



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PURIFICACION Y OBSERVACION DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRAGICA DE LOS CONEJOS EN MEXICO

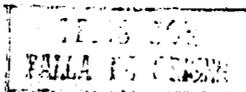
T E S I S QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA PRESENTA JOAQUIN VAZQUEZ PAREDES

ASESORES

DRA. AURORA VELAZQUEZ ECHEGARAY DR. MOISES FRAIRE CACHON



MEXICO, D. F.



1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
HIPOTESIS	5
OBJETIVOS	5
MATERIAL Y METODOS	5
RESULTADOS	8
DISCUSION	10
CONCLUSIONES	14
LITERATURA CITADA	16
CUADROS Y FIGURAS	26

R E S U M E N

JOAQUIN VAZQUEZ PAREDES. Purificación y Observación del Virus de la Enfermedad Hemorrágica de los Conejos en México. (Asesorado por la Dra. Aurora Velázquez E. y el Dr. Moisés Fraire Cachón.).

La demostración y caracterización del agente etiológico de la Enfermedad Hemorrágica de los Conejos en México es descrito. En base a los resultados obtenidos de la Microscopía Electrónica (ME) por Tinción Negativa (TN) se sugiere que este virus pertenece en la clasificación actual a la familia Caliciviridae, con las siguientes características morfológicas: una forma esférica y una configuración icosaédrica, un tamaño de 35 nm aproximadamente, carente de envoltura, además de presentar depresiones en la superficie y proyecciones hacia el exterior del virión. Se proporciona la alternativa para la purificación del virus mediante Exclusión Cromatográfica (Filtración en Gel) así como también para el diagnóstico de la enfermedad, aparte de la Hemoaglutinación (HA), Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA), ME, Microscopía Inmunoeléctronica (MIE), dos modalidades que son: TN de la Hemoaglutinación Viral e Inmunofluorescencia de la Hemoaglutinación Viral. Se confirma a México como el primer y hasta el momento único país que ha reportado la enfermedad en el continente Americano.

PURIFICACION Y OBSERVACION DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRAGICA DE LOS CONEJOS EN MEXICO

INTRODUCCION

En el mes de Enero de 1989 se presenta en México una enfermedad en el conejo doméstico desconocida hasta entonces y caracterizada por una mortalidad elevada. Los signos clínicos más frecuentemente observados son: muerte repentina sin ninguna otra manifestación, o bien, precedida de dificultad respiratoria y secreción de espuma sanguinolenta por la nariz (16,21,81), depresión y anorexia (21). La morbilidad oscila entre un 30-80% y la letalidad entre 80-100% (16,81). Hasta el momento, ningún otro país del continente Americano ha reportado la presencia de alguna enfermedad en conejos con signología similar (16,24,81). A esta enfermedad se le denomina: Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (16,30,40), o Síndrome Neumohepático de los Conejos (21).

Así mismo, a nivel mundial esta siendo estudiada una enfermedad en los conejos domésticos, caracterizada de igual manera por una alta mortalidad que puede alcanzar el 95% de los animales afectados (63,66). Dicha enfermedad ha recibido diversos nombres: Neumonía Hemorrágica Viral del Conejo (10,11,12,14,35,37, 62,63,66,69,74,76,82,87,99); Enfermedad "X" del Conejo (3,10,11, 12,17,23,34,35,61,69,74,87); Síndrome Hemorrágico del Conejo (34,35,61,63,70); Pulmonía Hemorrágica del Conejo (61,63); Muerte Súbita Viral del Conejo (3,35,45,69); Hepatitis Necrótica Infecciosa de los Conejos (7,34,35,49,65,87,88,89); Síndrome Septicémico Hemorrágico de los Conejos (58); Septicemia Hemorrágica de los Conejos (17,33,35,65,80,84,94,99,100); Plaga de los Conejos (35,99); Fiebre Hemorrágica por Picornavirus (35,43) y Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos (EHVC) (3, 5,6,13,15,20,27,28,33,35,38,39,44,47,52,56,58,60,61,63, 64,65,67, 69,71,73,75,77,78,79,82,85,86,87,88,90,91,92,95,96,97,98,99,101) siendo este nombre el más comunmente utilizado para designar a este padecimiento. Recientemente se ha propuesto el nombre de Enfermedad Hemorrágica Viral de los Lagomorfos (36,89) y Hepatitis Necrótica Infecciosa de los Lepóridos (50) puesto que existe evidencia de relación antigénica entre la EHVC y el Síndrome de la Liebre Café Europea (44,59), inclusive se menciona que se trata del mismo agente etiológico para las dos enfermedades (50), más sin embargo, creemos que se necesita mucha más informacion a este respecto, lo que sugiere manejar con

cuidado esta última hipótesis.

La EHVC ha sido observada en la mayoría de los países europeos: España (3,35,44,67,69,73,79,86); Bulgaria (5,7,70,71); Francia (6,7,17,35,44,58,75,91); Suiza (7,44,87); Italia (7,9,10,11,12,13,15,17,23,28,35,44,4974,75); Polonia (7,33,44,85); Checoslovaquia (7,35,44,70,75,77,78,90); Alemania (7,33,35,44,47,64,65,75,80,84,87); Unión de Repúblicas Soviéticas Socialistas (38,39,44,70); Rumanía (44); Hungría (44,56,75); Austria (44,60) y Portugal (44,101). Varios investigadores, son de la opinión de que este Síndrome Hemorrágico del Conejo es análogo al descrito por primera vez en China en 1984 (61,63). Como países libres se menciona a Bélgica, Holanda, Inglaterra, Dinamarca, Grecia y los Escandinavos (89). Los países que han reportado la enfermedad en el continente Asiático (63,66): China (14,20,37,44,46,65,69,70,75,76,82,87,92,94,95,96,97,98,99,100) y Korea (2,43,45,69,87).

La enfermedad puede ser producida experimentalmente por la inoculación a conejos sanos susceptibles con un filtrado de un homogenizado de órganos provenientes de conejos enfermos (63,66). El agente infeccioso es capaz de inducir la aglutinación de eritrocitos humanos del grupo sanguíneo "O" (2,3,27,46,52,63,65,69,73,76,89,100) y esta hemoaglutinación es inhibida por suero sanguíneo de animales recuperados (2,3,27,63,64,65,96).

Utilizando la Microscopía Electrónica (ME) ha sido posible la observación de partículas virales en los tejidos de diferentes órganos, pero hasta ahora no ha sido posible replicar al virus en los cultivos celulares tradicionales (44,63,66,69,87,96). Las investigaciones continúan con el objeto de caracterizar al virus (61), lo que implica tratar de clasificarlo. Existen diferentes criterios para la clasificación de los virus en grupos principales llamados familias y la subdivisión de las familias en géneros. El criterio primario para delinear a las diferentes familias de virus es: 1) la clase de ácido nucleico viral y la estrategia de la replicación viral, y 2) la morfología del virión, incluyendo su tamaño y forma, la simetría de la nucleocápside y la presencia o ausencia de envoltura, las cuales son rápidamente determinadas por ME (25).

Los virus en una muestra son identificados por su morfología, pero no pueden ser observados a menos que algún método de "contraste" sea aplicado. Un método simple y efectivo

de contraste es proporcionado por la Tinción Negativa (TN) (22), introducida en 1959 por Brenner y Horne (25,26,31). Esta tinción consiste en aplicar una solución metálica tal como el ácido fosfotúngstico a la muestra, como la mezcla es desecada, la tinción negativa metálica forma una matriz electrodensa contrastante en torno a las partículas virales menos electrodensas (22). Por la facilidad y rapidez con que las técnicas de tinción negativa pueden ser desarrolladas, constituyen la principal metodología para el rápido diagnóstico virológico (22,68). La ME permite solamente la identificación a nivel de familia, mientras que la Microscopía Inmunolectrónica (MIE) utilizando anticuerpos específicos adecuados permite realizar distinciones más específicas (1,25). La MIE es la observación directa de un complejo antígeno-anticuerpo mediante ME (22,26).

El hecho de que los virus de animales deben ser propagados en sistemas de células vivas, crea ciertos problemas en cuanto a la purificación de los mismos (51,93), para su posterior observación mediante ME. Es necesario utilizar tejidos infectados que contengan elevadas concentraciones de virus (93), además es importante que en la purificación viral se eviten los tratamientos químicos y/o físicos que desnaturalicen al virus (51,93), o bien afecten su morfología (26). Algunas de las diversas formas de purificación son: ultracentrifugación (19,48,57,93), centrifugación por gradiente de densidad (19,48,51,57,93), filtración en gel ó exclusión cromatográfica (48,51,57), adsorción y elución con eritrocitos (25,48,57,93), electroforesis de zona (48,57), etc.

La técnica de Exclusión Cromatográfica ha sido empleada extensivamente en la separación de virus (51,72). El gel empleado para este fin posee poros de tamaño bien definido por los que penetran moléculas de cierto tamaño al interior de las esferas del gel. Moléculas más grandes son entonces excluidas, esto es, no entran al interior del gel, y por lo tanto pasarán más rápidamente através de una columna cromatográfica (51). De tal manera que son estas moléculas grandes las que primero salgan o eluyan de la columna, y las de menor tamaño retrasarán su salida del gel en función a su tamaño molecular.

HIPOTESIS

Utilizando la técnica de Filtración en Gel, se espera obtener al virus de la Enfermedad Hemorrágica de los Conejos de la manera más pura posible para su posterior observación y caracterización por ME utilizando el método de Tinción Negativa.

OBJETIVOS

Demostrar y caracterizar morfológicamente la etiología viral de esta nueva enfermedad en México. Proporcionar una alternativa tanto para la purificación del virus como para el diagnóstico de la enfermedad mediante ME y MIE. Respaldar el hecho de que México es el primer país que reporta esta enfermedad en América.

MATERIAL Y METODOS

El material para la purificación del virus fué colectado a partir de casos de ocurrencia natural de la enfermedad remitidos al Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM en Ciudad Universitaria.

I Obtención y Procesado de la Muestra.

Se colectó el hígado de un conejo Nueva Zelanda, hembra, de aproximadamente dos kilos de peso inmediatamente después de su sacrificio en el período agónico de la enfermedad y observadas las principales manifestaciones clínicas, así como también las lesiones a la necropsia que caracterizan a la EHC. A partir de este órgano se obtuvo un homogenizado de la siguiente manera: Utilizando un mortero de Tembroek y como diluyente una solución de PBS (sol. amortiguadora de fosfatos) con un pH de 7.2 fué preparado dicho homogenizado al 10%. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se repartió en alícuotas que fueron almacenadas a -70°C. Este homogenizado fué utilizado como fuente de antígeno viral para la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA) y para la Purificación Viral.

II Obtención de Antisuero y Gamaglobulinas Específicas Purificadas.

Para la obtención del antisuero específico se procedió a obtener sangre colectada sin anticoagulante por punción cardíaca en conejos adultos recuperados de la enfermedad y por la vena marginal de la oreja en gazapos que estuvieron en contacto con animales enfermos. Una vez formado el coágulo y separado el suero, fué sometido éste último a una centrifugación de 2,500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para retirar cualquier célula contaminante. Los sueros así obtenidos, fueron sometidos a una prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA) para determinar su título y posteriormente almacenados a 4°C. hasta su utilización como antisuero específico en la prueba de IHA, o bien, su fraccionamiento para la obtención de las gamaglobulinas específicas purificadas.

Para la obtención de las gamaglobulinas específicas purificadas fué seleccionado el suero de conejo cuyo título en la prueba de IHA resultó más elevado y posteriormente se fraccionó por medio de la técnica de Filtración en Gel o Exclusión Cromatográfica tal como lo describe L. Hudson, 1980(42). Una vez obtenidas las diferentes fracciones cromatográficas del antisuero específico, se examinó cada una de ellas mediante una prueba de IHA. Las fracciones que presentaron una IHA positiva con un título elevado fueron seleccionadas como Gamaglobulinas Específicas Purificadas y se conservaron en alícuotas a -20° C. hasta ser utilizadas en la Microscopía Inmunoeléctronica Directa (MIED).

III Hemoaglutinación (HA) e Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA).

En virtud que el virus de la EHC tiene la capacidad de hemoaglutinar eritrocitos humanos del grupo sanguíneo "O" se implementó la técnica de HA como una prueba de seguimiento viral a todo lo largo de la purificación del virus y siempre acompañada de su respectiva IHA. Ambas técnicas fueron realizadas en microplaca con fondo en "U" como lo describe M. Fraire, 1989 (27).

IV Purificación Viral.

La purificación del virus de la EHC se realizó por Exclusión Cromatográfica a partir del homogenizado de hígado infectado empleando Sephadex G-200 SF. El empacado de la columna, el equilibrio de la cama y la aplicación de la muestra se llevó a cabo como lo describe Pharmacia, 1979 (72). También fué utilizado un colector de fracciones y un espectrofotómetro conectados a un graficador para obtener los diferentes picos de la cromatografía.

*

* Colector de Fracciones Ultro Rac LKB 7000; Espectrofotómetro Uvicord II LKB 8300 y graficador Recorder LKB 6520.

V Análisis de las Fracciones Cromatográficas de la Purificación Viral.

Se determinó el título hemoaglutinante de cada fracción en microplaca, y se comprobó la presencia del virus con la respectiva inhibición de la hemoaglutinación utilizando para ello el antisuero específico. Además se llevó a cabo una Inmunofluorescencia Directa (IFD) de los eritrocitos aglutinados con aquellas fracciones que resultaron con una actividad HA e IHA positivas, empleando un conjugado específico gentilmente proporcionado por el Departamento de Inmunología y Virología de la FMVZ y realizado según M. Fraire (1989)* como un análisis previo a la ME.

IV Microscopía Electrónica

Se realizó el método de Tinción Negativa (TN) (22) con la técnica de Aplicación Directa utilizando ácido fosfotúngstico al 2% con un pH de 6.8, todas las observaciones fueron realizadas en un Microscopio Electrónico JEOL-100B del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Se trabajaron las fracciones de la Purificación Viral que resultaron con una HA, IHA e IFD positivas. Brevemente, fueron empleadas rejillas de cobre cubiertas con película de carbón sobre las cuales se aplicó una gota de muestra a examinar mediante una micropipeta, posteriormente fué agregada una gota de TN y el exceso de líquido se removi6 por contacto con un papel filtro. Después la rejilla fué secada a temperatura ambiente durante tres minutos aproximadamente antes de observarse al Microscopio Electrónico. Fueron examinadas tres diferentes preparaciones en TN :

a) Hemoaglutinación Viral.- Obtenida una HA con el virus purificado de la EHC, los eritrocitos aglutinados fueron colocados sobre una rejilla de cobre y posteriormente aplicada la TN.

b) Virus de la EHC purificado por Exclusión Cromatográfica.

c) Complejo Virus- Anticuerpo (MIED).- Se trabajó con el virus de la EHC purificado y con las gamaglobulinas específicas purificadas siguiendo básicamente el procedimiento descrito por F. W. Doane y N. Anderson, 1987 (22), en cuanto se refiere a mezclar volúmenes iguales de virus y anticuerpo e incubarlos a 37°C durante una hora, a partir de aquí se realizó una modificación que consistió en aplicar la mezcla virus-anticuerpo directamente a la rejilla de cobre en vez de procesar la mezcla por el método de Difusión en Agar.

* Comunicación Personal

RESULTADOS

I Obtención y Procesado de la Muestra.

Los signos clínicos que manifestó el animal antes de sacrificarlo fueron los siguientes: depresión, anorexia, fiebre de 41°C, polipnea, cianosis moderada de mucosas, postración, y convulsiones. Las lesiones a la necropsia: en la mayoría de los órganos fué apreciada una congestión y hemorragias petequiales además de una pobre coagulación de la sangre. La tráquea y los pulmones macroscópicamente fueron los más alterados, el hígado no revelaba más cambios a simple vista que los descritos en general.

El homogenizado de hígado obtenido fué trabajado mediante una prueba de HA resultando un título de 1:131,072

II Obtención de Antisero y Gamaglobulinas Específicas Purificadas.

Los títulos inhibidores de la hemoaglutinación obtenidos de los sueros de conejos adultos y jóvenes se presentan en el Cuadro No. 1

El cromatograma resultante de la purificación de las Gamaglobulinas Específicas se muestra en la Figura No. 1

Los títulos inhibidores de la hemoaglutinación de las fracciones resultantes del procesamiento cromatográfico del antisuero específico son mostrados en el Cuadro No. 2

III Purificación Viral.

El cromatograma de la Purificación Viral se presenta en la Figura No. 2

IV Análisis de las Fracciones Cromatográficas de la Purificación Viral.

Los resultados de este análisis son mostrados en el Cuadro No. 3

La imagen obtenida de la Inmunofluorescencia Directa de la hemoaglutinación viral es presentada en la Figura No. 3

V Microscopía Electrónica.

Las electronografías de la Hemoaglutinación Viral corresponden a las Figuras No. 4 y 5

Las electronografías del virus purificado de la Enfermedad Hemorrágica de los Conejos corresponden a las Figuras No. 6, 7 y 8

Las electronografías de la Microscopía Inmunoeléctronica (MIE) del complejo Virus-Anticuerpo corresponden a las Figuras No. 9 y 10

DISCUSION

Orientaremos esta discusión describiendo como se llegó a la demostración del agente etiológico de esta nueva enfermedad de los conejos en México.

Se comenzó por obtener una gran cantidad de virus disponible para su purificación. De tal manera, se procedió a elegir de los conejos enfermos el tejido u órgano más adecuado para este trabajo de investigación, puesto que se sabe, no ha sido posible hasta el momento cultivar IN VITRO a este virus (34,35,52). Se eligió el hígado por ser el tejido hepático, entre otros, por el cuál el agente etiológico presenta predilección para su multiplicación, lo que se sostiene por las lesiones microscópicas que han observado varios autores en este tejido (18,34,35) y los títulos hemoaglutinantes obtenidos del mismo (3,44,64,65,67,69,96,99,100). Cabe mencionar que otros investigadores han logrado purificar al agente causal, a partir de este órgano (15,20,34,35,64,65,69,73).

Posteriormente, al realizar un homogenizado de hígado afectado, y al manejar como control negativo un homogenizado de hígado de conejo sano y realizarles una prueba de HA cuya utilización es referida por Hirst desde el año de 1941 (41). Se determinó que existía "algo" en el homogenizado de hígado enfermo que aglutinaba a eritrocitos de humano del grupo sanguíneo "O" puesto que el homogenizado de hígado normal no presentó una HA. Es justo señalar aquí que existen diversos investigadores que han determinado esta HA con eritrocitos de diferente grupo sanguíneo humano (96,99), y aún más, con eritrocitos de diferentes especies animales (44,46,99). Sin embargo, Lavazza, y col.(44), Liu, y col.(46), y Xu (99) mencionan que los eritrocitos humanos del grupo "O" son con los que el agente etiológico presenta una HA fuerte y franca. Hasta este momento de la investigación, se sabía que existía "algo" en el homogenizado de hígado enfermo y ausente en el de hígado sano que aglutinaba eritrocitos humanos (muy probablemente se trataba de un virus).

Pero, para que esta prueba de HA sea utilizada como prueba válida de investigación y diagnóstico de cualquier enfermedad viral, es forzosamente necesario acompañarla por su respectiva prueba de IHA. En este caso se empleó el antisuero específico, lo que supone debía contener inmunoglobulinas específicas contra

el agente causal del problema. De este modo, al realizar una prueba de IHA, mezclando primeramente el homogenizado de hígado enfermo con antisuero específico y posteriormente agregando los eritrocitos humanos del grupo "O" resultó que la supuesta HA no se efectuaba, esto es, realmente se presentaba una IHA cuya manifestación a simple vista es una sedimentación de los eritrocitos, y empleando como control negativo la mezcla de suero de conejo normal no inmune y homogenizado de hígado enfermo en la que al agregar los eritrocitos humanos daba como resultado una franca HA nos dió la pauta a deducir hasta este momento que efectivamente en el homogenizado de hígado enfermo y no en el de conejo sano existía algo que HA eritrocitos humanos y que dicha HA fué inhibida con suero proveniente de animales recuperados de la enfermedad y no con suero de animales normales. Esta inhibición posiblemente determinada por anticuerpos específicos contra el agente responsable del padecimiento, muy probablemente un virus. Pero había que demostrarlo directamente y no indirectamente.

Teniendo en mente que en el homogenizado de hígado de conejo existen numerosos contaminantes que pudieran confundir el efecto hemoaglutinante del virus, como por ejemplo bacterias e incluso otros virus, se decidió a purificar el homogenizado de hígado fraccionándolo mediante exclusión cromatográfica, con la subsecuente dilución de los componentes del homogenizado, sin embargo, se partió de una muestra de hígado enfermo que poseía un título hemoaglutinante muy elevado e indirectamente nos hizo suponer igualmente un elevado contenido de partículas virales. Lo anterior es confirmado por trabajos realizados por Ohlinger y col. (64) en donde señalan los títulos HA obtenidos a partir de hígado y otros órganos de conejo.

Obtenidas las diferentes fracciones cromatográficas del homogenizado de hígado infectado, se decidió que la prueba de HA e IHA fueran de seguimiento viral, esto es, de una manera indirecta pero sumamente fácil de realizar poder detectar la presencia o ausencia del virus. De los resultados del análisis de las fracciones interpretamos que este virus eluye en el primer pico de la cromatografía, en otras palabras, el virus es totalmente excluido del Sephadex G-200SF y por esta razón se encuentra presente en las primeras fracciones cromatográficas. A esta afirmación se llegó por que tales fracciones dieron una actividad HA positiva, esta hemoaglutinación fué inhibida cuando se empleó el antisuero específico. Hasta este momento si bien no

se había obtenido al virus completamente purificado, sí se le había quitado mucho de la contaminación inicial del homogenizado de hígado, lo que representa una purificación indudable y suficientemente adecuada para un estudio de ME.

Para entonces, el Departamento de Inmunología y Virología contaba ya con un conjugado para inmunofluorescencia destinado a la detección del virus de esta enfermedad y surgió la idea de aplicar dicho conjugado a los eritrocitos aglutinados con las fracciones cromatográficas de la purificación viral. Después de varios ensayos se obtuvo un resultado interesante y positivo a nuestro propósito. Al realizar una IF directa en los eritrocitos aglutinados y observarla al microscopio de fluorescencia se encontró una fluorescencia positiva y específica en la superficie de los eritrocitos aglutinados. De lo anterior puede afirmarse dos cosas, primero, que el conjugado para IF utilizado reaccionó con los eritrocitos aglutinados, y de ser específico este conjugado, se deduce que en la superficie de los mismos efectivamente se encontraba virus presente y por lo tanto responsable de la hemoaglutinación, sin embargo, seguía siendo sólo una evidencia indirecta. Segundo, implementamos una modalidad diferente tanto para la prueba de HA como para la de IF. ¿ Qué tan práctica será como una prueba de diagnóstico rutinaria ? sobre todo para aquellos virus no cultivables en el laboratorio empleando los eritrocitos adecuados y los conjugados específicos para cada enfermedad en cuestión. Sentimos que requiere ser evaluada más extensamente.

Resumiendo, la evidencia hasta aquí obtenida indica de una manera indirecta que esta enfermedad es muy probablemente de etiología viral. Pero qué faltaba hacer para confirmarlo definitivamente, solamente la observación directa del virus mediante ME, cuyos resultados se discuten más adelante. Sin embargo, no bastaba aún con observar al virus directamente, sino para cumplir con los postulados de Koch, reproducir la enfermedad en animales susceptibles, a partir del homogenizado de hígado infectado y volver a recuperar al agente responsable de la enfermedad, lo cual no se realizó en este trabajo de tesis porque al tratarse de una enfermedad exótica para nuestro país, la SARH (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos) y la CPA (Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales) determinaron el uso exclusivo de virus inactivo para fines de investigación. No obstante lo dimos como un hecho por la información proporcionada por el Dr. Fraire.*

* Comunicación Personal

Con respecto a la ME realizada, cabe discutir una nueva modalidad que hasta ahora no se ha reportado en la Virología. La observación del virus de la EHC, en TN directamente sobre la superficie de los eritrocitos aglutinados, y fué exactamente de esta manera como se logró por primera vez observar al virus, tal y como es demostrado por las electronografías obtenidas, contradiciendo lo reportado por Hernández y col. (40) quienes mencionan que al examinar los eritrocitos aglutinados por el virus no encontraron partículas sugestivas de virus. La anterior modalidad puede abrir una nueva posibilidad para el diagnóstico virológico mediante ME. Es también justo decir que la resolución lograda de esta manera no es tan buena cuando la comparamos con otras técnicas, sin embargo para nuestro propósito, esta modalidad sirvió como preámbulo para la caracterización del virus de la EHC por ME.

Es adecuado señalar, que la ME aparte de ser un instrumento de investigación en las diferentes áreas del quehacer científico, cuenta con una faceta de aplicación práctica inmediata, esto es, la de ser una herramienta para el diagnóstico de las enfermedades virales tanto en el hombre como en los animales domésticos (31,53,54,55). Además puede ser combinada con otras pruebas como la Inmunoprecipitación (8,37), en el caso de esta tesis con la HA.

Este diagnóstico rápido por ME es posible gracias a la utilización de la TN, que representa el método más breve y económico para la observación de los virus, inclusive puede realizarse con material no tan purificado (29). Además de poder caracterizar al virus en cuestión en Familia y Género, se puede saber también su serotipo empleando para ello antisueros específicos lo que sería entonces la MIE (26,31). Esto último ha sido reportado por Valicek, y col. (90) que señala que el virus responsable del brote en Checoslovaquia presenta relación antigénica con el de la enfermedad en China.

Una vez que se había observado al virus por primera vez, nos alentó a seguir adelante con nuestro propósito de caracterizarlo. Para ello era necesario obtener electronografías con la mayor resolución posible, de tal manera que se trabajó con el virus purificado por cromatografía y con las gamaglobulinas específicas purificadas. Dicho sea de paso, las gamaglobulinas fueron purificadas por exclusión cromatográfica confirmando lo obtenido por Boyle y Langone (8) además de Hudson y Hay (42). A esto se puede agregar que si bien no se logró coleccionar una gran cantidad

de gamaglobulinas de esta manera, también se partió de una cantidad pequeña de antisuero. De tal modo que la exclusión cromatográfica proporcionó la alternativa de utilizando una pequeña cantidad de antisuero, y en un solo corrimiento en Sephadex G-200 SF obtener directamente suficientes gamaglobulinas para ser utilizadas en la MIE.

Referente a la MIE puede discutirse que no es tan complicado llevarla a cabo, incluso dió buen resultado la modificación realizada al procedimiento descrito por Doane y Anderson (22), en cuanto a tiempo y material, o sea, fué más rápido y económico. En base a los resultados logrados en la MIE se interpreta que efectivamente se producen anticuerpos contra este virus en los conejos y por lo tanto el antisuero utilizado para la prueba de IHA, el conjugado para IF y las gamaglobulinas purificadas fueron realmente específicos. Hasta el momento ningún trabajo ha reportado esta MIE con el virus de la EHC en México.

Para concluir esta discusión, se abordará la caracterización del virus de la EHC. Existen varios trabajos realizados por diversos autores en diferentes partes del mundo, en donde intentan caracterizar a este virus dando como consecuencia una divergencia de opiniones. Lo caracterizan como Parvovirus (3,17,18,34,35,36,52,87,89,97,98), también como Picornavirus (2,3,9,14,17,45,76,87,97,99), y más recientemente como Calicivirus (6,15,17,33,36,44,47,64,65,69,73,84,86,87,89,90). En donde han empleado diferentes métodos y técnicas de laboratorio.

Por lo que toca a este trabajo de investigación, puede afirmarse que este virus de la EHC presenta las siguientes características morfológicas a la ME, una forma esférica y una configuración icosaédrica, un tamaño aproximado de 35 nm de diámetro, carente de envoltura, además de presentar depresiones en la superficie (65,69,73) conformando lo que algunos llaman "estrella de David" (26,44,68) y proyecciones hacia el exterior del virión (44,89). Datos que nos sugieren se trata de un virus perteneciente en la clasificación actual a la familia CALICIVIRIDAE (26,68).

CONCLUSIONES

Es evidente que lo que aparece en las electronografías obtenidas es un virus, que está presente en el homogenizado de hígado de conejo infectado, que se purifica por Exclusión

Cromatográfica. Este virus hemoaglutina eritrocitos humanos del grupo sanguíneo "O", tal HA es inhibida por anticuerpos específicos presentes en el suero de animales recuperados de la enfermedad. Estos anticuerpos son purificados también por Exclusión Cromatográfica y que tales inmunoglobulinas al conjugarse con isotiocianato de fluoresceína proporcionan una Inmunofluorescencia específica cuando son aplicadas a los eritrocitos aglutinados por el virus. Además, agregan al virus en complejos inmunes cuando son observados en TN. El virus de la EHC es observado sobre la superficie de los eritrocitos aglutinados mediante ME. Este virus en base a la caracterización morfológica se asemeja a los miembros de la familia CALICIVIRIDAE.

Por todo lo anterior se determina que este virus es el agente etiológico de la EHC en México. La exclusión cromatográfica es una alternativa para la purificación del virus. Las pruebas de HA, IHA, IFD sobre los eritrocitos aglutinados por el virus, aparte de la ME de la hemoaglutinación viral y la MIE son útiles para el diagnóstico de la enfermedad.

LITERATURA CITADA

1. Almeida, J. D. and Waterson, A. P.: The morphology of virus-antibody interaction. Adv. Virus Res., **15**: 307-338 (1969).
2. An, S. H., Kim, B. H., Lee, J. B., Song, J. Y., Park, B. K., Kwon, Y. B., Jung, J. S. and Lee, Y. S.: Studies on picornavirus haemorrhagic fever (tentative name) in rabbits. 1. Physico-chemical properties of the causative virus. Res. Rep. Rural Develop. Adminis. Vet., **30**: 55-61 (1988). In Vet. Bull., **59**: Abst. 2789 (1989).
3. Argüello, V. J. L., Llanos, P. A. y Pérez-Ordoyo, G. L. I.: Enfermedad vírica hemorrágica del conejo en España. Med. Vet., **5**: 645-650 (1988).
4. Beale, A. J. and Mason, P. J.: Electron microscopy of poliovirus antigen antibody precipitates extracted from gel diffusion plates. J. Gen. Virol., **2**: 203-204 (1968).
5. Belezmezov, P., Petkov, A., Mitov, B. and Peshev, R.: Pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits. Veterinarna Sbirka, **87**: 17-21 (1989). In Vet. Bull., **60**: Abst. 4747 (1989).
6. Boucher, S.: VHD or viral haemorrhagic disease of rabbits. Cuniculture (Paris), (89): 242-246 (1989). In Vet. Bull., **60**: Abst. 3973 (1990).
7. Boujon, C. E., Gafner, F. R. and Bestetti, G. E.: Infectious necrotic hepatitis of rabbits: first cases in Switzerland. Schweiz. Arch. Tierheilkd., **131**: 71-76 (1989). In Vet. Bull., **60**: Abst. 1886 (1990).
8. Boyle, D. P. and Langone, J. J.: A simple procedure to use whole serum as source of either IgG or IgM specific antibody. J. Immun. Methods, **32**: 51-58 (1980).
9. Buonavoglia, C., Di Trani, L., Di Pasquale, R., Tinari, A., Ruggeri, F. M. e Galassi, D.: Sui recenti episodi di mortalità nei conigli in Italia (Nota preliminar) Selezione Veterinaria, **29**: 1509-1510 (1988).
10. Cancellotti, F. M., Villeri, C., Renzi, M. e Monfredini, R.; Le insidie della malattia X del coniglio. Rev. Coniglicoltura, (9) : 41-46 (1988).
11. Cancellotti, F. M., Villeri, C., Renzi, M. and Monfredini, R.: Occurrence of X disease of rabbits. Rev. Coniglicoltura, **25**: 41-46 (1988). In Vet. Bull., **59**: Abst. 3350 (1989).

12. Cancellotti, F. M., Villeri, C., Renzi, M. y Monfredini, R.: La enfermedad X del conejo. Cunicultura, **14**: 12-16 (1989).
13. Cancellotti, F., Colin, M. and Prigent, A. Y.: Account of the seminar on rabbit haemorrhagic disease (VHD). Cuni-Sciences, **6**: 1-11 (1990). In Vet. Bull., **61**: Abst. 1198 (1991).
14. Cao, S. Z., Liu, S. G., Gan, M. H., Liu, R. P., Cai, S. W. and Liu, S. F.: A preliminary report on viral haemorrhagic pneumonia (tentative name) in rabbits. Chin. J. of Vet. Med., **12**: 9-11 (1986). In Vet. Bull., **57**: Abst. 1348 (1987).
15. Capucci, I., Scicluna, M., Lavazza, A. and Brocchi, E.: Purification and characterization of the aetiological agent of viral haemorrhagic disease of rabbit. Selezione Veterinaria, **31**: 301-312 (1990). In Vet. Bull., **60**: Abst. 4745 (1990).
16. Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (C.P.A.) : Gran brote de la enfermedad viral hemorrágica de los conejos, fatal para ellos, en México. Boletín Informativo Extra. C.P.A. México, D. F., 1989.
17. Contera, C.: La nueva enfermedad hemorrágica del conejo. En Enfermedad vírica hemorrágica del conejo en España. Industrias Purina. México, D. F., 1989.
18. Contera, C.: Mesa redonda de expertos en Verona (Italia). En Verona y Valencia cumbres internacionales sobre la enfermedad hemorrágica vírica. Industrias Purina. México, D. F., 1989.
19. Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S., Wood, W. B. y Mc Carty, M.: Tratado de Microbiología. 2a. ed. Salvat. Barcelona, España, 1979.
20. Deng, R., Xu, W. and Du, N.: Characteristics of rabbit haemorrhagic disease virus. J. Nanjing Agric. Univ. (Nanjing Nongye Daxue Xuebao), (2): 110-114 (1987). In Vet. Bull., **59**: Abst. 896 (1989).
21. Dirección General de Fomento y Protección Pecuaria.: Información oficial sobre el síndrome neuromohepático en conejos. Anexo de circular del Colegio Nacional de Médicos Veterinarios Zootecnistas de México A.C., México, D.F., 1989.
22. Doane, F. W. and Anderson, N.: Electron Microscopy in

- Diagnostic Virology. Cambridge University Press, New York, 1987.
23. Facchin, E.: La "maladie X" des lapins. Cuniculture, **15**: 275-276 (1988).
 24. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (F.M.V.Z.): Más información sobre el brote de la enfermedad viral hemorrágica de los conejos. Boletín Informativo F.M.V.Z., UNAM., (8): 6 (1989).
 25. Fenner, F., Bachmann, P. A., Gibbs, E. P. J., Murphy, F. A., Studdert, M. J. and White, D. O.: Veterinary Virology. Academic Press, Orlando, Florida, 1987.
 26. Field, A. M.: Diagnostic virology using electron microscopic techniques. Adv. Virus Res., **27**: 1-69 (1982).
 27. Fraire, C. M., Benitez, P. I. y Velázquez, E. A.: Pruebas de hemoaglutinación (HA), inhibición de la hemoaglutinación (IHA) e inmunofluorescencia (IF), aplicadas al diagnóstico de la enfermedad hemorrágica viral de los conejos (EHVC). Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. México, D. F., 1989. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México, D. F. (1989).
 28. Frescura, T., Gialletti, L., Rutili, D., Fioroni, A., Marini, C. and Mario de Mia, G.: Viral haemorrhagic disease of rabbits. Obiettivi Documenti Vet., **10**: 37-40 (1989). In Vet. Bull., **59**: Abst. 4042 (1989).
 29. Gardner, P. S.: Rapid virus diagnosis. Review article. J. Gen. Virol., **36**: 1-29 (1977).
 30. Gay, G. J.: Métodos aplicables en la prevención de las enfermedades exóticas y emergentes del cerdo. Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales. México, D. F., 1989.
 31. Gibbs, E. P. J., Smale, C. J. and Voyle, C. A.: Electron microscopy as an aid to the rapid diagnosis of virus diseases of veterinary importance. Vet. Rec., **106**: 451-458 (1980).
 32. Górski, J., Mizak, B., Kesy, A., Fitzner, A. and Loj, H.: Cunipest: a Polish vaccine against viral haemorrhagic

- disease of rabbits. Med. Veter., 45: 519-521 (1989). In Vet. Bull., 60: Abst. 6234 (1990).
33. Granzow, H., Schirrmeyer, H. and Tews, G.: Viral haemorrhagic septicaemia of rabbits: some properties of the causal agent. Monatsh. Veterinaermed., 44: 379-380 (1989). In Vet. Bull., 60: Abst. 2554 (1990).
 34. Gregg, D. A. and House, C.: Necrotic hepatitis of rabbits in Mexico: A parvovirus. Vet. Rec., 125: 603-604 (1989).
 35. Gregg, D. A. and House, C.: Necrotic hepatitis of rabbits: a fatal new parvoviral disease of rabbits. In press. (1990).
 36. Gregg, D. A., Lavazza, A. and Morisse, J. P.: Viral haemorrhagic disease of lagomorphs. The meeting on VHDL. Paris, Francia 1989. Office International des Epizooties, Paris, Francia. 1989.
 37. Gu, Z. D., Wang, X. X., Li, Q. Z. and Sun, F. F.: An inactivated vaccine against haemorrhagic pneumonia in rabbits. Chin. J. Vet. Med., 12: 50-51 (1986). In Vet. Bull., 57: Abst. 810 (1987).
 38. Gunenkov, V., Kuznetsova, G. D. and Karpov, V. M.: Viral haemorrhagic disease of rabbits. Krolikovod. Zverovod., (3): 20-21 (1989). In Vet. Bull., 59: Abst. 6439 (1989).
 39. Gunenkov, V. V.: Viral haemorrhagic disease of rabbits. Veterinariya (Mosc), (5): 13-15 (1990). In Vet. Bull., 60: Abst. 6244 (1990).
 40. Hernández, B. E., Colmenares, V. G., González, G. S., Mendoza, E. S., Robles, R. R. y Ciprián, C. A.: Estudio de microscopía electrónica de transmisión de la enfermedad hemorrágica viral de los conejos (EHVC). Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. México, D. F. 1989. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, D. F. (1989).
 41. Howe, C. and Lee, L. T.: Virus-erythrocyte interactions. Adv. Virus Res., 17: 1-50 (1972).
 42. Hudson, L. and Hay, F. C.: Practical Immunology. 2nd. ed. Blackwell Scientific, New York, 1980.
 43. Kim, B. H., Lee, J. B., Song, J. Y., An, S. H., Chung, J. S. and Cho, Y. J.: Studies on picornavirus haemorrhagic fever

- (tentative name) in rabbits. 2. Development of inactivated vaccines. Res. Rep. Rural Develop. Adminis. Vet., 31: 7-11 (1989). In Vet. Bull., 60: Abst. 5579 (1990).
44. Lavazza, A., Capucci, L. and Scicluna M. T.: The viral haemorrhagic disease of rabbits (A review completed by personal observations). Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia. Brescia, Italy 1989.
 45. Lee, C. S. and Park, C. K.: Aetiological studies on an acute fatal disease of Angora rabbits: so-called rabbit viral sudden death. Korean J. Vet. Res., 27: 277-290 (1987). In Vet. Bull., 58: Abst. 3446 (1988).
 46. Liu, S. J., Xue, H. P., Pu, B. Q. and Qian, N. H.: A new viral disease in rabbits. Anim. Husbandry Vet. Med. (Xumu yu Shouyi), 16: 253-255 (1984). In Vet. Bull., 55: Abst. 5600 (1985).
 47. Maess von, J., Matthes, S. and Flauss, G.: Serological study on the occurrence of viral haemorrhagic disease of rabbits in North Germany. Tieraerztl. Umsch., 44: 423-425 (1989). In Vet. Bull., 60: Abst. 205 (1990).
 48. Maramorosch, K. and Koprowski, H.: Methods in Virology. Vol II. Academic Press, New York, 1969.
 49. Marcato, P. S., Benazzi, C., Vecchi, G., Salda della, L., Simoni, P., Aiello, P. and Tumino, G.: Hepatitis necrótica infecciosa del conejo. Perfil patogénico de una nueva enfermedad hemorrágica. Cunicultura, 14: 6-9 (1989).
 50. Marcato, P. S., Benazzi, C., Galeotti, M. and Salda della, L.: Infective necrotic hepatitis of leporids. Riv. Coniglicoltura, 26: 41-50 (1989). In Vet. Bull., 60: Abst. 204 (1990).
 51. Martin, S. J.: The Biochemistry of Viruses. Cambridge University Press, London, 1978.
 52. Mason, J.: Status report= outbreak of viral haemorrhagic disease (VHD) in rabbits in Mexico. Commission for the Prevention of Foot-and Mouth Disease and other Exotic Diseases of Animals (CPA). México, D. F., 1989.
 53. McFerran, J. B., Clarke, J. K. and Curran, W. L.: The application of negative contrast electron microscopy to

- routine veterinary virus diagnosis. Res. Vet. Sci., **12**: 253-257 (1971),
54. McFerran, J. B., McNulty, M. S. and Curran, W. L.: Diagnosis of avian viral diseases by electron microscopy. Am. J. Vet. Res., **39**: 505-508 (1978).
 55. McFerran, J. B. and McNulty, M. S.: Modern diagnostic methods in practice. Aids to diagnosis of virological diseases. Br. Vet. J., **137**: 455-463 (1981).
 56. Mocaari, E., Palya, V. and Sinkovics, G.: An inactivated vaccine against viral haemorrhagic disease of rabbits. Riv. Coniglicoltura, **26**: 37-39 (1989). In Vet. Bull., **60**: Abst. 882 (1990).
 57. Mohanty, S. B. y Dutta, S. K.: Virología Veterinaria. Interamericana, México, D. F., 1983.
 58. Morisse, J. P.: The haemorrhagic septicaemia syndrome in the rabbits: first observation in France. Point Vét. **20**: 835-839 (1988). In Vet. Bull., **59**: Abst. 4761 (1989).
 59. Morisse, J. P., Picault, J. P., Boilletot, E. and Morin, M.: Aetiological relations between European brown hare syndrome (EBHS) and viral haemorrhagic disease of rabbits (VHD). Rev. Med. Vet. (Toulouse), **141**: 463-467 (1990). In Vet. Bull., **61**: Abst. 256 (1991).
 60. Nowotny, N., Fuchs, A., Schicher, F. and Loupal, G.: Occurrence of viral haemorrhagic disease of rabbits in Austria. I. Pathological and virological investigations. Wien. Tierärztl. Monatsschr., **77**: 19-23 (1990). In Vet. Bull., **60**: Abst. 6243 (1990).
 61. Office International des Epizooties.: Una nueva enfermedad del conejo en Europa. Infor. Sanit., **1**: 46-47 (1988).
 62. Office International des Epizooties.: La neumonía hemorrágica del conejo en Europa. Infor. Sanit., **1**: 56 (1988).
 63. Office International des Epizooties.: Viral haemorrhagic disease (VHD) of rabbits. Disease Infor., **2**: 5-7 (1989).
 64. Ohlinger, V. F., Haas, B., Ahl, R. and Weiland, F.: Infectious haemorrhagic disease of rabbits. Contagious disease caused

- by calicivirus. Tieraerztl. Umsch., **44**: 284-294 (1989). In Vet. Bull., **59**: Abst. 6438 (1989).
65. Ohlinger, V. F., Hass, B., Meyers, G., Wieland, F. and Thiel, H. J.: Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. J. Virol., **64**: 3331-3336 (1990).
 66. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO): Neumonía hemorrágica viral del conejo. Boletín Informativo sobre Enfermedades Exóticas. FAO (22): 6-7 (1989).
 67. Pages, M. A.: Aspectos epidemiológicos y laboratoriales de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHD) en España. Laboratorios Hipra, S. A. Industrias Purina, México, D. F., 1989.
 68. Palmer, E. L. and Martin, M. L.: An Atlas of Mammalian Viruses. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982.
 69. Parra, F. and Prieto, M.: Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. J. Virol., **64**: 4013-4015 (1990).
 70. Peshev, R., Petkov, A., Belezov, P., Mitov, B., Bostandzhieva, R. and Lyutskanov, M.: An acute, contagious disease of domestic rabbits accompanied by a haemorrhagic syndrome. Veterinarna Sbirka, **87**: 34-36 (1989). In Vet. Bull., **59**: Abst. 7077 (1989).
 71. Peshev, R. and Ivanov, Ya.: Micro-complement fixation test for viral haemorrhagic disease of rabbits. Veterinarna Sbirka, **87**: 31-34 (1989). In Vet. Bull., **60**: Abst. 2556 (1990).
 72. Pharmacia Fine Chemicals : Gel Filtration. Theory and Practice. Rahms i Lund, Uppsala, Sweden, 1979.
 73. Plana, D. J., Vayreda, C. M., Bastons, P. M y Vilá, M. X.: Calicivirus: Firme candidato como agente inductor de la enfermedad vírica hemorrágica del conejo. Laboratorios Sobrino, Gerona, España 1989.
 74. Prigent, A. Y.; La maladie "X" ou pneumonie hamorragique du lapin en Italie. Cuniculture, **16**: 48-51 (1989).

75. Prigent, A. Y.: Coloquios internacionales sobre la "enfermedad vírica hemorrágica del conejo". Cunicultura, **14**: 101-103 (1989).
76. Pu, B. Q., Qian, N. H. and Cui, S. J.: Micro HA and HI test for the detection of antibody titers to so-called "haemorrhagic pneumonia" in rabbits. Chin. J. Veterinary Med., **11**: 16-17 (1985). In Vet. Bull., **57**: Abst. 809 (1987).
77. Rodák, L., Smíd, B., Valíček, L., Vesely, T., Stepanek, J., Hampl, J. and Jurak, E.: Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and determination of its major structural proteins. J. Gen. Virol., **71**: 1075-1080 (1990). In Vet. Bull., **60**: Abst. 4746 (1990).
78. Rodák, L., Granátová, M., Valíček, L., Smíd, B., Vesely, T. and Nevoránková, Z.: Monoclonal antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and their use in the diagnosis of infection. J. Gen. Virol., **71**: 2593-2598 (1990). In Vet. Bull., **61**: Abst. 1197 (1991).
79. Rosell, J. M., Badiola, J. I. and Badiola, J. J.: Viral haemorrhagic disease of rabbits. Epidemiology and control. Cuniculture (Paris), (89): 21-26 (1989). In Vet. Bull., **60**: Abst. 3974 (1990).
80. Schirrmeier, H., Granzow, H., Bergmann, H. and Schluter, H.: Experimental study of viral haemorrhagic septicaemia in rabbits. Monatsh. Veterinaermed., **45**: 193-197 (1990). In Vet. Bull., **60**: Abst. 6233 (1990).
81. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). Sistema Nacional de Emergencia en Salud Animal (SINESA).: Operación del Sistema Nacional de Emergencia en Salud Animal de México para la Erradicación del Brote de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos. SARH, SINESA., México, D. F., 1989.
82. She, R. P., Chen, D. W. and Gao, Q. Y.: Observations on the ultrastructures of host cells in rabbit viral haemorrhagic disease. Chin. J. Vet. Med., **12**: 2-4 (1986). In Vet. Bull., **57**: Abst. 5710 (1987).
83. Smíd, B., Valíček, L., Stépánek, J., Jurák, E. and Rodák, L.: Experimental transmission and electron microscopic demonstration of the virus of haemorrhagic disease of rabbits in Czechoslovakia. J. Vet. Med., **36**: 237-240 (1989).

84. Soike, D., Wilke, I., Tutte, B., Stropp, M., Rosler, D., Rummeler, H. J., Richter, W., Werdier, H., Schluter, H. and Bohme, R.: Initial results of diagnosis and control of haemorrhagic septicaemia of rabbits in the Potsdam region of the German Democratic Republic. Monatsh. Veterinaermed., **44**: 376-378 (1989). In Vet. Bull., **60**: Abst. 2553 (1990).
85. Soltysiak, Z. and Michalska, Z.: Gross lesions and histopathological picture of viral haemorrhagic disease of rabbits during the outbreak in Lower Silesia. Med. Weter., **45**: 521-524 (1989). In Vet. Bull., **60**: Abst. 6235 (1990).
86. Tesouro-Vallejo, M., Olidén-Ortiz, M. C., Fité-Sánchez, M. R., Olivar-Olivar, F., González-Montejano, A., Carro-Castro, C., Cogolludo-Cogolludo, C., Río-Agudín, C. del, Ruíz-Lozano, P., Domínguez-Sanz, T. and Frias-Soriano, N.: Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits. Med. Vet. **7**: 173-184 (1990). In Vet. Bull., **60**: Abst. 7546 (1990).
87. United States Department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service. Veterinary Services. Emergency Programs.: Necrotic hepatitis of rabbits. Foreign Anim. Dis. Rep., (17-2): 7-10 (1989).
88. United States Department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service. Veterinary Services. Emergency Programs.: Necrotic hepatitis or viral hemorrhagic disease of rabbits in Mexico. Foreign Anim. Dis. Rep., (17-3): 3 (1989).
89. United States Department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS). Science and Technology. National Veterinary Services Laboratories. Foreign Animal Disease Diagnostic Laboratory.: Viral haemorrhagic disease of lagomorphs (VHDL) (necrotic hepatitis of rabbits NHR). Trip Report for the OIE meeting in Paris and European Society of Veterinary Virologists in Lyon, France, 1989. Foreign Animal Disease Diagnostic Laboratory, Greenport, New York. 1989.
90. Valicék, L., Smíd, B., Rodák, L. and Kudrna, J.: Electron and immunoelectron microscopy of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). Arch. Virol., **112**: 271-275 (1990). In Vet. Bull., **60**: Abst. 6922 (1990).
91. Vandele, E.: Medical prevention of viral haemorrhagic disease of rabbits: vaccination and field results.

- Cuniculture (Paris)**, (92): 102 (1990). In **Vet. Bull.**, **61**: Abst. 255 (1991).
92. Wei, J. S., Yu, N. S., Yang, Y. F., Zhang, X. S., Long, P. R. and Shen, J. R.: Investigations on a viral haemorrhagic disease in rabbits in Yunnan Province. **Chin. J. Vet. Sci. Tech.**, (8): 20-24 (1987). In **Vet. Bull.**, **58**: Abst. 2594 (1988).
93. Williams, C. A. and Chase, N. W.: Preparation of antigens and antibodies. In: *Methods in Immunology and Immunochemistry*. **Academic Press**, New York, 1967.
94. Wu, G. D., Shu, Q. S., Lo, Z. Z., Chen, K. W., Zhang, G. X. and Qin, Y.; The control of rabbit viral septicaemia by immunization. **Chin. J. Vet. Med.**, **13**: 17 (1987). In **Anim. Dis. Occurr.**, **9**: Abst. 624 (1988).
95. Xu, F. N., Shen, W. P. and Liu, S. J.: Study of the pathology of viral haemorrhagic disease in rabbits. **Anim. Husbandry Vet. Med. (Xumu yu Shouyi)**, **17**: 153-155 (1985). In **Vet. Bull.**, **56**: Abst. 5261 (1986).
96. Xu, W. Y., Du, N. X. and Liu, S. J.: A new virus isolated from hemorrhagic disease in rabbits. p.p. 456-461 **Proceedings of the 4th World Rabbit Science Congress**, Budapest, Hungary, 1988.
97. Xu, W.: La enfermedad vírica hemorrágica del conejo. **Cunicultura**, **14**: 148-150 (1989).
98. Xu, W. Y., Du, N. X. and Liu, S. J.: A parvo-like virus isolated from haemorrhagic disease of rabbits. **Riv. Coniglicoltura**, **26**: 25-29 (1989). In **Vet. Bull.**, **60**: Abst. 881 (1990).
99. Xu, Z. J. and Chen, W. X.: Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review. **Vet. Res. Commun.**, **13**: 205-212 (1989).
100. Zhao, J. X., Qun, S. Q. and Zhao, Y. G.: Studies on the haemagglutinating effect of the virus of rabbit viral haemorrhagic septicaemia. **Chin. J. Vet. Med.**, **14**: 12-15 (1988). In **Vet. Bull.**, **60**: Abst. 4744 (1990).
101. Anónimo: Viral haemorrhagic disease of rabbit in Portugal. **Rev. Port. Cienc. Vet.**, **84**: 57-58 (1989). In **Vet. Bull.**, **60**: Abst. 880 (1990).

CUADRO No. 1
TITULOS INHIBIDORES DE LA HEMOAGLUTINACION EN
SUEROS DE CONEJOS ADULTOS Y JOVENES

SUERO	TITULO
Suero No. 1 (gazapo)	1/64
Suero No. 2 (gazapo)	(-)
Suero No. 3 (adulto)	1/128
Suero No. 4 (adulto)	1/512
Suero No. 5 (adulto)	1/2048

(-) = Negativo

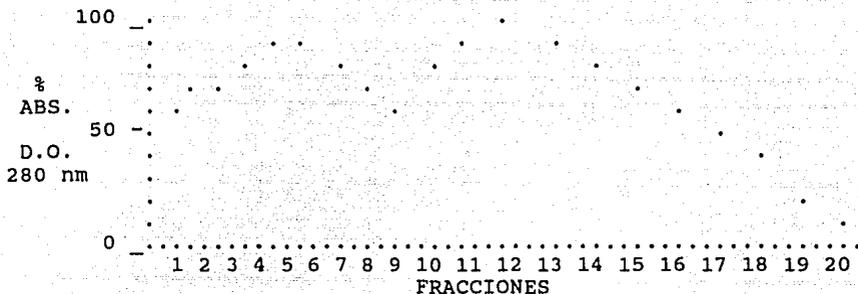


FIGURA No. 1

Gráfica de la Exclusión Cromatográfica del antisuero específico para la obtención de gamaglobulinas purificadas en Sephadex G-200 SF.
 Columna: 1.5 X 30 cm.
 Eluente: NaCl 0.15M
 Volúmen de cada fracción: 1 ml.
 Velocidad de flujo: 1.8 ml/cm²/h
 Volúmen de muestra: 1 ml.

CUADRO No. 2
TITULOS INHIBIDORES DE LA HEMOAGLUTINACION DE LAS FRACCIONES
OBTENIDAS DEL ANTISUERO ESPECIFICO

FRACCION No.	ACTIVIDAD INHIBIDORA HEMOAGLUTINANTE	TITULO
1 a 3	-	N.D
4	+	1/320
5	+	1/640
6	+	1/320
7	+	1/160
8	+	1/80
9 a 20	-	N.D

(+) Positiva
 (-) Negativa
 N.D No Determinada

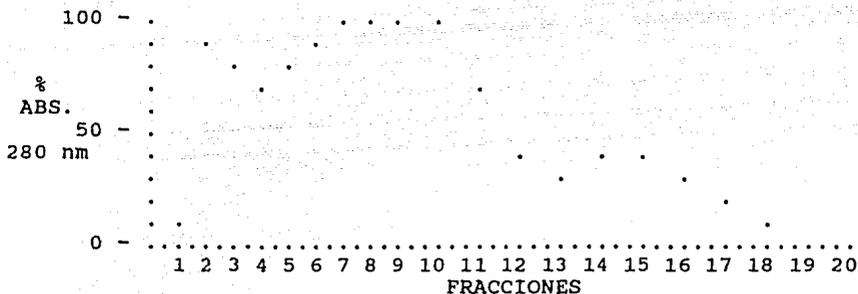


FIGURA No. 2
 Gráfica de la Exclusión Cromatográfica del homogenizado de hígado infectado de conejo para la purificación del virus de la EHC en Sephadex G-200 SF. Columna: 1.5 X 30 cm.
 Eluente: amortiguador de PO4 pH 7.5
 Volúmen de cada fracción: 1 ml.
 Velocidad de flujo: 3.3 ml/cm²/h
 Volúmen de muestra: 1 ml.

CUADRO No 3
ANALISIS DE LAS FRACCIONES CROMATOGRAFICAS OBTENIDAS
DE LA PURIFICACION VIRAL

FRACCION No.	ACTIVIDAD HA	ACTIVIDAD HA INHIBIDA*	ACTIVIDAD ** INMUNOFLORESCENTE
1 a 4	+	+	+
5 a 19	-	N.D	SOLO A FRACC. 2 y 3 N.D

(-) NEGATIVA
 (+) POSITIVA
 N.D NO DETERMINADA
 * UTILIZANDO ANTISUERO ESPECIFICO DE LA EHC
 ** UTILIZANDO CONJUGADO ESPECIFICO DE LA EHC

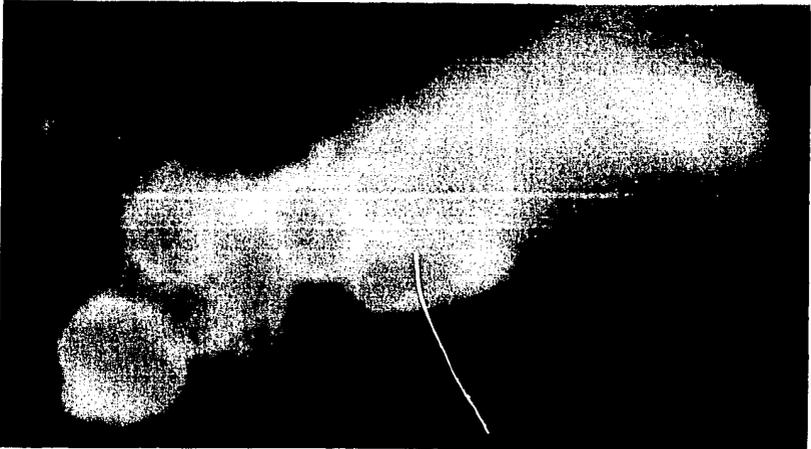


FIGURA No. 3 FOTOGRAFIA DE LA INMUNOFLORESCENCIA DE LOS ERITROCITOS AGLUTINADOS POR EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRAGICA DE LOS CONEJOS

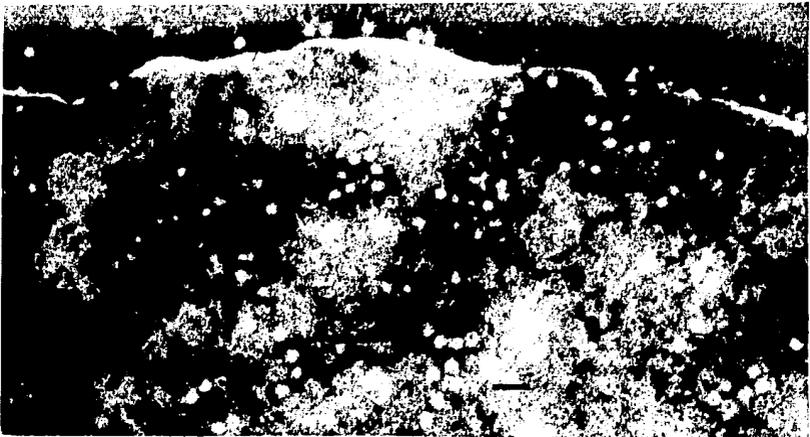


FIGURA No. 4 ELECTRONOGRAFIA DE LA HEMOAGLUTINACION VIRAL. NOTESE EL BORDE DEL ERITROCITO Y NUMEROSAS PARTICULAS VIRALES SOBRE SU SUPERFICIE. BARRA = 100 nm

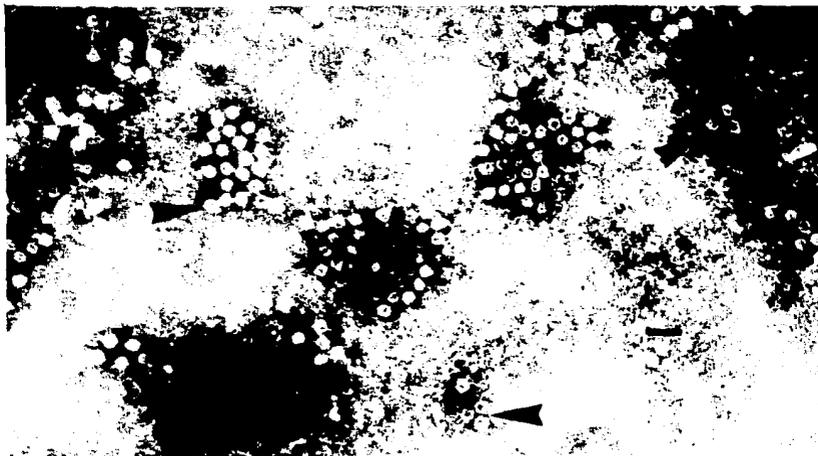


FIGURA No. 5 ELECTRONOGRAFIA DEL VIRUS DE LA EHC SOBRE UN ERITROCITO HUMANO DEL GRUPO "O". OBSERSE ALGUNAS PARTICULAS VACIAS (FLECHAS). BARRA = 100 nm

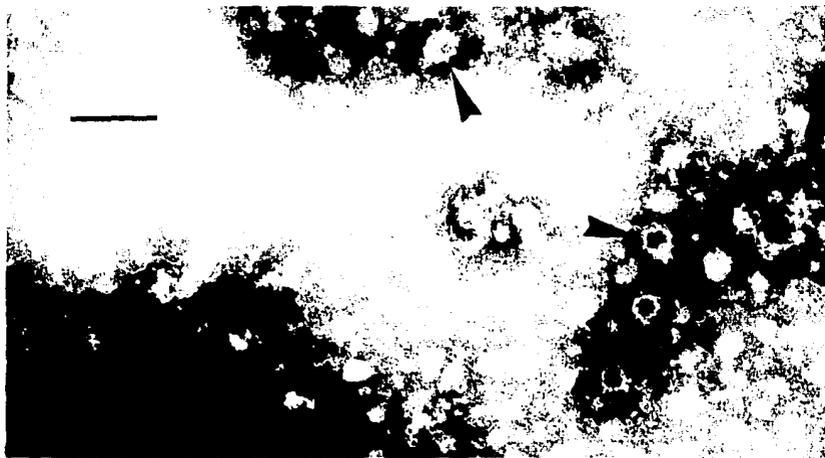


FIGURA No. 6 ELECTRONOGRAFIA DEL VIRUS DE LA EHC PURIFICADO. NOTESE LA FORMA REDONDA Y LA SIMETRIA ICOSAHEDRICA DE ESTE VIRUS (FLECHAS). BARRA = 100 nm

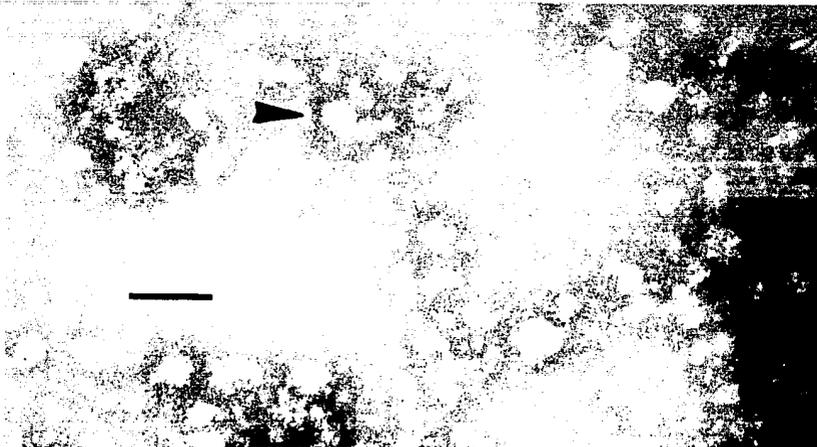


FIGURA No. 7 ELECTRONOGRAFIA DEL VIRUS DE LA EHC PURIFICADO. OBSERSE LAS DEPRESIONES EN FORMA DE "COPA" EN LA SUPERFICIE DEL VIRUS (FLECHA). BARRA = 100 nm



FIGURA No. 8 ELECTRONOGRAFIA DEL VIRUS DE LA EHC PURIFICADO. OBSERSE LAS PROYECCIONES QUE EMERGEN DEL VIRION HACIA EL EXTERIOR (FLECHAS). BARRA = 100 nm

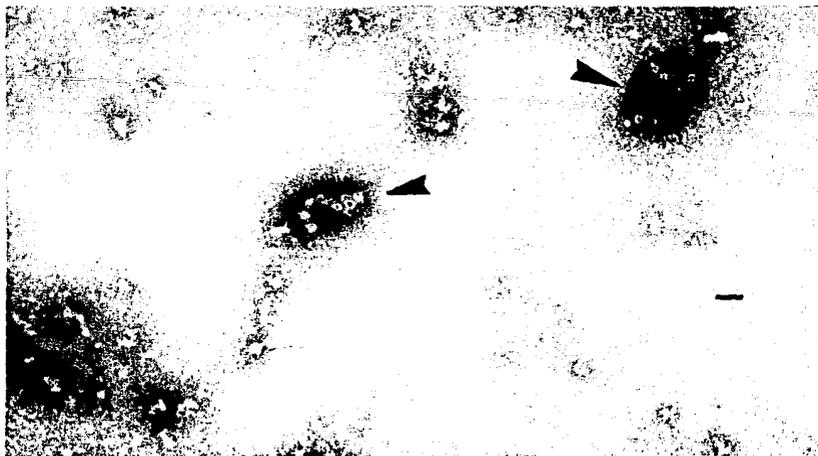


FIGURA No. 9 ELECTRONOGRAFIA DE LA MICROSCOPIA INMUNOELECTRONICA.
NOTESE LOS AGREGADOS QUE SE FORMAN AL REACCIONAR LOS
ANTICUERPOS CON EL VIRUS. BARRA = 100 nm



FIGURA No. 10 ELECTRONOGRAFIA DE LA MICROSCOPIA
INMUNOELECTRONICA. LAS PARTICULAS VIRALES NO SON BIEN
DISTINGUIDAS POR LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS. BARRA = 100 nm