerife.

Abstract

The rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, was introduced to the Canary Islands and nowadays it is of hunting importance, that is affected by different pathogens, causing the decline of populations. In this study, we analyzed the current state of different pathogens that affect to rabbit populations of Tenerife. Since the 90' several studies have been carried out mainly focused on the viral diseases causing the highest mortality. In this study, we found a decrease of Myxomatosis prevalence. However, the prevalence of Rabbit Hemorrhagic Fever found was higher, which may cause greater mortality in these animals. On the other hand, it has been detected the classical strain of this last virus is being displaced by a new variant called RHDV2, identified for the first time on the island of Tenerife in this study. Finally, infections caused by parasitic coccidia have been shown to have a greater incidence, and may be one of the main causes of decrease in rabbit populations in a large part of the territory of Tenerife. **Keywords:** *Oryctolagus cuniculus*, myxomatosis, rabbit hemorrhagic disease, RHDV2, Coccidia, Tenerife.

1. Introducción.

El conejo europeo, *Oryctolagus cuniculus* (L.), fue introducido en las Islas Canarias durante la conquista del archipiélago en el siglo XV (De Abreu, 1995), y aunque los datos acerca de su abundancia son limitados (Martín *et al.*, 2003; Cabrera-Rodríguez, 2008), se encuentran presentes en todos los hábitats de las principales islas, estando también en los islotes de Lobos, La Graciosa y Alegranza. Por otro lado, han sido erradicados de Montaña Clara (Martín *et al.*, 2002). En Tenerife, el conejo silvestre ha colonizado con éxito la mayoría de los hábitats de la isla, prefiriendo espacios abiertos con vegetación de tipo herbáceo y matorral, como son las zonas cercanas a cultivos e incluso alcanzando las Cañadas del Teide (Foronda *et al.*, 2005).

En el año 1996 se comenzó a observar conejos de Tenerife con síntomas de las enfermedades víricas, la mixomatosis y la enfermedad hemorrágica del conejo. Estudios previos analizaron las prevalencias de estas dos enfermedades víricas además parasitarias del conejo silvestre en Tenerife (Foronda *et al.*, 2005).

1.1 Principales patógenos del conejo silvestre.

– 1.1.1 Virus de la mixomatosis.

La mixomatosis fue descrita originalmente tras un brote en conejos de laboratorio en Montevideo (Uruguay) en 1896 (Fenner y Ratcliffe, 1965; Sanarelli, 1898). En España, los primeros focos se registraron en el año 1953, penetrando la enfermedad a través de los Pirineos (Sánchez Botjia *et al.*, 1954).

La enfermedad está producida por el Myxoma virus, que es la especie tipo del género *Leporipoxviruses* englobado en los *Chordopoxvirinae*. Se caracteriza por ser una enfermedad que, en el conejo europeo, evoluciona rápidamente hacia la muerte tras la aparición de lesiones pseudotumorales inflamatorias y exudativas localizadas en cabeza, tórax, abdomen y genitales. En las especies de hospedadores nativas de Sudamérica, del género *Sylvilagus*, el virus causa una enfermedad leve.

Los síntomas clínicos de la mixomatosis en conejos dependen de la virulencia de las cepas implicadas. Las cepas del virus se clasifican en 5 grados de virulencia (1-5), siendo el grado 1 el más virulento y el 5 el más atenuado, en relación al tiempo medio de supervivencia de los conejos tras la infección (Fenner y Marshall, 1957). La mortalidad de esta enfermedad varía en función de las cepas del virus, pero se puede decir que de forma general es del 90%, aunque en las cepas de grado 4 y 5 la mortalidad puede disminuir considerablemente, estando entre el 23% y el 60%, y los conejos afectados

presentan un tiempo de supervivencia superior a las 4 semanas. Hasta el momento se desconoce qué cepas son las que se encuentran presentes en las Islas Canarias.

Normalmente los síntomas aparecen aproximadamente cuatro días después de la infección e incluyen una inflamación de la conjuntiva. A los 6 días aproximadamente, el conejo presenta una hinchazón en la zona genital y lesiones papulares cutáneas en cara y orejas, acompañada de una secreción primero serosa y luego mucopurulenta por las fosas nasales y la conjuntiva (Fenner y Ratcliffe, 1965; Best y Kerr, 2000). Tras los 8-10 días de infección, los individuos presentan la cabeza y cara hinchadas, y rinitis mucopurulenta (Figura 1). Aparecen también numerosas hinchazones cutáneas (denominadas ocasionalmente tumores o mixomas). En machos, suele haber edema en el escroto (Figura 1). La muerte tiene lugar típicamente entre 8 y 12 días después de la infección.

Los conejos enfermos, principalmente en la fase aguda, excretan cantidades importantes del virus por los exudados de los pseudotumores, y al morir son una fuente indirecta de transmisión del virus ya que pueden contaminar el ambiente, forraje, madrigueras, etc.



Figura 1. Mixomatosis en el conejo europeo. (A) Mixomatosis aguda, cabeza y párpados hinchados, conjuntivitis mucopurulenta y rinitis [<http://conejowwf.es/biologia/>]

La existencia de diferentes tipos de vectores de transmisión hace imposible la erradicación de la mixomatosis de las regiones donde se implanta. En algunas zonas los vectores son mosquitos, y en otras, pulgas y piojos, aunque estos últimos están considerados como vectores de baja calidad (Joubert *et al.*, 1973). Las madrigueras son consideradas los reservorios perennes naturales y de mayor importancia para el mantenimiento del virus en el tiempo (Joubert *et al.*, 1982; Chapuis *et al.*, 1994). Existen

otras vías de transmisión, las vías ocular, respiratoria y genital que presenta una mayor importancia.

– **1.1.2 Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV).**

El primer brote de la enfermedad hemorrágica del conejo fue declarado en China, en la provincia de Jiansu, en el año 1984, donde murieron prácticamente el 100% de los reproductores, pero no los gazapos. La enfermedad fue denominada “Viral Haemorrhagic Disease”, o “Enfermedad Vírica-Hemorrágica” (RHD). En menos de un año tras su primera detección, la RHD mató 140 millones de conejos en China y se dispersó sobre un área de 50.000 km² (Du *et al.*, 1991). En la Península Ibérica, de donde son originarios los conejos europeos, el primer brote de RHD data de 1988 en España (Argüello *et al.*, 1988) y de 1989 en Portugal.

El virus de la enfermedad hemorrágica (RHDV) que afecta a lepóridos pertenece a la especie *Lagovirus europaeus* de la familia Caliciviridae (Le Pendu *et al.*, 2017). La enfermedad presenta elevadas tasas de mortalidad, de entre el 70%-100%. Las lesiones más relevantes causadas por la infección de este virus son la hiperemia, hemorragias difusas, degeneración del hígado, necrosis y esplenomegalia (Xu y Chen, 1989). Los síntomas que han caracterizado a la RHD son los producidos en el síndrome hemorrágico sobreagudo con fiebre, produciéndose la muerte en uno o tres días tras la infección en los conejos de más de 8 semanas de edad. En el estadio final de la enfermedad, normalmente entre 36 y 48 horas post-infección, aparecen postrados y con episodios convulsivos, a la vez que emiten un fuerte chillido. Este virus es muy resistente a las condiciones ambientales, por lo que puede permanecer viable en el hígado del hospedador muerto incluso hasta tres meses.

Esta enfermedad se transmite por contacto directo con animales infectados, así como por fómites. La transmisión puede ser vía oral, nasal o conjuntival (Rosell *et al.*, 1990; Murganza, 1994). Las fuentes de infección pueden ser los animales enfermos en fase aguda, o subaguda y crónica, al excretar el virus a través de las secreciones y excreciones. La transmisión indirecta también es posible debido a la alta resistencia al virus en el medio externo.

En 2010, una variante del RHDV fue detectada en Francia durante unos brotes de enfermedad hemorrágica entre conejos vacunados. Estudios complementarios sobre esta variante del virus indicaron que la misma no pudo haber evolucionado del RHDV, sino que representaba un nuevo virus originado a partir de una especie viral desconocida, lo que llevó a Le Gall-Reculé *et al.* (2013) a proponer esta variante como una nueva especie

de *Lagovirus*, denominada RHDV2. Mientras que la variante RHDV no afecta a los gazapos, esta nueva variante sí presenta la capacidad de infectar a individuos jóvenes.

– 1.1.3 Coccidios.

La coccidiosis en conejos es causada por protozoos parásitos intracelulares del género *Eimeria*. En estos animales, dicha enfermedad parasitaria causa importantes pérdidas económicas debido a las altas tasas de infección y mortalidad. La infección por *Eimeria* spp., es una de las enfermedades parasitarias más comunes y frecuentes en conejos, y suele venir acompañada de pérdida de peso, diarrea con moco o sangre que puede derivar en un proceso de deshidratación del individuo y reducción del número de crías (Jithendran *et al.*, 1996). El ciclo de vida de los coccidios es directo, por lo que no necesitan ningún otro hospedador para completar su ciclo de vida. El conejo infectado libera ooquistes no esporulados con las heces, los cuales tardan de 25 a 60 horas en esporular, en función de la especie.

Las diferentes especies de coccidios que afectan al conejo difieren en su patogenicidad. Entre las 11 especies validadas de *Eimeria*, *Eimeria stiedai*, *Eimeria intestinalis*, y *Eimeria flavescens* son de elevada patogenicidad para los conejos, especialmente para aquellos con menos de tres meses de vida (Pakandl, 2009).

2. Objetivos.

Considerando que los últimos estudios realizados sobre virus y coccidios, mencionados en la isla de Tenerife datan del año 2005, además del desconocimiento de la cepa vírica presente en la isla de Tenerife de la RHD, y la falta de datos de la identidad de los protozoos que afectan al conejo europeo en esta isla, los objetivos que se plantearon en el presente estudio se citan a continuación:

1. Estudiar la seroprevalencia de las enfermedades víricas mixomatosis y RHD, respecto a las enfermedades víricas mencionadas, de las poblaciones de conejo europeo de la isla de Tenerife.
2. Identificar las especies de protozoos que afectan a los conejos en Tenerife.
3. Analizar la evolución de los patógenos causantes de la mixomatosis, enfermedad hemorrágica del conejo y coccidiosis que afectan a las poblaciones de conejos europeos de la isla de Tenerife.
4. Caracterizar el agente causal de la enfermedad hemorrágica del conejo en Tenerife.

3. Material y métodos.

3.1 Material de estudio.

Durante los años 2015 y 2017 se obtuvieron 193 muestras de conejos silvestres y de granja de la mayoría de municipios de la isla de Tenerife (Figura 2).

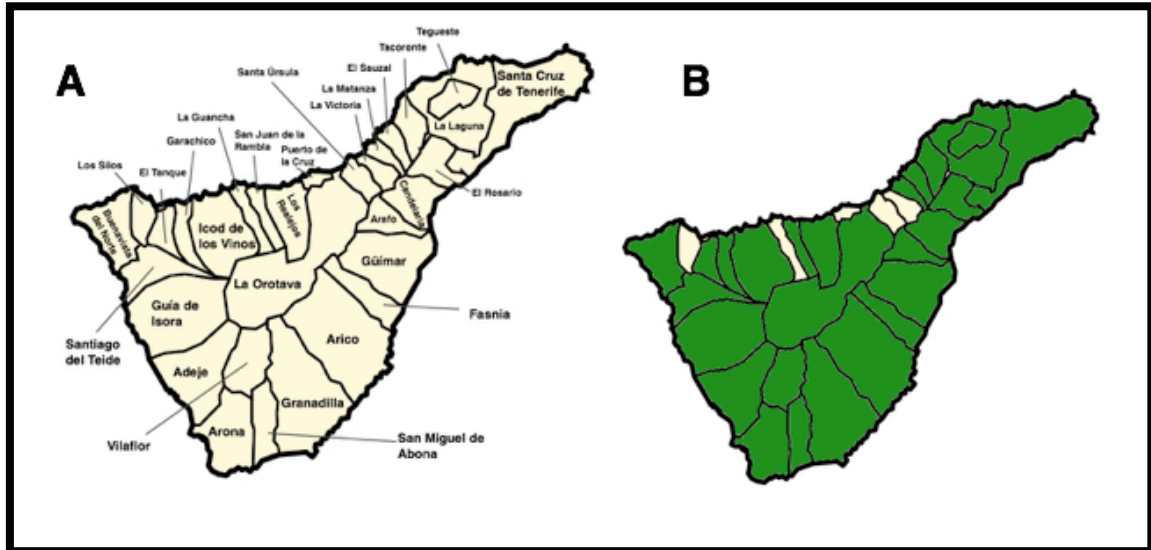


Figura 2. Municipios de Tenerife (A), municipios estudiados (en verde) (B).

Los individuos estudiados en este proyecto pertenecen a tres grupos:

- Grupo 1: individuos muertos hallados en el campo. Éstos fueron procesados, para la obtención de muestras de hígado y heces. Se analizó la posible existencia de manifestaciones histopatológicas que sugiriesen la presencia de RHDV o del virus de la mixomatosis (Figura 3).
- Grupo 2: individuos muertos o vísceras cedidos por cazadores. Los individuos fueron diseccionados para la obtención de muestra de hígado y heces. Se analizó la posible existencia de manifestaciones histopatológicas que sugiriesen la presencia de RHDV o del virus de la mixomatosis.
- Grupo 3: individuos vivos, capturados mediante trampas Tomahawk (Figura 4) que fueron soltados tras la toma de las muestras.

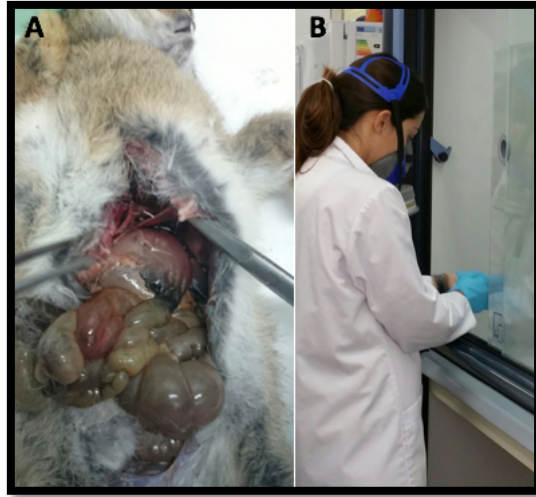


Figura 3. A) Disección de zona abdominal. B) Personal investigador procesando muestras.



Figura 4. Trampeo llevado a cabo con trampa Tomahawk.

3.2 Obtención de diferentes tipos de muestras:

Para llevar a cabo el estudio se obtuvieron las siguientes muestras:

- **Suero:** el suero fue obtenido de 73 individuos pertenecientes al grupo 3. La extracción de sangre se realiza a través de la vena marginal de la oreja mediante una aguja hipodérmica (BD Microlance™ 3, 0,6 x 25 mm/23G 1”-Nr.16) (Figura 5), la sangre es contenida en tubos de 1,5mL. Una vez extraída se mantiene a 4°C durante 24 horas para favorecer la separación del suero. Posteriormente, se centrifuga a 3.500 rpm durante 10 minutos, para obtener el suero, que se mezcla con glicerol en proporción 1:1 para su almacenamiento a -20°C. Los sueros se utilizan para la determinación de anticuerpos frente a RHDV y mixomatosis.
- **Hígado:** se obtuvo 90 muestras de hígado de los ejemplares pertenecientes a los grupos 1 y 2. De estas muestras se conservaron fragmentos en “ARN Later” (Ambion), durante 24 horas a 4°C y luego a -20°C, para la detección del antígeno de RHDV y posterior extracción de ARN vírico de los casos positivos frente a antígeno.

- **Heces:** se obtuvieron 110 muestras de heces del tracto intestinal de los individuos muertos de los grupos 1 y 2, y de la trampa en el caso de los ejemplares del grupo 3. Además, se obtuvieron muestras ambientales durante las jornadas de trampeo, se recogían aquellas heces que presentaban el aspecto de deposiciones frescas. Las muestras se almacenaron en tubos de 1,5mL que contenía dricromato potásico al 2,5%, estas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 3 días, para permitir la esporulación de los quistes. Pasado este periodo se almacenaban las muestras a 4°C hasta el análisis de coccidios.



Figura 5. Extracción de sangre de vena marginal de la oreja con aguja hipodérmica.

3.3 Pruebas realizadas.

3.3.1 Detección de anticuerpos frente a mixomatosis.

Se llevó a cabo la detección de anticuerpos frente al virus de la mixomatosis usando el kit *INgezim* mixomatosis (Ingenasa), basado en un Test ELISA indirecto, y siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.2 Detección de anticuerpos frente RHDV.

Se detectó la presencia de anticuerpos frente a RHDV en las muestras de suero de los conejos del grupo 3, mediante un Test ELISA, a través del kit *INgezim RHDV* (Ingenasa), siguiendo las instrucciones del fabricante. Dicho kit está basado en la técnica de ELISA indirecta.

3.3.3 Detección de antígenos de RHDV.

La detección del RHDV fue llevada a cabo a partir de las muestras de hígado de los conejos de los grupos 2 y 3, mediante ensayos ELISA utilizando el kit *INGEZIM RHDV DAS* (Ingenasa), según las instrucciones del fabricante.

3.3.4 Caracterización del virus RHDV.

– Extracción RNA total.

Se procedió a realizar la extracción del ARN total de la muestra de hígado positivas para el antígeno RHDV mediante el kit *mirVana™ miRNA Isolation Kit* (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total resultante de este proceso, se dividió en varios tubos que fueron almacenados a -20°C y a -80°C hasta su análisis.

– Cuantificación del RNA total.

Tras la extracción del ARN total, el pool de ácidos nucleicos fue cuantificado mediante absorbancia a 260nm y su pureza fue valorada mediante el cociente de absorbancia 260/280nm con un espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (Thermo Scientific).

– Retrotranscripción de ARN total a ADN complementario y amplificación del gen *vp60*.

La retrotranscripción fue llevada a cabo mediante el kit *SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), según las condiciones del fabricante, y con los cebadores RC10 y Upstream *vp60*. La amplificación del gen completo *vp60* fue llevada a cabo según Duarte *et al.* (2014) con algunas modificaciones, empleando 2µl de cDNA y 25pmol de cada cebador. Los diferentes cebadores empleados para la amplificación del gen *vp60*, así como los usados para la secuenciación, se detallan en la Tabla 1. Tras un paso inicial de 30 minutos a 55°C en los que se produce la retrotranscripción, el programa continúa con las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización previa de 2 minutos a 95°C seguido de 50 ciclos que constan de un paso de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, un paso de anillamiento a 50°C durante 30 segundos y un paso de extensión a 72°C durante 2 minutos.

Tabla 1. Cebadores empleados en este estudio.

Cebador	Secuencia	Sentido	Referencia	Uso en este estudio
RC10	GCGCCTGCAAGTCCCAATCC	Antisentido	Tham <i>et al.</i> (1999)	Amplificación/secuenciación
Upstream <i>vp60</i>	AAGAGAGTCGTCTCGGTAGTA	Sentido	Duarte <i>et al.</i> (2014)	Amplificación/secuenciación
RC9	ATCATGTTCGCGTCTGTCGTCAGG	Sentido	Tham <i>et al.</i> (1999)	Secuenciación

Los fragmentos de 1,7 Kb fueron cortados del gel de agarosa y purificados (apartado 3.3.7). Con el purificado se realizó una PCR semianidada con los cebadores RC9 y RC10 para obtener fragmentos de menor tamaño. Tras un paso de desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, se llevan a cabo 35 ciclos que constan de un paso de desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, un paso de anillamiento a 65°C durante 30 segundos y un paso de extensión a 72°C durante 2 minutos, con un paso final de extensión de 72°C durante 10 minutos. Los resultados obtenidos se analizaron según los apartados 3.3.6 a 3.3.8.

3.3.5 Identificación de las especies de coccidios de conejos de Tenerife.

– Concentración por flotación en sacarosa de Sheather.

Para determinar la presencia de coccidios en heces, se llevó a cabo el método de concentración por flotación en sacarosa de Sheather ($\delta = 1.30$) (Sheather, 1923), luego se realizó la observación bajo microscopio óptico, para la búsqueda de los ooquistes. Las muestras positivas fueron almacenadas a -20°C para estudios moleculares posteriores.

– Identificación de coccidios mediante microscopía óptica.

Los coccidios se pueden identificar en base a los índices morfométricos y morfológicos de los ooquistes esporulados (Duszynski y Wilber, 1997).

Las especies del género *Eimeria* pueden ser identificadas en base al tamaño, forma, presencia de residuos de ooquistes y de esporoquistes, color y ancho del micropilo (Hobbs y Twigg, 1998), dichos parámetros se pueden ver detallados en la tabla 2. La determinación de las especies fue acompañada de técnicas de biología molecular.

Tabla 2. Características de los ooquistes esporulados de las especies de *Eimeria* de conejos silvestres (Hobbs y Twigg, 1998).

Especie de <i>Eimeria</i>	Ooquiste		Esporoquiste		Residuo ooquiste	Residuo esporoquiste
	Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo (µm)	Ancho (µm)		
<i>E. exigua</i>	16.0 (12-19)	13.0 (11-15)	8.5 (6-10)	5.1 (4.5-6)	-	-
<i>E. perforans</i>	22.3 (17-38)	14.1 (11.5-17)	10.5 (8-14)	5.7 (5-7)	+ (pequeño)	-
<i>E. intestinalis</i>	29.1 (26-34)	18.2 (16-20)	12.9 (11-14)	7.2 (6-8)	+	-
<i>E. piriformis</i>	31.6 (24-36)	19.7 (18-21)	12.7 (11-14)	7.8 (7-9)	-	Pequeños gránulos
<i>E. media</i>	29.1 (23-34)	17.2 (14-20)	13.9 (11-16)	7.1 (6-9)	+	-
<i>E. flavescens</i>	32.1 (27-37)	21.4 (20-23)	14.6 (12-17)	8.4 (8-9)	-	+
<i>E. magna</i>	35.2 (30-42)	21.8 (18-26)	15.3 (14-18)	8.5 (7-10)	+	+
<i>E. stiedai</i>	36.2 (34-40)	20.6 (18-22)	15.5 (14-17)	8.3 (7.5-9)	± (pequeño)	+
<i>E. irresidua</i>	39.1 (35-45)	24.3 (21-27)	18.7 (16-21)	9.7 (9-11)	-	+
<i>E. coecicola</i>	34.5 (29.5-42)	18.5 (16-20)	14.5 (13-16)	7.7 (7-9)	+	±

– **Identificación por biología molecular de las especies de *Eimeria*.**

Debido a que la patogenicidad de *Eimeria* depende de la especie infectante, se procedió a la caracterización molecular de los aislados para su confirmación.

El pool de ácidos nucleicos de las heces de conejos fue extraído mediante el kit *ZR Soil Microbe DNA Miniprep* (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se llevó a cabo una PCR múltiple basada en el estudio de Yan et al. (2013), capaz de detectar simultáneamente a las tres especies de mayor interés desde el punto de vista de la patología en conejos: *Eimeria intestinalis*, *Eimeria flavescens* y *Eimeria stiedai*.

Las reacciones de PCR múltiple fueron llevadas a cabo en un volumen final de 25µl con 1µl de ADN molde, 0.5µM de cada primer (Es1F/R para *E. stiedai*, Ei1F/R para *E. intestinalis* y Ef2F/R para *E. flavescens*). Estas reacciones fueron llevadas a cabo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización durante 5 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 94°C, anillamiento durante 30 segundos a 58.8°C y extensión durante un minuto a 72°C, y un paso de extensión final de 72°C durante 10 minutos.

3.3.6 Electroforesis en gel de agarosa.

Los productos de PCR obtenidos del virus RHDV y los coccidios fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa (Agarose D1 Low EEO, PRONADISA) sumergidos en tampón TAE, empleando cubetas de desarrollo horizontal (Bio-Rad). El porcentaje de agarosa fue para todos los casos de 1,5%. Se utilizaron diferentes patrones de peso molecular en función del tamaño del amplificado, estos fueron *DNA Molecular Weight Marker XVII* (500 bp ladder) (Sigma-Aldrich) y *BenchTop 100bp DNA Ladder* (Promega)

Para la visualización del ADN, se añadió al gel 1µl de *Real-Safe* (REAL, Durviz) por cada 50 mL de gel, y se observó a través de un transiluminador de luz UV. La documentación fotográfica se obtuvo con el equipo *ChemiDoc™ XRS+* (Bio-Rad).

3.3.7 Purificación de los productos de amplificación.

Las bandas cortadas del gel de agarosa que contenían los amplificados del virus RHDV que presentaban el tamaño de interés fueron purificadas con el kit *E.Z.N.A Gel Extraction Kit* (Omega bio-tek), bajo las condiciones del fabricante.

3.3.8 Secuenciación de los productos de amplificación.

Los productos purificados fueron secuenciados en la empresa Macrogen Inc. (Corea) y en el Servicio General de Apoyo a la Investigación (SEGAI) de la Universidad de La Laguna. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron editadas con el programa MEGA v6.03 (Tamura *et al.*, 2013) y posteriormente alineadas con el programa Clustal-W incluido en MEGA v6.03. Las variantes víricas fueron identificadas en base a las secuencias nucleotídicas, que fueron analizadas mediante el programa informático BLAST, con el fin de establecer la homología con las secuencias ya presentes en la base de datos del GenBank.

3.3.9 Estadística.

Los análisis estadísticos para las seroprevalencias de las enfermedades víricas, se realizaron mediante el Test de Chi-Cuadrado ($p < 0,01$), o el Test Exacto de Fisher en caso de que el valor esperado fuera inferior a 5. Se elaboraron gráficos de dispersión con los valores de densidad óptica obtenidos con los ensayos ELISA, mediante el uso del software SPSS versión 20.

4. RESULTADOS.

4.1 Mixomatosis: Estudio de seroprevalencia de la mixomatosis.

De los 73 conejos analizados para la presencia de anticuerpos frente al virus de la mixomatosis, dos individuos, procedentes de los municipios de Güímar y Fasnía fueron positivos (Figura 6), siendo la seroprevalencia general de 2,7%. Todos los individuos estudiados pertenecen al grupo 3.

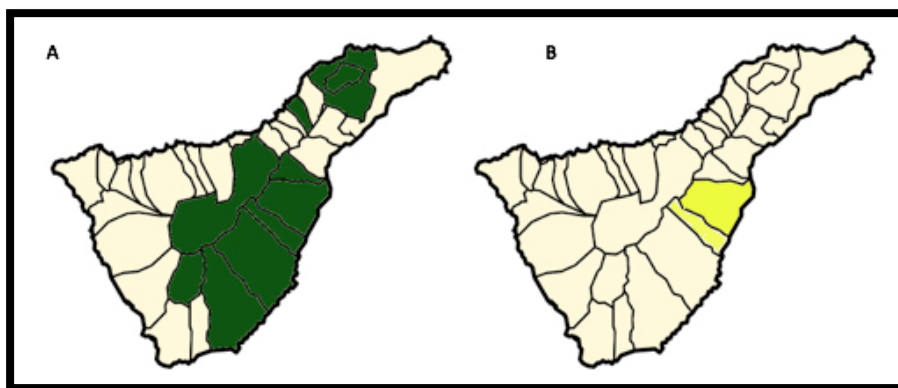


Figura 6. Municipios estudiados para la seroprevalencia de la mixomatosis (A) y municipios donde se encontraron resultados positivos (B).

Se llevaron a cabo varios ensayos serológicos para la búsqueda de anticuerpos frente a la mixomatosis. En la figura 7, podemos observar los valores de densidades

ópticas obtenidos de cada una de las muestras analizadas, y la procedencia de éstas. Sólo dos de las muestras han superado el valor *cut-off*, a partir del cual se consideran positivas.

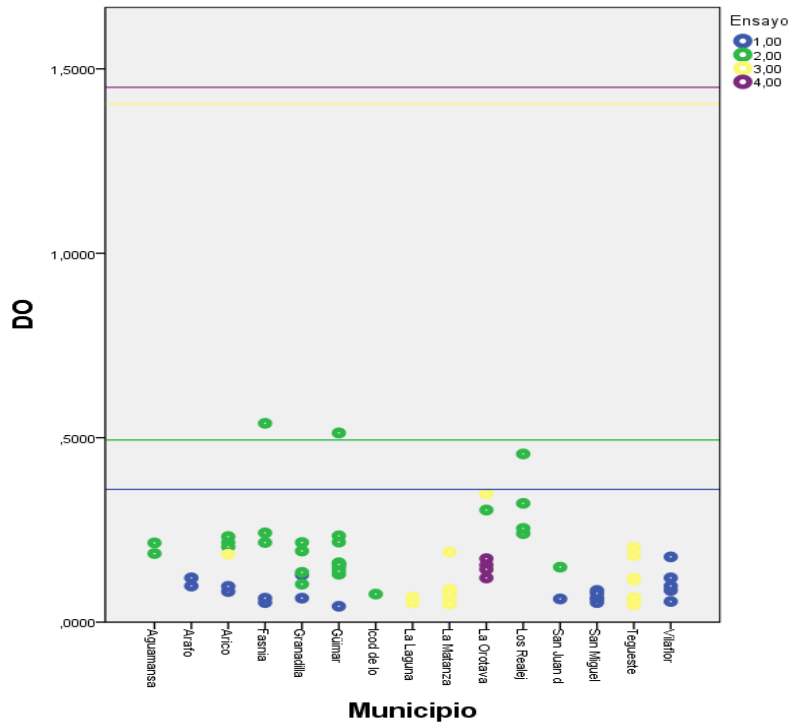


Figura 7. Valores de densidad óptica (DO) obtenidos por muestra y municipio, en cada uno de los ensayos ELISA realizados. Se diferencia por color cada ensayo y su *cut-off* respectivo (líneas horizontales).

4.2 Enfermedad hemorrágica del conejo: Estudio de seroprevalencia de anticuerpos frente a la RHD.

De los 72 conejos analizados para la búsqueda de anticuerpos frente al virus de la enfermedad hemorrágica del conejo, 14 de ellos resultaron ser seropositivos, por lo que la seroprevalencia general hallada en este estudio fue del 19,4%. Todos los individuos estudiados pertenecen al grupo 3 y abarcan municipios tanto de la zona norte como de la zona sur de Tenerife (Figura 8).

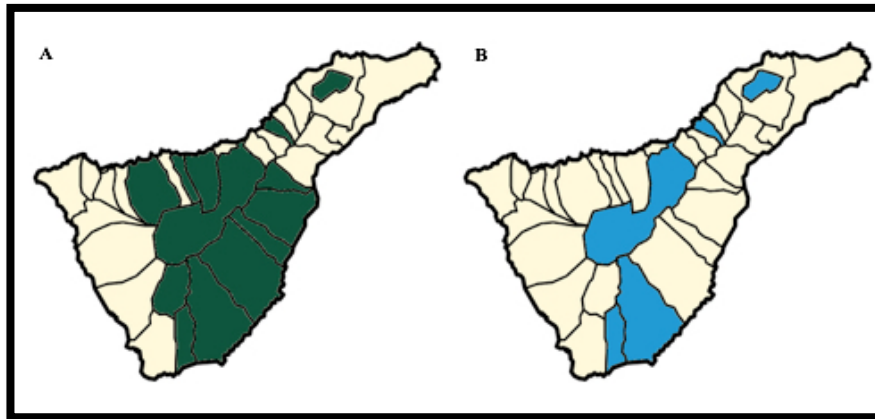


Figura 8. Municipios estudiados para la búsqueda de anticuerpos frente a RHDV (A). Municipios con resultados positivos (B).

Se realizaron varios ensayos serológicos para la búsqueda de anticuerpos frente a la RHDV. En la figura 9, podemos observar los valores de densidades ópticas obtenidos de cada una de las muestras analizadas, y su procedencia. Catorce muestras superaron el *cut-off*, a partir del cual se consideran positivas. Para estos ensayos ELISA de detección de anticuerpos frente a RHDV, el valor de *cut-off* es de 0,300, indicado así por el fabricante.

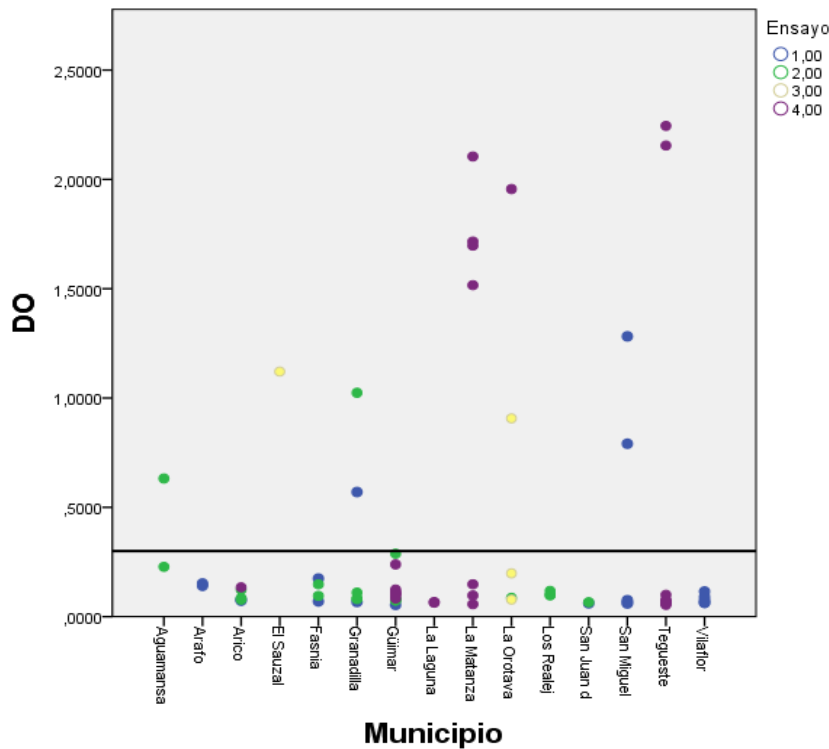


Figura 9. Valores de densidad óptica (DO) obtenidos por muestra y municipio, en cada uno de los ensayos ELISA frente a RHDV. La línea horizontal representa al *cut-off* = 0,300.

Comparación de seroprevalencias entre las enfermedades víricas

Con el análisis de Chi-Cuadrado se confirmó que actualmente la enfermedad hemorrágica tiene una prevalencia significativamente mayor ($p < 0,01$) que la mixomatosis en Tenerife.

4.3 Enfermedad hemorrágica del conejo: Estudio de antígenos de RHDV en conejos.

El análisis de la presencia del antígeno *vp60* de RHDV se realizó utilizando muestras de hígados de los conejos pertenecientes a los grupos 1 y 2. En total se analizaron 90 muestras, de las cuales 50 mostraron un resultado positivo indicando esto una prevalencia general del virus de la enfermedad hemorrágica del 50,55%. Los municipios estudiados abarcan casi toda la totalidad de la isla de Tenerife como podemos ver reflejado en la Figura 10A. Los conejos positivos frente al antígeno del virus de la enfermedad hemorrágica se encuentran repartidos también por casi todo el territorio de la isla (Figura 10B).

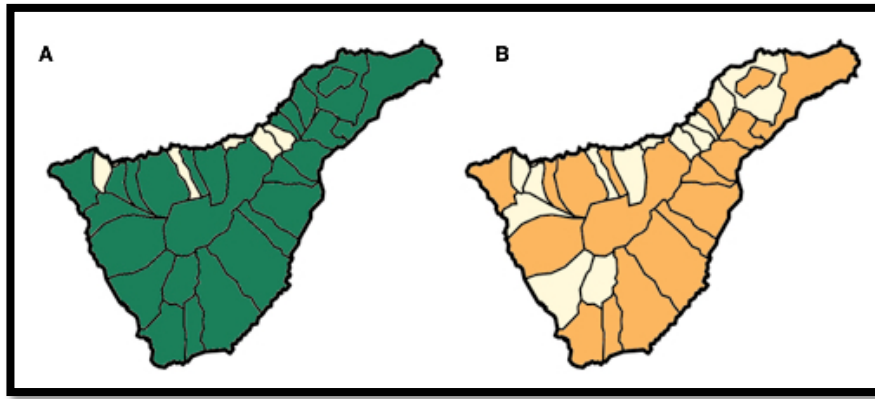


Figura 10. Municipios estudiados para la presencia de antígeno *vp60* de RHDV (A) y municipios donde se obtuvieron individuos positivos para antígeno *vp60* de RHDV (B).

Se realizaron varios ensayos serológicos para la búsqueda de antígenos del virus RHDV. En la figura 11, podemos observar los valores de densidades ópticas obtenidos de cada una de las muestras analizadas, y su procedencia. Cincuenta muestras superaron el *cut-off*, a partir del cual se consideran positivas.

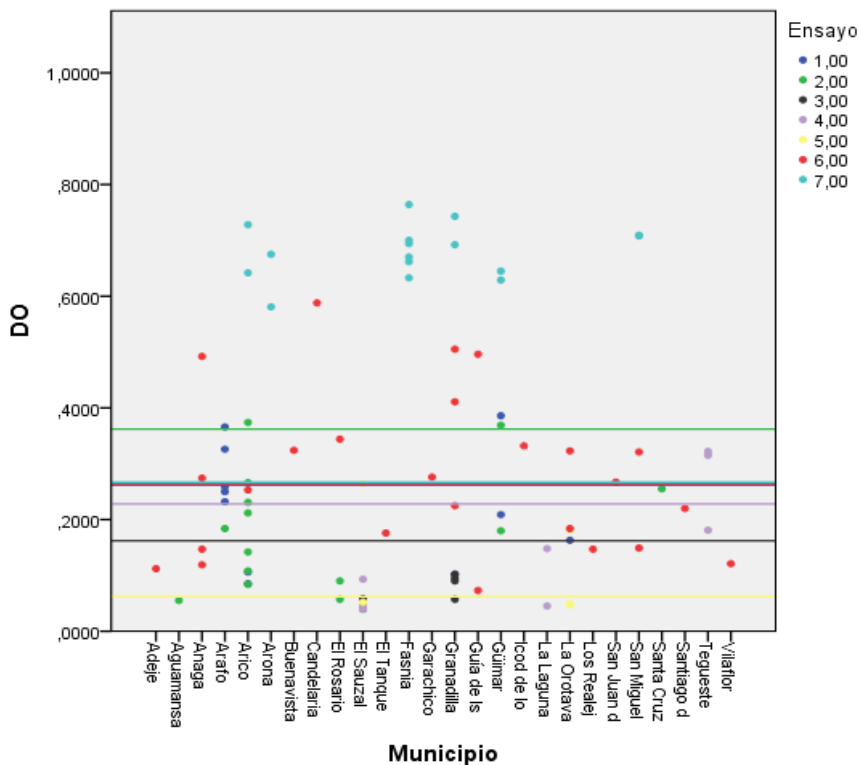


Figura 11. Valores de densidad óptica (DO) obtenidos de los ensayos ELISA para la detección del antígeno del RHDV. Los resultados de DO se presentan con diferentes colores para cada ensayo con su línea de *cut-off* correspondiente.

4.4 Enfermedad hemorrágica del conejo: Caracterización molecular de RHDV en conejos de Tenerife.

Se llevó a cabo la extracción de ARN total de las muestras positivas para el antígeno del virus RHDV. Posteriormente, se amplificó el gen *vp60* con los cebadores Upstream *vp60* y RC10. Como resultado, se obtuvieron amplicones de aproximadamente 1,7 Kb (Figura 12), que fueron cortados del gel de agarosa y purificados (ver 3.3.6 y 3.3.7). De algunas muestras se obtuvieron amplicones con baja intensidad, debido probablemente a la degradación de los ácidos nucleicos presentes en las muestras de partida, lo que impidió obtener un mayor número de secuencias aptas para la caracterización del virus.

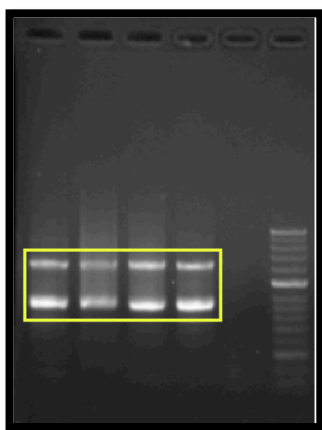


Figura 12. Producto de la amplificación del gen *vp60* con los cebadores Upstream *vp60* y RC10. Carril 1-4: productos de PCR obtenidos a partir del ARN extraído de las muestras de hígado positivas para el antígeno del RHDV; Carril 5: control negativo; Carril 6: marcador de peso molecular *DNA Molecular Weight Marker XVII* (500 bp ladder) (Sigma-Aldrich). Las bandas de interés están encuadradas en un rectángulo de color amarillo.

Después del proceso de purificación, se realizó paralelamente una PCR semianidada con los cebadores RC9 y R10, utilizando como ADN molde 2 μ l de producto purificado. Como resultado, se obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 400 pb (Figura 13), que fueron purificados y secuenciados.

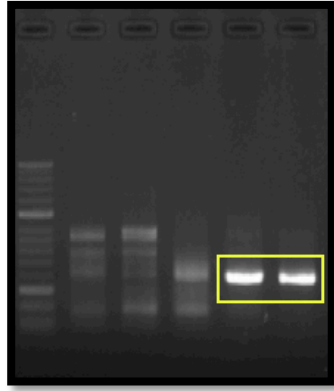


Figura 13. Resultado de la amplificación de la PCR semianidada para el gen *vp60* con los cebadores RC9 y RC10. Carril 1: marcador de peso molecular *BenchTop 100bp DNA Ladder* (Promega); Carril 5-6: amplicones de las muestras positivas para RHDV. El recuadro amarillo engloba a los productos de amplificación con tamaño esperado.

Se obtuvieron secuencias nucleotídicas del gen *vp60* (KJ957809, GenBank) para conejos procedentes de Arafo, Güímar, Arico, La Esperanza y El Sauzal-La Matanza. Todas las secuencias obtenidas mostraron una mayor identidad nucleotídica con la nueva variante descrita del virus. Concretamente, mostraron valores de entre 97-98% de similitud nucleotídica con cepas de RHVD2 halladas entre conejos de Portugal en un estudio llevado a cabo por Lopes *et al.* (2014). Los porcentajes de similitud con las secuencias de Portugal fueron mayores que con las secuencias del virus halladas en el Noroeste de España (95%-96%).

4.5 Coccidiosis

4.5.1 Determinación mediante técnicas morfológicas.

Un 55,55% de los individuos analizados estaban parasitados con *Eimeria* spp. Los individuos positivos pertenecían tanto a la zona Norte como zona Sur de la isla, no habiéndose encontrando diferencias significativas de prevalencia entre ambas zonas. En este estudio mediante técnicas morfológicas se detectaron ocho especies diferentes de coccidios parasitando a conejos de Tenerife (Figura 14). La especie que mostró una mayor prevalencia fue *Eimeria perforans*, hallándose en un 69,23% de los individuos parasitados. La prevalencia de las diferentes especies se detalla en la Tabla 3. La identificación de las especies de coccidios se realizó en base a los caracteres morfométricos de ooquistes y esporoquistes.

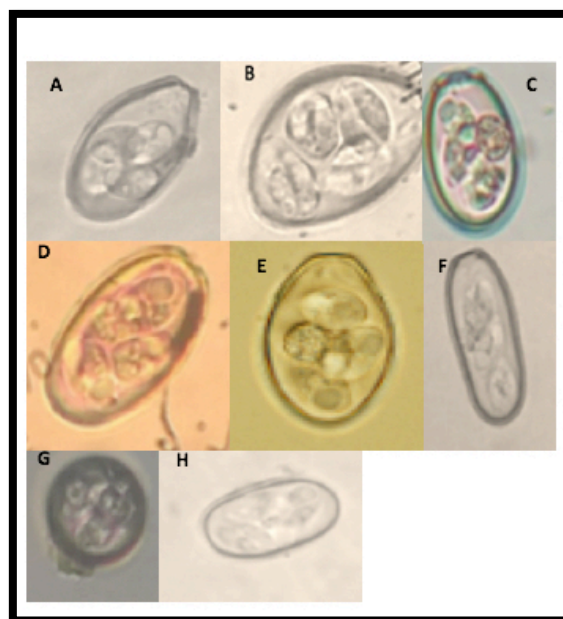


Figura 14. Ooquistes de las especies de *Eimeria* encontradas en el estudio (40x). (a) *Eimeria piriformis*, (b) *Eimeria flavescens*, (c) *Eimeria magna*, (d) *Eimeria media*, (e) *Eimeria intestinalis*, (f) *Eimeria coecicola*, (g) *Eimeria exigua*, (h) *Eimeria perforans*.

Tabla 3. Prevalencia (P%) y localización de las especies de *Eimeria* en conejos.

Especie	P%	Municipios
<i>E. perforans</i>	69,23%	La Orotava, Tacoronte, El Rosario, Arafo, Güímar
<i>E. media</i>	23,07%	La Orotava, Tacoronte, Güímar
<i>E. piriformis</i>	15,38%	La Orotava
<i>E. flavescens</i>	30,76%	La Orotava, Arafo, Güímar
<i>E. magna</i>	23,07%	La Orotava, Arafo
<i>E. coecicola</i>	23,07%	El Rosario, Arafo
<i>E. exigua</i>	12,2%	Tegueste, Las Mercedes, La Matanza
<i>E. intestinalis</i>	10,02%	La Matanza, El Sauzal

El 69,2% de los conejos analizados presentaron coinfección. En algunos casos, se detectó la presencia de hasta 4 especies diferentes de *Eimeria* spp.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos mediante morfología, se llevó a cabo una PCR multiplex capaz de distinguir entre las tres especies de coccidios de mayor grado de patogenicidad: *E. stiedai*, *E. flavescens* y *E. intestinalis*. Ratificando los resultados obtenidos mediante morfología, se observaron productos de amplificación del tamaño esperado para las especies *E. flavescens* y *E. intestinalis*.

5. DISCUSIÓN.

Con este trabajo, hemos comprobado que, en la actualidad, la enfermedad hemorrágica del conejo tiene una mayor importancia, con respecto a la mixomatosis, para

las poblaciones de conejos de Tenerife, ya que presenta mayor prevalencia y distribución en la isla.

En el caso de la RHD, más de la mitad de los conejos que se hallaron muertos (n=90) presentaron el antígeno del virus (50,57%). Este hecho, evidentemente, no excluye al virus de la mixomatosis como una de las causas de mortalidad posible entre las poblaciones de conejos de Tenerife, pero a la vista de los resultados, el peso de la RHD en la actualidad parece ser más relevante.

En este estudio hallamos que la seroprevalencia de la enfermedad hemorrágica se ha mantenido a lo largo del tiempo en esta isla con respecto a los datos obtenidos en 1998 a 2000 (14%). Por el contrario, la mixomatosis ha experimentado un descenso estadísticamente significativo con respecto a los datos de esa misma época (27%) (Foronda *et al.*, 2005). Cabe destacar que la mixomatosis suele seguir una tendencia temporal, confirmada en varios estudios, uno de ellos realizado en Escocia donde la prevalencia fluctuaba desde 0% a cerca del 25% (Boag *et al.*, 2013). En este estudio solamente se encontró mixomatosis en Güímar y Fasnia, a diferencia del estudio de Foronda *et al.* (2005) donde se detectó por toda la isla.

5.1 RHDV2 en conejos de Tenerife.

Las cepas del virus de la enfermedad hemorrágica se dividían en tres grupos: el RDHV, que incluían las cepas más antiguas (genogrupos G1 a G5) (Le Gall-Reculé *et al.*, 2003); el RDHV_a (genogrupo G6); y el RHDV2, una nueva variante descrita por primera vez en Francia en el año 2010 (Le Gall-Reculé *et al.*, 2011) que se expandió con gran rapidez por otros países de Europa como Portugal (Abrantes *et al.*, 2013).

Aunque al virus RHDV2 se le solía denominar como una nueva variante, realmente no ha evolucionado a partir del RHDV, sino que representa un nuevo virus originado a partir de una especie viral desconocida. Los grupos RHDV y RHDV_a, eran comúnmente denominados como RHDV, mientras que la nueva variante era designada RHDV2 o RHDV_b.

En el reciente artículo de Le Pendu *et al.* (2017), a todas estas variantes se les incluye en la especie *Lagovirus europaeus*, junto al otro agente vírico causante del síndrome de la liebre marrón europea (EBHSV), siendo ambos la misma especie englobada dentro de la familia Calciviridae. Con esta nueva nomenclatura, la especie *L. europaeus* presentaría dos genogrupos nombrados como G. I y G. II. El primero de ellos englobaría a los virus relacionados con la RHDV, y el segundo a los de la EBHSV.

Las secuencias obtenidas en este estudio, correspondientes a conejos de Arafo, Güímar, Arico, La Esperanza y El Sauzal-La Matanza, mostraron una mayor identidad con la variante nueva del virus, nombrada según Le Pendu *et al.* (2017) como *L. europaeus* GI.2. Esta variante, tiene la capacidad de afectar a gazapos, a diferencia de la variante clásica, según Le Gall-Reculé *et al.* (2013), lo que puede estar suponiendo una mayor merma de la población de conejos en Tenerife.

En un estudio realizado en 2013, se observó que esta nueva variante causa una mortalidad media del 20% de los conejos infectados experimentalmente (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013), que es considerablemente menor a la del virus clásico. Sin embargo, este dato no debe llevar a la confusión de que esta variante tiene una menor relevancia con respecto a la clásica, puesto que se ha estimado que la nueva variante es responsable de la reducción del 80% de conejos de la Península Ibérica (Delibes-Mateos *et al.*, 2014). Otra diferencia notable con respecto a la cepa clásica es que esta nueva variante presenta un rango más amplio de hospedadores, puesto que es capaz de infectar a otros lagomorfos, como diversas especies de liebres (Puggioni *et al.*, 2013; Camarda *et al.*, 2014).

En las poblaciones de conejos silvestres de la Península Ibérica, todas las cepas de RHDV identificadas antes del 2011 pertenecían al genogrupo G1 (Muller *et al.*, 2009; Alda *et al.*, 2010). Sin embargo, a partir de 2012, únicamente se ha detectado la variante nueva GI.2, lo que sugiere un total remplazo de la variante clásica por la nueva en la Península Ibérica (Abrantes *et al.*, 2013). Es importante destacar que este hecho no sólo está ocurriendo en la Península Ibérica, sino también en otros países como Francia y Portugal (Lopes, *et al.*, 2014; Duarte *et al.*, 2015). En ese sentido, es bastante posible que este mismo fenómeno de remplazo esté ocurriendo en Tenerife, debido a que los casos de enfermedad hemorrágica en Tenerife comienzan en 1996, presumiblemente causados por la variante clásica, y la variante nueva no es descrita hasta 2010. Por lo tanto, se puede suponer que este virus ha entrado en Tenerife durante, al menos, dos episodios: un primer episodio que supone la entrada de la cepa clásica en Tenerife a mediados de la década de los 90, y un segundo episodio que implica la entrada de la variante nueva, durante los últimos años.

En la Península Ibérica se ha demostrado el efecto negativo de la variante nueva sobre los ecosistemas (Delibes-Mateos *et al.*, 2014) y la economía, debido sobre todo a que el conejo es una pieza clave en los ecosistemas ibéricos, donde sirve como presa de más de 30 predadores diferentes, entre los que se encuentra el lince (Delibes-Mateos *et al.*, 2008).

5.2 Presencia de individuos con anticuerpos frente a la enfermedad hemorrágica.

El hallazgo de individuos vivos con anticuerpos frente a la enfermedad hemorrágica, podría indicar que algunos animales pueden haber superado la enfermedad y desarrollado una seroconversión, presentando en la actualidad un título de anticuerpos que les confiere protección ante una nueva infección. Este hecho suele tener lugar cuando los conejos sufren las denominadas infecciones subagudas, que se caracterizan por la aparición de síntomas clínicos más leves de lo normal, en las que la mayoría de conejos sobreviven (Abrantes *et al.*, 2012). Esto indica la posibilidad, de que estos individuos superasen la infección, debido a la existencia de características genéticas del hospedador que le puedan conferir protección.

Los estudios genéticos relacionados con la resistencia a enfermedades comenzaron a realizarse en humanos, mediante la identificación de los alelos de los loci *ABO*, *FUT2* y *FUT3* (fucosiltransferasas), que conllevan la no expresión de los antígenos necesarios para el reconocimiento por parte de los Norovirus. Este descubrimiento, condujo al planteamiento de que pudiera estar sucediendo algo similar en conejos adultos para el virus de la enfermedad hemorrágica. Un estudio reciente ha demostrado que ciertos alelos de los genes que codifican para las enzimas fucosiltransferasas, que sintetizan un ligando necesario para que tenga lugar la infección por parte del virus, guardan una relación con la resistencia del conejo al RHDV (Guillon *et al.*, 2009). La implicación de la enzima fucosiltransferasa en la infección por RHDV en el conejo se explica en la Figura 15.

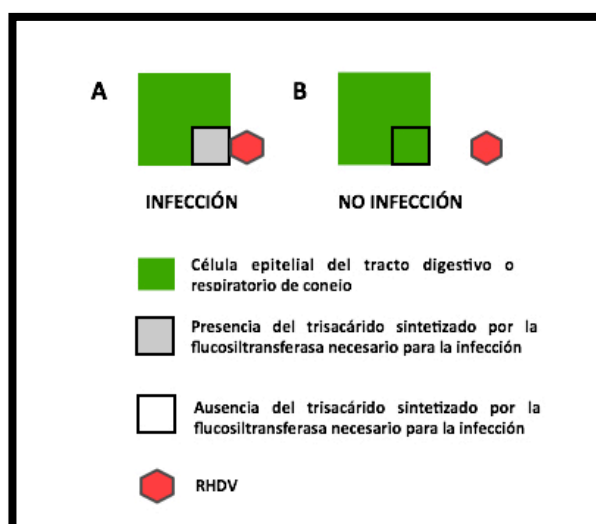


Figura 15. Esquema de la implicación de la enzima fucosiltransferasa en la infección del conejo por RHDV. (A) Infección por RHDV, la célula del tracto digestivo o respiratorio del conejo presenta el trisacárido necesario para la unión del virus. (B) No infección por RHDV, la célula del tracto digestivo o respiratorio del conejo carece del trisacárido al cual se une el virus, por lo que no se llega a producir la infección.

Diversos estudios han demostrado que la proporción de conejos resistentes al RHDV es mayor en zonas con una alta presión por la incidencia del RHDV, lo que ha originado una selección natural de los conejos resistentes. En Tenerife, nos planteamos la posibilidad de que esté ocurriendo lo mismo, es decir, que la acción del virus esté ejerciendo una acción de selección positiva de aquellos individuos con una posible resistencia generada. Por lo tanto, esperaríamos encontrar una proporción mayor de individuos con fenotipo no secretor en zonas con una presencia notable del virus, que en otras zonas en las que no haya ejercido presión sobre las poblaciones de conejos.

5.3 Papel de los coccidios en las poblaciones de conejos de Tenerife

La coccidiosis es considerada un problema importante para las poblaciones de conejos, debido a su alta tasa de mortalidad. Hasta la actualidad se han descrito hasta 15 especies de coccidios que afectan a conejos (Li y Ooi, 2009), ocho de ellas fueron identificadas en este estudio. La especie más prevalente fue *Eimeria perforans*, que es la especie con el tiempo de esporulación más corto (Hobbs y Twigg, 1998). Ésta ha sido declarada como ligeramente patógena para los conejos (Pakandl, 2009). Con respecto a *E. flavescens* y *E. intestinalis*, halladas también en conejos de este estudio, han sido descritas como especies muy patogénicas para conejos, especialmente para individuos menores de 3 meses (Yan *et al.*, 2013). Otra de las especies identificadas fue *Eimeria*

magna, que ha sido declarada como un agente causante de elevadas tasas de mortalidad y grandes pérdidas económicas, debido a la reducción de la tasa de crecimiento de los conejos infectados, diarrea e incluso muerte de los individuos parasitados por dicha especie (Drouet-Viard *et al.*, 1997). Respecto a *Eimeria media*, ha sido declarada como una especie de patogenicidad intermedia, al igual que la especie también hallada en este estudio *Eimeria piriformis* (Pakandl, 2009). Por otro lado, también se halló en este estudio *Eimeria coecicola*, que se ha encontrado en conejos asintomáticos y es frecuentemente identificada como una especie de coccidio de baja patogenicidad (Szkucik *et al.*, 2014).

La elevada proporción de conejos infectados por coccidios detectada en este estudio (55,55%) junto con la relevante patogenicidad de algunas de las especies halladas y la falta de conocimiento con respecto a estos parásitos en Tenerife, podrían sugerir un papel importante e infravalorado de los mismos en la mortalidad del conejo en Tenerife, principalmente entre individuos jóvenes, que son los más vulnerables a estas infecciones. Esto puede deberse a que los conejos infectados por coccidios no muestran unas manifestaciones tan evidentes como en el caso la enfermedad hemorrágica o mixomatosis.

Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que varios individuos encontrados muertos o cedidos fueron descritos a priori como “individuos muertos por enfermedad hemorrágica” porque presentaban sangrado en la región perianal, pero los resultados fueron negativos para esta enfermedad y positivos para coccidiosis. Es, por tanto, probable que una cierta proporción de muertes que se atribuyen comúnmente a la enfermedad hemorrágica no se deba realmente a ella, sino a infecciones por coccidios, puesto que el conocimiento de las manifestaciones de infección por estos parásitos es escaso o se confunden con la infección vírica.

6. Conclusiones.

1. La seroprevalencia actual de la enfermedad hemorrágica (19,4%) y la prevalencia de la coccidiosis (55,55%) en conejos, es similar a la encontrada en la época 1998-2000. Sin embargo, la seroprevalencia de la mixomatosis (2,73%) ha disminuido significativamente, así como su distribución en la isla.
2. Actualmente, la enfermedad hemorrágica en Tenerife, está afectando en mayor medida a la población de conejo con respecto a la mixomatosis, pudiendo ser una causa importante de la merma de las poblaciones y encontrándose distribuida por casi la totalidad de la isla.

3. Esta es la primera cita de la nueva variante del virus hemorrágico en Canarias, la cual ha sido descrita en esta década. Esta variante es mucho más patógena que la cepa clásica ya que es capaz de infectar a individuos vacunados, y tiene la capacidad de afectar a gazapos.
4. La nueva variante del virus hemorrágico se encuentra tanto en la zona este de la isla, como en municipios del norte, lo que indica que se ha producido una diseminación de dicha cepa en las poblaciones de conejos.
5. Aproximadamente la quinta parte de los conejos vivos analizados albergaba anticuerpos frente a la enfermedad hemorrágica, indicando posiblemente que han sobrevivido a una infección anterior. Este resultado podría sugerir una base genética asociada a la mayor capacidad de supervivencia mostrada por estos individuos.
6. Los conejos de Tenerife albergan, al menos, ocho especies de coccidios (*Eimeria perforans*, *Eimeria magna*, *Eimeria flavescens*, *Eimeria piriformis*, *Eimeria coecicola*, *Eimeria media*, *Eimeria intestinalis* y *Eimeria exigua*), alguna de ellas de elevada patogenicidad.

7. Conclusions.

1. The current seroprevalence of hemorrhagic disease (19.4%) and the prevalence of coccidiosis (55.55%) in rabbits are similar to that found in the 1998-2000. However, the seroprevalence of myxomatosis (2.73%) has decreased significantly, as well as its distribution on the island.
2. Currently, the hemorrhagic disease is affecting more than myxomatosis to rabbit population in Tenerife, that can be an important cause for the rabbit populations decrease and being distributed throughout almost the entire island.
3. This study constitutes the first finding of the new variant of hemorrhagic virus in the Canary Islands, which has been described in this decade. This variant is more pathogenic than the classic strain because it is able of infecting vaccinated individuals, and young rabbits.
4. The new variant of rabbit haemorrhagic disease virus is present both in the eastern and northern parts of the island, which indicates a dissemination of this strain in rabbit populations.
5. Around the fifth part of the alive rabbits had antibodies against the hemorrhagic disease, which could mean that they possibly have survived a previous infection.

Those results may suggest that there is a genetic base linked to a mayor survival on those animals.

6. The rabbits from Tenerife have at least eight coccidia species (*Eimeria perforans*, *Eimeria magna*, *Eimeria flavescens*, *Eimeria piriformis*, *Eimeria coecicola*, *Eimeria media*, *Eimeria intestinalis* and *Eimeria exigua*), some of them with high pathogenicity.

8. Agradecimientos.

Quiero agradecer a mis tutores José María Fernández Palacios por su apoyo y tiempo. Y Pilar Foronda Rodríguez por su dedicación en mi aprendizaje, y el apoyo constante desde el minuto uno. Por último, a mis compañeros del laboratorio 10, Katherine, Elena y Aaron por el trabajo en equipo, a Julio por la ayuda en la toma de muestras y al Excmo. Cabildo Insular de Tenerife por financiar el proyecto.

9. Bibliografía.

1. Abrantes, J., Lopes, A.M., Dalton, K.P., Melo, P., Correia, J.J., *et al.* 2013. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012-2013. *Emerg Infect Dis.* 19(11):1900-2.
2. Abrantes, J., Van Der Loo, W., Le Pendu, J., Esteves, P.J. 2012. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): A review. *Vet Res.* 43(1):12.
3. Abreu Galindo, FR. J. 1995. Historia de la conquista de las siete islas Canarias. Ed. Crit. Por A. Cioranescu. Ed. Goya. Santa Cruz de Tenerife.
4. Alda, F., Gaitero, T., Suarez, M., Merchan, 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: 347,2148-10-347.
5. Argüello, J., Llanos, A., Perez, L. 1988. Enfermedad hemorrágica del conejo en España. *Med Vet.* 5:645-50.
6. Best, S.M., Kerr, P.J. 2000. Coevolution of host and virus: The pathogenesis of virulent and attenuated strains of Myxoma virus in resistant and susceptible European rabbits. *Virology.* 267(1):36-48.
7. Boag, B., Hernandez, A.D., Cattadori, I.M. 2013. Observations on the epidemiology and interactions between myxomatosis, coccidiosis and helminth parasites in a wild rabbit population in Scotland. *Eur J Wildlife Res.* 59(4):557-62.
8. Cabrera-Rodríguez, F. 2008. Seasonal abundance and management implications for wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) on La Palma, Canary Islands, Spain. *Wildlife Biol.* 4(2):39-47.
9. Camarda, A., Pugliese, N., Cavadini, P., Circella, E., Capucci, L., *et al.* 2014. Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Italian hare (*Lepus corsicanus*). *Res Vet Sci.* 97(3):642-5.
10. Chapuis, J.L., Chantal, J., Biglenga, G. 1994. Myxomatosis in the absence of vectors on the subantarctic islands of Kerguelen three decades after its introduction. *Comptes Rendues de l'Academie de Sciences. Serie III, Sciences de la vie.* 317(2): 174-182.
11. 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(5):1106-17.
12. Delibes-Mateos, M., Ferreira, C., Carro, F., Escudero, M.A., Gortazar C. 2014. Ecosystem effects of variant rabbit hemorrhagic disease virus, Iberian Peninsula. *Emerg Infect Dis.* 20(12):2166-8.
13. Drouet-Viard, F., Coudert, P., Licois, D., Boivin, M. 1997. Acquired protection of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) against coccidiosis using a precocious line of *Eimeria magna*: Effect of vaccine dose and age at vaccination. *Vet Parasitol.* 69(3):197-201.
14. Du, N., X., Xe., W., Y., Liu, *et al.* 1991. Studies on Rabbit Haemorrhagic Disease. *Science Agricultural Sinica;* 24(1): 1-10.
15. Duarte, M.D., Carvalho, C.L., Barros, S.C., Henriques, A.M., Ramos, F., *et al.* 2015. A real time taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *J Virol Methods.* 219:90-5.

16. Duszynski, D.W., Wilber, P.G. 1997. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *J Parasitol.* 333-6.
17. Fenner, F., Marshall, I. 1957. A comparison of the virulence for European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of strains of Myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America. *J Hyg.* 55(02):149-91.
18. Fenner, F., Ratcliffe, F.N. 1965. Myxomatosis. Ed. CABI.
19. Foronda, P., Figueruelo, E., Ortega, A., Abreu, N., Casanova, J.C. 2005. Parasites (viruses, coccidia and helminths) of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) introduced to Canary Islands from the Iberian Peninsula. *Acta Parasitol.* 50: 80-84.
20. Guillon, P., Ruvoen-Clouet, N., Le Moullac-Vaidye, B., Marchandeu, S., Le Pendu, J. 2009. Association between expression of the H histo-blood group antigen, alpha1,2fucosyltransferases polymorphism of wild rabbits, and sensitivity to rabbit hemorrhagic disease virus. *Glycobiology.* 19(1):21-8.
21. Hobbs, R., Twigg, L. 1998. Coccidia (*Eimeria* spp.) of wild rabbits in southwestern Australia. *Aust Vet J.* 76(3):209-10.
22. Jithendran, K., Bhat, T., Banerjee, D., Ghosh, J., Gupta, S. 1996. Coccidiosis in Angora rabbits-a field study in Himachal Pradesh. En: Parasitic diseases-new horizons. Proceedings of the eighth national congress of veterinary parasitology and national Symposium on molecular parasitology. 9-11.
23. Joubert, L., Duclos, Ph., Tuailon, P. 1982. La Myxomatose des garennes dans le sud-est. *Revue Méd. Vét.* 133(12): 739-753.
24. Joubert, L., Leftheriotis, E., Mouchet, J. 1973. Les Maladies Animales a Virus. La Myxomatose II. Ed. L'Expansion. Tome II.
25. Le Gall-Reculé, G., Lavazza, A., Marchandeu, S., Bertagnoli, S., Zwingelstein, F., *et al.* 2013. Emergence of a new Lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet Res.* 44:81.
26. Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Laurent, S., De Boisseson, C., Portejoie, Y., Rasschaert, D. 2003. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants. *Arch Virol.* 148(1):65-81.
27. Le Gall-Reculé, G. 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet Rec.*
28. Le Pendu, J., Abrantes, J., Bertagnoli, S., Guitton, J.S., Le Gall-Reculé, G. 2017. Proposar for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *J Gen Virol.* 98 (7): 1658- 1666.
29. Li, M., Ooi, H. 2009. Fecal occult blood manifestation of intestinal *Eimeria* spp. infection in rabbit. *Vet Parasitol.* 161(3):327-9.
30. Lopes, A.M., Correia, J., Abrantes, J., Melo, P., Ramada, M., *et al.* 2014. Is the new variant RHDV replacing genogroup 1 in Portuguese wild rabbit populations? *Viruses.* 7(1):27-36.
31. Martín, A. 2002. Rabbit eradication on the islet of Montaña Clara (Lanzarote, Canary Islands). En: Proc workshop invasive alien species on European islands and evolutionary isolated ecosystems and group of experts on invasive alien species. Council of Europe, T-PVS/INF. 23-5.
32. Martín, M.C., Marrero, P., Nogales, M. 2003. Seasonal variation in the diet of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* on a semiarid Atlantic island (Alegranza, Canarian archipelago). *Acta Theriol.* 48(3):399-410.
33. Murganz Roca, R. 1994. Enfermedad Virica Hemorrágica del conejo: estudio de aspectos etiológicos, epidemiológicos, diagnósticos y profiláctico. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Zaragoza.
34. Muller, A., Freitas, J., Silva, E., Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., *et al.* 2009. Evolution of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from the Iberian Peninsula. *Vet Microbiol.* 135(3):368-73.
35. Pakandl, M. 2009. Coccidia of rabbit: A review. *Folia Parasitol.* 56(3):153-66.
36. Puggioni, G., Cavadini, P., Maestrone, C., Scivoli, R., Botti, G., *et al.* 2013. The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Vet Res.* 44:96.
37. Rosell, J.M., Badiola, J.J. 1990. Maladie Hémorragique Virale (VHD) du lapin. *Epidemiologie et Contrôle. Cuniculture.* 17(1): 24-26.
38. Sanarelli, G. 1898. Das myxomatogene virus. Beitrag zum Stadium der Krankheitserreger ausserhalb des Sichtbaren. *Zbl Bakt.* 23:865-73.
39. Sánchez Botija, C., Arroyo, C., Blanco, A. 1954. Identificación de la mixomatosis del conejo en España. *Rev. Patronato Biol. Animal.* 1: 75-78.
40. Sheather, A.L. 1923. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. *J Comp Pathol Ther.* 36:266-75.
41. Szkucik, K., Pyz-Lukasik, R., Szczepaniak, K.O., Paszkiewicz, W. 2014. Occurrence of gastrointestinal parasites in slaughter rabbits. *Parasitol Res.* 113(1):59-64.
42. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30(12):2725-2729.
43. Xu, Z., Chen, W. 1989. Viral haemorrhagic disease in rabbits: A review. *Vet Res Commun.* 13(3):205-12.

44. Yan, W., Wang, W., Wang, T., Suo, X., Qian, W., *et al.* 2013. Simultaneous identification of three highly pathogenic *Eimeria* species in rabbits using a multiplex PCR diagnostic assay based on ITS1-5.8 S rRNA-ITS2 fragments. *Vet Parasitol.* 193(1):284-8.