



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Estudio y repercusión de la Mixomatosis
en las poblaciones silvestres de liebre

Study and impact of Myxomatosis in wild hare populations

Autor/es

Rebeca Tul Moreno

Director/es

Imanol Ruiz-Zarzuela
Ana Muniesa del Campo

Facultad de Veterinaria
2020

INDICE

	Página
1. Resumen - abstract	1
2. Introducción y justificación	2
3. Objetivos	5
4. Metodología	6
5. Resultados y discusión	7
5. 1 Etiología	7
5. 1. 1 Patogenicidad	8
5. 1. 2 Replicación	9
5. 1. 3 Caracterización genética de la nueva cepa recombinante	10
5. 2 Epidemiología	14
5. 2. 1 Especies sensibles	14
5. 2. 2 Mecanismos de transmisión	14
5. 2. 3 Inmunidad adquirida	16
5. 3 Patogenia	16
5. 4 Distribución y estacionalidad	17
5. 5 Cuadro clínico	18
5. 5. 1 Lesiones macroscópicas	20
5. 5. 2 Lesiones microscópicas	22
5. 6 Diagnóstico	23
5. 7 Medidas preventivas	25
5. 7. 1 Inmunoprofilaxis	26
6. La mixomatosis en el campo	27
6. 1 Introducción	27
6. 2 Material y métodos	27
6. 3 Resultados y discusión	28
6. 3. 1 Estudio descriptivo	28
6. 3. 2 Impacto de la enfermedad en las poblaciones de liebre ibérica	32
6. 3. 3 Acciones prácticas para el control de la enfermedad	32
7. Conclusiones - conclusions	34
8. Valoración personal y agradecimientos	36
9. Bibliografía	36

1. Resumen

La mixomatosis es una enfermedad infecciosa causada por un virus que pertenece a la familia *Poxviridae*. Se transmite principalmente por la picadura de artrópodos hematófagos o por el contacto directo con animales infectados (Joubert et al., citado en Calvete, 1999). Ocasiona altas tasas de mortalidad en el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) y actualmente se considera un ejemplo clásico de coevolución hospedador-patógeno tras su salto a las poblaciones de liebre (Kerr et al., 2015; Alves et al., citado en García-Bocanegra et al., 2020) que hasta la fecha se consideraban resistentes a la infección.

Con la publicación del “Informe sobre casos de mixomatosis de liebre en España” en agosto de 2018, por parte del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), se hacía oficial el primer caso de mixomatosis en liebre ibérica (*Lepus granatensis*). Las altas mortalidades detectadas se asocian a una nueva cepa recombinante (ha-MYXV) del virus de la mixomatosis (García-Bocanegra et al., 2019) genéticamente similar a la cepa clásica del virus que circula actualmente en las poblaciones de conejo europeo en España.

Los estudios moleculares han revelado que esta nueva variante presenta una inserción de 2,8 kilobases en la región del genoma correspondiente al gen M009L que puede hacer a este virus más virulento y patógeno hacia la liebre ibérica, además de conferirle una aparente resistencia al conejo europeo (Águeda-Pinto et al., 2019; Dalton et al., 2019).

Finalmente, para comprender la importancia de la mixomatosis en la viabilidad de esta especie, hemos recogido información a través de una encuesta epidemiológica para posteriormente reflejar los resultados más representativos, que ratifican, entre otros aspectos, el estado sanitario general de las liebres en los cotos y la influencia de la edad en la susceptibilidad de los individuos a la infección.

Abstract

Myxomatosis is an infectious disease caused by a virus belonging to the family *Poxviridae*. It is mainly transmitted by the bite of blood-borne arthropods or by direct contact with infected animals (Joubert et al., cited in Calvete, 1999). It causes high mortality rates in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and is now considered a classic example of host-pathogenic co-evolution after its jump to hare populations (Kerr et al., 2015; Alves et al., cited in Garcia-Bocanegra et al., 2020) that were previously considered resistant to infection.

With the publication of the "Report on cases of myxomatosis in hares in Spain" in August 2018, by the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAPA), the first case of myxomatosis in Iberian hares (*Lepus granatensis*) became official. The high mortalities detected are associated with a new recombinant strain (ha-MYXV) of myxomatosis virus (García-Bocanegra et al., 2019) that is genetically similar to the classical strain of the virus currently circulating in European rabbit populations in Spain.

Molecular studies have revealed that this new variant presents an insertion of 2.8 kilobases in the region of the genome corresponding to the M009L gene that can make this virus more virulent and pathogenic towards the Iberian hare, in addition to conferring it an apparent resistance to the European rabbit (Águeda-Pinto et al., 2019; Dalton et al., 2019).

Finally, in order to understand the importance of myxomatosis in the viability of this species, we have collected information through an epidemiological survey to subsequently reflect the most representative results, which confirm, among other aspects, the general health status of hares in enclosures and the influence of age on the susceptibility of individuals to infection.

2. Introducción y justificación

La mixomatosis en conejos europeos fue notificada por primera vez en 1898 por Giuseppe Sanarelli. En 1896 en Montevideo, Uruguay, la reconoció como infección letal sistémica, sin embargo, no fue capaz de aislar el agente causal siendo el origen de la enfermedad un misterio, hasta que Aragañ en 1927 lo observó por primera vez en su reservorio natural, el conejo brasileño (*Sylvilagus brasiliensis*), y lo identificó como un poxvirus por su similitud morfológica (Calvete, 1999; Kerr et al., 2015).

En 1918 surgió el interés por el virus como medio de control de las poblaciones de conejos silvestres en Australia (Fenner y Ross, citado en Calvete, 1999). En 1944 se llevaron a cabo estudios sobre su potencial de transmisión en condiciones naturales y a través de los artrópodos vectores de la zona (Fenner y Ross, citado en Calvete, 1999) y en pocos meses se extendió produciendo una mortalidad superior al 99 % y causando la extinción de la especie en gran parte del territorio (Calvete, 1999).

Desde entonces, la tasa de mortalidad es inferior al 50 % debido al aumento de la resistencia genética, el desarrollo de la inmunidad adquirida y el contacto con las cepas del virus

que sufrieron una atenuación progresiva de la virulencia (Fenner y Fantini, citado en García-Bocanegra et al., 2019).

En España, se detectó en 1953 en la provincia de Gerona (Sánchez et al., citado en Calvete, 1999), pero no fue hasta 1955 cuando se propagó hasta en 18 provincias (Muñoz, citado en Calvete, 1999).

Los primeros casos de mixomatosis en liebres se dieron en la década de 1950. Durante este periodo, se observaron ocasionalmente casos clínicos de mixomatosis en liebre europea (*Lepus europaeus*) en Francia e Irlanda. No se confirmaron más casos hasta en 2014, en Reino Unido (Barlow et al., 2014).

Posteriormente, en algunos países, han existido sospechas sin confirmación oficial, lo que puede llevar a pensar que el virus podría haber circulado previamente en las poblaciones de liebres, aunque sin el carácter epidémico que caracteriza el presente episodio (Sánchez-García et al., 2019).

Sin embargo, a mediados de julio de 2018, la Junta de Andalucía recibió la notificación de mortalidades anormales en liebres ibéricas en distintos cotos de la provincia de Córdoba. Una semana más tarde se notificaron en la provincia de Jaén y la primera semana de agosto se confirmaron mortalidades similares en la provincia de Cuenca (García-Bocanegra et al., 2019).

Durante el periodo epidémico comprendido entre julio de 2018 y abril de 2019 se estimaron un total de 10.297 liebres ibéricas encontradas muertas en el campo, unas 40,4 liebres por área afectada, siendo aproximadamente 900 las liebres encontradas vivas, pero enfermas, unas 3,5 liebres por área afectada. La tasa de mortalidad media fue del 55,4 % (García-Bocanegra et al., 2020). Desde entonces la enfermedad se ha transmitido con gran rapidez por la Península Ibérica.

En 2020, los datos publicados por el MAPA (Figuras 1 y 2) indican que la enfermedad se diseminó durante los siguientes meses, siendo 221 los casos confirmados en la campaña 2019-2020 por el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (Madrid) y afectando a 31 provincias españolas de las comunidades autónomas de Andalucía, Aragón, Castilla La Mancha, Castilla y León, Comunidad Valenciana, Extremadura, Islas Baleares, Comunidad de Madrid, Región de Murcia, País Vasco y Cataluña (MAPA, 2020).

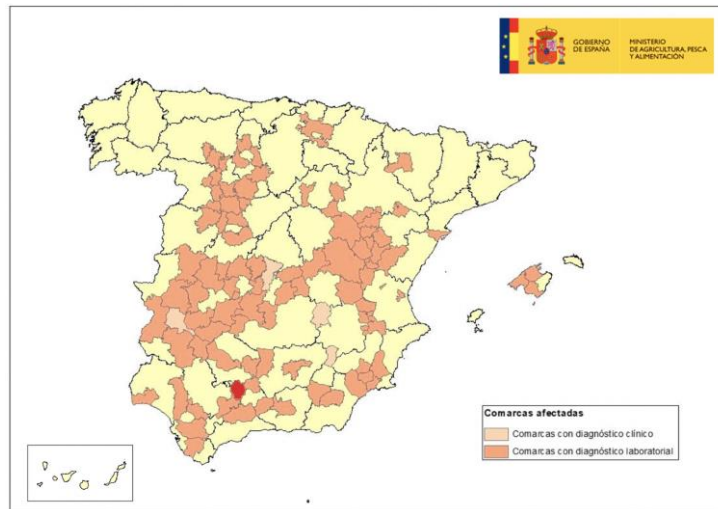


Figura 1. Principales provincias españolas afectadas por casos de mixomatosis en liebres ibéricas. El área coloreada en rojo indica el lugar dónde se confirmó el primer caso (Fuente: MAPA, 2020).

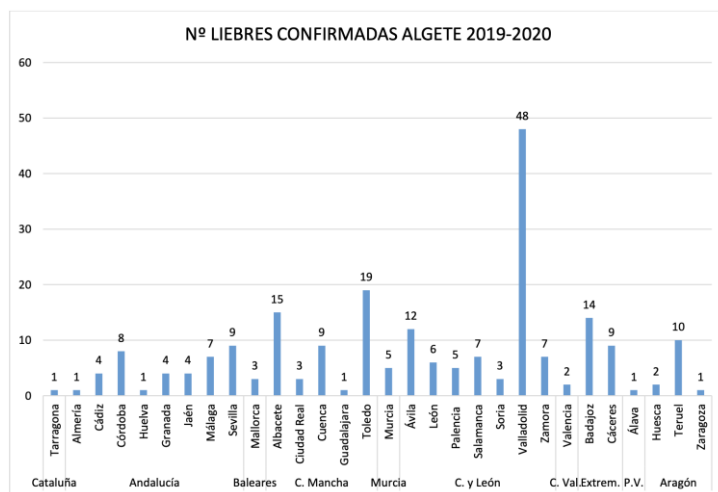


Figura 2. Distribución de los casos diagnosticados en España durante el periodo 2019-20 por el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (Fuente: MAPA, 2020).

La liebre ibérica es una especie endémica de la Península Ibérica, la ocupa en gran parte, a excepción de la cornisa cantábrica y el norte de Portugal (Figura 3), siendo en este país, la única especie de liebre. En España, es uno de los lagomorfos silvestres más representativos en términos de abundancia e interés cinegético y desempeña un papel fundamental en la pirámide ecológica de los ecosistemas mediterráneos ibéricos, siendo la presa principal de un gran número de depredadores, incluyendo especies amenazadas como el lince ibérico (*Lynx pardinus*), el lobo ibérico (*Canis lupus signatus*) y el águila imperial española (*Aquila adalberti*) (García-Bocanegra et al., 2020).

De la misma forma, habitan en la Península Ibérica la liebre europea y la liebre de piornal (*Lepus castroviejo*). La liebre europea comparte hábitat con la liebre ibérica en algunas zonas del norte. La liebre de piornal, catalogada como especie vulnerable, también es endémica y únicamente se encuentra en la cordillera cantábrica (Figura 3) (Palomo et al., 2007).

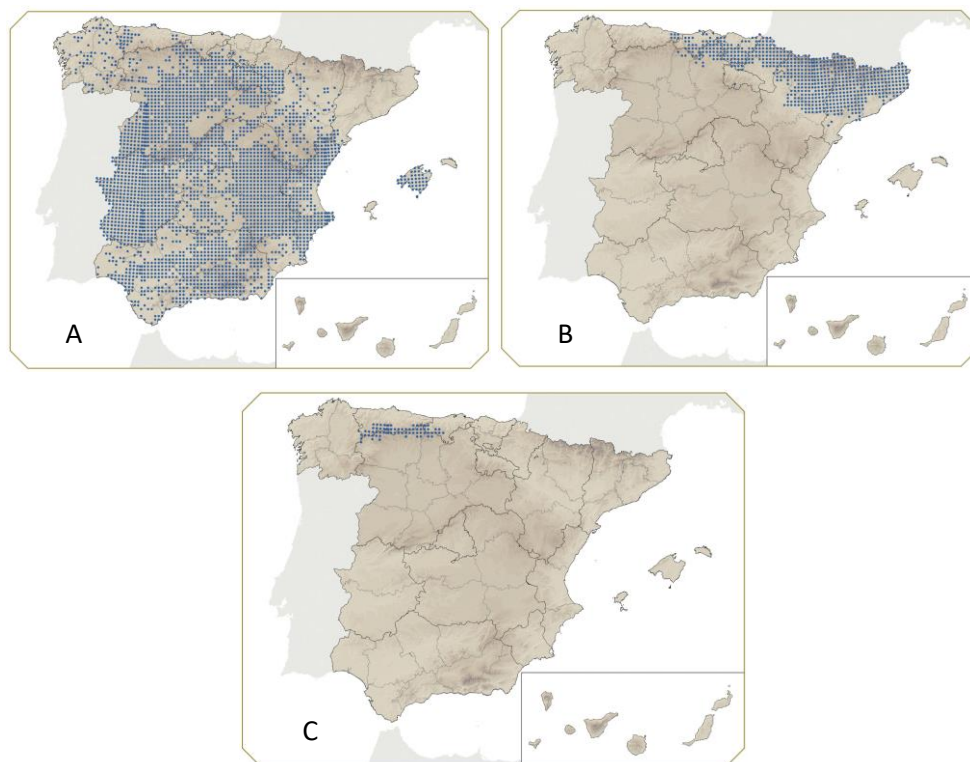


Figura 3. Distribución de (A) liebre ibérica (*Lepus granatensis*), (B) liebre europea (*Lepus europaeus*) y (C) liebre de piornal (*Lepus castroviejo*) en la Península Ibérica (Fuente: Palomo et al., 2007).

Desde el Centro de Investigación de Sanidad Animal (IRTA-CReSA), junto con la colaboración del MAPA, el apoyo de las comunidades autónomas afectadas, la participación de la Universidad de Oviedo y de Córdoba, el Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal, el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (Madrid), la Real Federación Española de Caza y la Federación Española de Galgos, así como Laboratorios Labiana y Fundación Artemisan, se ha puesto en marcha un proyecto de colaboración llamado MIXOlepus y cuyos objetivos son, entre otros, conseguir la secuenciación completa de la cepa ha-MYXV, realizar estudios de patogenia a través de inoculaciones *in vivo* y estudiar la posible eficacia de las vacunas actualmente disponibles frente a esta nueva cepa.

3. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo ha sido realizar una revisión bibliográfica sobre la mixomatosis para intentar conocer así el origen del brote causante de la epizootia en las poblaciones de liebre ibérica en España y estudiar, posteriormente, la posible relación entre el virus que afecta a las poblaciones de conejo y la cepa ha-MYXV detectada en la liebre ibérica, así como analizar la evolución y el impacto sobre estas poblaciones.

Otro objetivo complementario ha consistido en la elaboración de una encuesta epidemiológica denominada “Estudio y repercusión de la mixomatosis en las poblaciones silvestres de liebre” dirigida a personal relacionado con el sector cinegético para posteriormente analizarla, conocer el impacto real de la enfermedad y sugerir acciones prácticas para su control. Ha supuesto una limitación que en la comarca de la Ribera Baja Del Ebro, cercana a mi localidad, no se hayan diagnosticado casos, pero si en dos municipios de la comarca limítrofe, en el Bajo Martín.

4. Metodología

Las principales fuentes de información utilizadas para la elaboración de esta revisión bibliográfica han sido artículos científicos y divulgativos, como los proporcionados por el editor de revistas académicas MDPI, de acceso público, por revistas oficiales como *Viruses*, *Transboundary and Emerging Diseases* y *Veterinary Record*, por páginas web como la de Diario Veterinario, la de la Real Federación Española De Caza, la del proyecto MIXOlepus, así como documentales proporcionados por Jara y Sedal.

Para la obtención de una información más detallada, justificada y veraz se han consultado adicionalmente fuentes de información de distintos organismos oficiales como la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), el Sistema Mundial de Información Zoonositaria (WAHIS) de la OIE, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), el Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente del Gobierno de Aragón, la Fundación Artemisan y el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (LCV), así como legislación vigente, protocolos y recomendaciones en materia de actuación ante la aparición de la mixomatosis.

El uso de palabras clave como, liebre ibérica (*Lepus granatensis*), virus de la mixomatosis, mixomatosis en liebre, cepa recombinante, brote, epidemiología y España, ha resultado una herramienta fundamental para la búsqueda de esta información y para la obtención de datos concretos referidos con la enfermedad.

Además, se ha elaborado una encuesta epidemiológica dirigida a personal relacionado con el sector cinegético.

El estilo de citación utilizado para la redacción de las citas y referencias que se han incluido en el texto ha sido Harvard. Todas las citas tienen sus correspondientes referencias bibliográficas, las cuales aparecerán en el apartado de bibliografía.

5. Resultados y discusión

5.1 Etiología

El virus de la mixomatosis pertenece a la familia *Poxviridae*, subfamilia *Chordopoxvirinae* y género *Leporipoxvirus*. Se trata de un virus de gran tamaño, con 250 nanómetros (nm) de diámetro y 300 nm de longitud, que presenta una estructura compleja con un núcleo, dos cuerpos laterales, cuya función se desconoce, una membrana exterior y a veces una envoltura. Los viriones de la mayoría de los géneros tienen forma de ladrillo y una disposición irregular de estructuras tubulares en su superficie (Figura 4) (Chapter 7 - *Poxviridae*, 2017).

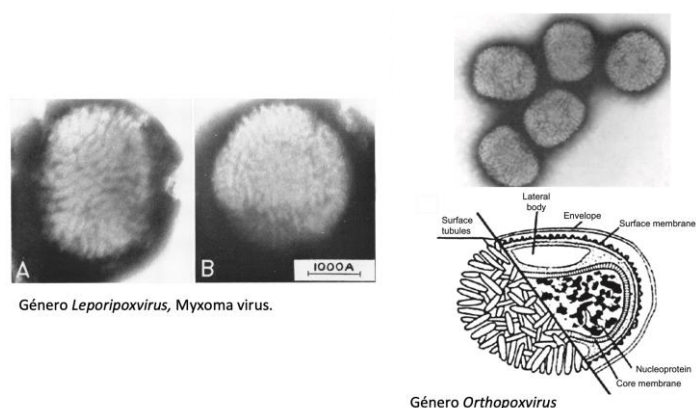


Figura 4. Características morfológicas y estructurales del virus de la mixomatosis (Fuente: Padgett et al., 1964; Chapter 7 - *Poxviridae*, 2017).

Su genoma, de gran longitud, se compone de una sola molécula de ADN de doble cadena no segmentado, con regiones terminales de repetición invertida (TIR) en ambos extremos. Tiene un total de 171 genes, 12 de ellos duplicados en las TIR (Águeda-Pinto et al., 2019). El genoma de la cepa “*Lausanne*”, prototipo del virus europeo y el primer genoma completo secuenciado del virus de la mixomatosis tiene 161.777 pares de bases (Cameron et al., citado en Águeda-Pinto et al., 2019).

Todas las cepas del virus conocidas hasta la fecha y que afectan a las poblaciones de conejo europeo proceden únicamente de dos cepas originales brasileñas. Una de ellas, denominada “Moses” o “*Standard Laboratory Strain*” (SLS) fue aislada en Río de Janeiro (Moses, citado en Calvete, 1999) y posteriormente liberada en Australia. La otra, denominada “*Lausanne*” (Lau) fue aislada en 1949 (Bouvier, citado en Calvete, 1999) liberándose en 1952 en Francia. Lau, más virulenta que SLS, sobrevino al establecimiento y a la propagación del virus en toda Europa (Bertagnoli y Marchandeu, 2015).

Su resistencia ambiental es relevante. Se conserva perfectamente en frío, siendo capaz de resistir a la congelación durante al menos 3 meses; sin embargo, las variaciones bruscas de temperatura alteran sus propiedades biológicas. La exposición a luz solar lo inactiva en una o dos semanas, pero la desecación tiene poca influencia en su viabilidad (Joubert et al., citado en Calvete, 1999).

El virus también resiste un amplio rango de pH, desde 4,6 hasta 12, lo que condiciona en gran medida el uso de productos desinfectantes, son efectivos el formol, la sosa cáustica y los derivados de amonio cuaternario (Calvete, 1999; Badiola, 2019).

Por otro lado, hay que tener en cuenta la importancia epidemiológica de los cadáveres en los que el virus puede permanecer viable alrededor de 8 días, mientras que en la piel, al tratarse de un virus ectodermotropo y centrarse las lesiones sobre todo en el tejido epitelial, su viabilidad se calcula en al menos 220 días (Joubert et al., citado en Calvete, 1999).

5. 1. 1 Patogenicidad

La patogenicidad de la enfermedad es variable y se ve influenciada por las condiciones ambientales, de tal modo que las altas temperaturas la atenúan considerablemente y suavizan su efecto, pero el frío tiende a exacerbar su virulencia (Sobey et al., citado en Calvete, 1999).

En 1957 Fenner y Marshall establecieron una categorización de grados de virulencia (I, II, IIIA, IIIB, IV y V) de las diferentes cepas del virus.

Las cepas de los grados I y II son las más virulentas, causan una mortalidad del 95-100 % y producen un curso agudo de la enfermedad. La concentración de virus incrementa tan rápido que mata a los animales al poco tiempo y disminuye la probabilidad de que se transmita debido a que infecta un número de animales relativamente pequeño. Por el contrario, las cepas menos virulentas (grado V), causan una mortalidad del 30-60 % y producen un curso subagudo de la

enfermedad. Provocan una concentración tan baja de virus que rápidamente desaparece. Las cepas de los grados III y IV, de virulencia intermedia, causan una mortalidad del 60-90 % y producen un curso crónico de la enfermedad. Estas son más fácilmente transmisibles ya que mantienen durante un tiempo relativamente largo una alta concentración de virus, lo que prolonga el periodo de infectividad (Shepherd y Edmonds, citado en Calvete, 1999).

Es probable que, a una escala geográfica amplia, distintas cepas de desigual virulencia afecten a diferentes poblaciones de conejos.

El espectro de virulencia de las diferentes cepas del virus es de naturaleza continua y está determinada por las mutaciones genéticas. El ADN del virus de la mixomatosis contiene un gran número de factores codificados, como son, entre otros, el factor de crecimiento del mixoma, el inhibidor de la proteinasa o el factor de necrosis tumoral, que no son necesarios para asegurar su replicación, pero están directamente relacionados con su patogenicidad, pues su depleción, aunque sea parcial, origina cepas víricas de reducida virulencia (McFadden et al., citado en Calvete, 1999; Mossman et al., citado en Calvete, 1999).

5. 1. 2 Replicación

El éxito de la replicación del virus de la mixomatosis puede atribuirse a su capacidad para evitar ser reconocido por el sistema inmunológico innato y adquirido del hospedador (Kerr y McFadden, citado en Stanford et al., 2007; Seet et al., citado en Stanford et al., 2007). Su genoma codifica más de 20 modificadores de la respuesta inmunitaria del hospedador que permiten manipular las respuestas antivirales e inflamatorias y funcionan como factores de virulencia necesarios para facilitar su propagación. Entre ellos se incluyen viroquinas, viroreceptores, proteínas que modulan el rango de hospedadores y/o la respuesta apoptótica y proteínas que modulan la acción de los macrófagos y las células T (Stanford et al., 2007; Chapter 7 - *Poxviridae*, 2017).

Los viroreceptores se asemejan mucho a los receptores celulares y a menudo son expresados en la superficie de las células infectadas (McFadden et al., citado en Stanford et al., 2007). Funcionalmente se unen e inhiben los ligandos extracelulares del hospedador que tienen como objetivo inducir una respuesta inflamatoria después de una infección viral (Johnston y McFadden, citado en Stanford et al., 2007).

Las viroquinas son similares a las quimiocinas (Lucas y McFadden, citado en Stanford et al., 2007) y los poxvirus codifican una amplia variedad de proteínas que interfieren específicamente con su actividad modificando su respuesta e inhibiendo o retrasando la migración de leucocitos a las zonas de infección, lo que imposibilita alcanzar una respuesta inmune efectiva, facilitando así la finalización del ciclo de replicación del virus al expresarse en una etapa temprana del curso de la infección (Chapter 7 - *Poxviridae*, 2017).

La replicación de los poxvirus se produce en el citoplasma de las células infectadas siendo la mayoría de la progenie viriones maduros carentes de envoltura, muy estables, que se liberan al exterior por lisis celular y median la transmisión entre hospedadores, por otro lado, los viriones que presentan envoltura, más frágiles que los anteriores, salen de la célula por exocitosis y se propagan dentro del hospedador. Esta replicación es detectada por la célula susceptible generalmente dentro de las 2 horas después de la infección (Chapter 7 - *Poxviridae*, 2017).

Por otro lado, los genes que codifican proteínas que intervienen en los mecanismos de replicación y en la estructura están relativamente conservados en todos los miembros de la familia *Poxviridae* y se localizan en la región genómica central, mientras que los genes que se localizan en los extremos codifican factores de rango de hospedadores y de virulencia (Chapter 7 - *Poxviridae*, 2017; Águeda-Pinto et al., 2019).

Ahora bien, si la vía de inoculación es la intradérmica o la subcutánea, la primera replicación del virus resulta más eficaz que si es por vías como la intramuscular o la intravenosa, lo que quiere decir, que la enfermedad será más leve o incluso puede no desencadenarse (Joubert et al., citado en Calvete, 1999).

5. 1. 3 Caracterización genética de la nueva cepa recombinante

Los estudios de secuenciación del genoma del virus de la mixomatosis en los últimos 50 años muestran una tasa de evolución muy alta con un número relativamente elevado de mutaciones, algo inusual para un virus cuyo genoma es ADN. Se calculan aproximadamente 1×10^{-5} sustituciones de nucleótidos por sitio y año, que se acumulan (Kerr et al., 2013).

Todos los Leporipoxvirus conocidos hasta la fecha parecen tener un reducido rango de hospedadores y sólo las especies estrechamente relacionadas son susceptibles a la infección; consecuentemente tienen una mayor probabilidad de que un virus específico de una especie

salte a otra debido a las similitudes en las moléculas receptoras, el entorno intracelular y las interacciones del sistema inmunológico del hospedador (Longdon et al., citado en Dalton et al., 2019).

Los Servicios Científicos Técnicos de la Universidad de Oviedo realizaron sucesivos análisis sobre muestras de liebres encontradas muertas con lesiones compatibles con la enfermedad para obtener la secuencia del genoma vírico y revelaron que albergaba una inserción (Ins-H1) de 2,8 kilobases (kb) (2.863 nucleótidos) localizada en el gen M009L en el extremo izquierdo del genoma (García-Bocanegra et al., 2019). Simultáneamente se analizaron cinco regiones más (M002, M008.1, M009, M069 y M135) a partir de 4 muestras de liebres (Figura 5) y salvo la anterior excepción, el genoma del virus no presentaba modificaciones relevantes.

Esta inserción también se confirmó en los dos primeros casos detectados en Portugal, lo que sugiere que las variantes ibéricas tienen un origen común (Carvalho et al., 2020).

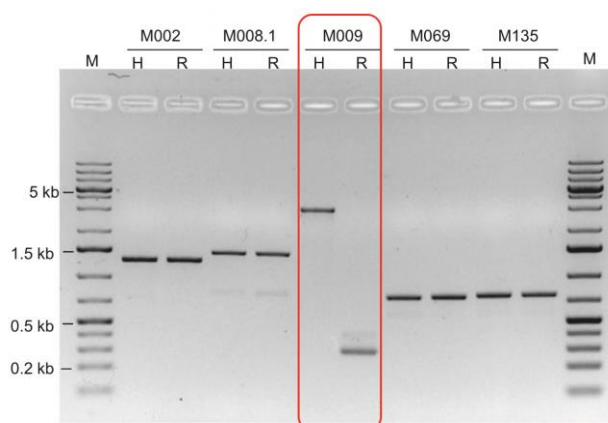


Figura 5. Regiones del genoma del virus analizadas por PCR a partir de muestras de liebres. Líneas M: marcador de talla; H: muestra de liebre; R: control positivo de un virus campo de conejos. Obsérvese la inserción de 2,8 kb en el gen M009 a diferencia del resto de genes donde no hay cambios reseñables ni diferencias en su tamaño (Fuente: Dalton et al., 2019).

La inserción Ins-H1 codifica cuatro genes filogenéticamente relacionados con los genes M060R, M061R, M064R y M065R del virus clásico del conejo y codifican cuatro proteínas que son homólogas pero no idénticas a las opuestas de este virus (Águeda-Pinto et al., 2019). Una región del genoma de la cepa Lau incluye un conjunto de seis genes que van de M060R a M065R. Sin embargo, los genes M062R y M063R que también están presentes en todos los virus de la mixomatosis clásicos, no están presentes en Ins-H1 (Figura 6) (Águeda-Pinto et al., 2019).

Adicionalmente, se observaron 110 mutaciones con respecto a la cepa Lau (García-Bocanegra et al., 2019).

ORF	Start	Stop	Strand	Function / Homology	Identity % with MYXV Lausanne* (Blastp)
m000.5L	587	369	-	Unknown	100
m001L	1590	808	-	Secreted chemokine binding protein; VACV B29R major secreted protein	100
m002L	2650	1670	-	MPV Tumor necrosis factor receptor homolog/ VACV B28R homolog	100
m003.1L	2801	3256	-	VACV B15R / CAP T3A	99
m003.2L	3667	3326	-	Unknown / CAPT3C	100
m004L	4613	3900	-	Apoptosis regulator / VACV B9R, CAP T4	99
m004.1L	4889	4617	-	Unknown / SPV C2L	100
m005L	6360	4909	-	E3 Ub ligase / VACV B4R, human ankyrin	99
m006L	7925	6396	-	Putative E3 Ub ligase / VACV A55R, SPV C4L	99
m007L	7962	8753	-	γ-IFN receptor homolog / VACV B8R, SPV C6L	99
m008L	10351	8804	-	Putative E3 Ub ligase / VACV A55R, SPV C4L	99
m008.1L	11438	10329	-	Secreted serpin, SERP-1	99
m009La	12230	11577	-	Putative E3 Ub ligase / VACV A55R, SPV C4L	Disrupted ORF
ha-m065L	13378	12323	-	Not present in MYXV	82,9 % (m065R)
ha-m064L	14013	13378	-	Not present in MYXV	36,0 % (m064R MYXV California/San Francisco 1950)
ha-m061L	14593	14048	-	Not present in MYXV	71,8 % (m061R)
ha-m060L	15074	14622	-	Not present in MYXV	68,7 % (m060R)
m009Lb	15123	15947	-	Putative E3 Ub ligase / VACV A55R, SPV C4L	Disrupted ORF
m010L	16460	16203	-	Epidermal growth factor like protein	100
m011L	16942	16442	-	Apoptosis regulator / SPV C10L	99
m012L	17401	16955	-	Deoxyuridine 5'triphosphatenucleotidohydrolase / VACV F2L	100
m013L	17801	17421	-	Pyrin domain/Inflammasome / IFN inducible protein homolog	100
m014L	19382	17829	-	Putative E3 Ub ligase / VACV F3L, SPV C13L	99
m015L	20403	19435	-	Ribonucleotide reductase, small subunit / VACV F4L	100

Figura 6. Principales cambios observados entre el genoma de la cepa ha-MYXV y la cepa Lau (Fuente: Badiola, 2019).

Los genes homólogos a los detectados en Ins-H1 podrían ser responsables del salto entre especies ya que mostraban una identidad de aproximadamente el 99 % con la cepa Lau (Cameron et al., citado en Águeda-Pinto et al., 2019) a excepción de tres genes disruptivos (M009L, M036L y M152R) que consecuentemente ocasionan un cambio determinante (Águeda-Pinto et al., 2019).

En la cepa Lau, el gen M009L codifica una proteína de 509 aminoácidos, en cambio, en la nueva variante que afecta a la liebre se interrumpió debido a una inserción de cuatro nucleótidos, dando lugar a una proteína de 148 aminoácidos. También se encontraron cuatro nucleótidos adicionales en el gen M036L que derivaron en un codón de parada y por lo tanto se eliminó su proteína correspondiente y en el gen M152R se encontró un nucleótido adicional que derivó en otro codón de parada dando lugar al mismo resultado (Águeda-Pinto et al., 2019).

Ha-M060L comparte un 68,7 % de identidad a nivel de aminoácidos con la cepa clásica, ha-M061L comparte un 71,8 %, ha-M065L comparte un 82,9 % y ha-M064L un 36,0 % estando relacionado con factores de rango de hospedadores y de virulencia (Figura 6) (Liu et al., citado en Águeda-Pinto et al., 2019).

Para determinar si Ins-H1 estaba presente en otras muestras, García-Bocanegra et al., (2019) analizaron 20 muestras de liebres procedentes de 18 provincias y en todas se

manifestaba. Por otro lado, analizaron 8 muestras de conejos positivos al virus clásico que fueron recibidas a lo largo de 2018 y todas fueron positivas al virus, pero negativas a la inserción con excepción de uno, que fue positivo (Figura 7).

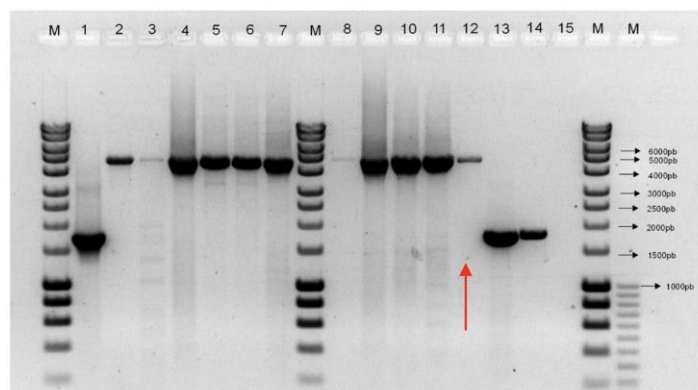


Figura 7. Todos los virus de conejo detectados antes de julio de 2018 tienen un fragmento de 1,7 kb. Todos los virus de liebre detectados entre julio-noviembre de 2018 tienen un fragmento de aproximadamente 5 kb. De la misma forma, los virus de conejo detectados a partir de julio de 2018 y marzo de 2019 tienen un fragmento de 1,7 kb a excepción de uno que tiene 5 kb. Líneas M: marcador de talla; 1: muestra de conejo, 2015; 2-11: muestras de liebre; 12: **muestra de conejo, 2018**; 13-14: muestras de conejo, 2009; 15: control negativo (Fuente: Agüero et al., 2019).

Este hallazgo sugiere que la infección en liebres se ha producido por una cepa de virus de la mixomatosis recombinante. Los genes localizados en Ins-H1 podrían estar implicados en la virulencia o presentar funciones potenciales capaces de modular la respuesta inmunitaria, lo que explicaría que este virus fuera capaz de replicarse y diseminarse en la liebre ibérica e indicaría que se trata de un salto entre especies (García-Bocanegra et al., 2019).

Búsquedas completas en el genoma de todos los poxvirus revelaron que Ins-H1 derivaba de una nueva recombinación entre el virus clásico de la mixomatosis y un poxvirus aún no identificado que comparte un origen común con los géneros *Capripoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Yatapoxvirus* y tres poxvirus sin clasificar, el virus BeAn 58058, el virus cotia y el eptesipoxvirus, compartiendo una identidad de aminoácidos con sus proteínas homólogas de entre un 69 % y un 73 % (Águeda-Pinto et al., 2019).

Los genes homólogos a la cepa del virus clásico podrían proceder de una duplicación y una posterior divergencia por acúmulo de mutaciones que ha podido darse de forma espontánea en la evolución natural del virus y que podría deberse a una presión selectiva

continúa sobre esta cepa del virus impulsada por el aumento de resistencia en las poblaciones de conejos (Agüero et al., 2019).

Durante el periodo epidémico comprendido entre julio de 2018 y abril de 2019 se dieron casos de mixomatosis en liebres ibéricas en el 75,7 % de las zonas estudiadas, sin embargo, a pesar de que los dos años anteriores se habían detectado brotes de mixomatosis en conejos silvestres, durante ese periodo, sólo se observaron casos en el 27 % de las zonas, lo que apoya las diferencias en la susceptibilidad entre estas dos especies (García-Bocanegra et al., 2020).

5. 2 Epidemiología

5. 2. 1 Especies sensibles

El conejo brasileño nativo de América del Sur y California es el reservorio natural del virus, en él está altamente adaptado y cursa con una infección subclínica o con fibromas cutáneos localizados en el punto de inoculación que únicamente persisten algunas semanas. Sólo ocasionalmente produce un cuadro más generalizado. En cambio, en el conejo europeo causa mixomatosis sistémica y a menudo es mortal (Kerr et al., 2015).

Durante los brotes de mixomatosis en el conejo silvestre en Europa, además de los casos clínicos puntuales de mixomatosis detectados en liebre europea durante la década de 1950 y el caso confirmado en Reino Unido en 2014, en España, hasta la fecha, sólo se ha confirmado mixomatosis en la liebre ibérica (Sánchez-García et al., 2019; García-Bocanegra et al., 2020).

No obstante, no se puede descartar la susceptibilidad del conejo silvestre europeo a la cepa ha-MYXV, ya que Ins-H1 fue detectada en uno de los animales muestreados por García-Bocanegra et al., (2019) y posteriormente, su material genético se volvió a confirmar en otros dos animales (García-Bocanegra et al., 2020). Adicionalmente, también se confirmó un brote en una granja de conejos domésticos de la provincia de Murcia en octubre de 2019, que causó una elevada mortalidad (García-Bocanegra et al., 2020).

No es una zoonosis y tampoco se ha detectado en otras especies, siendo muy poco probable que pueda afectar a perros, zorros o hurones (Sánchez-García et al., 2019).

5. 2. 2 Mecanismos de transmisión

Lo más frecuente es que la infección se produzca por el contacto con secreciones nasales, de la conjuntiva ocular o de la mucosa genital entre un animal sano y otro enfermo (Calvete, 1999), durante el coito (Joubert et al., citado en Calvete, 1999; Mykytowycz, citado en Calvete, 1999), las interacciones sociales o por medio de la lucha (Kerr et al., 2015), pero para ello, la piel o las mucosas deben estar previamente erosionadas (Joubert et al., citado en Calvete, 1999).

El virus también puede penetrar al organismo si es impregnado por contacto directo a través de agentes inanimados (vehículos, carros, ropa, botas, etc.) o con cadáveres y restos de animales muertos (Sánchez-García et al., 2019). Otra posibilidad es la vía aerógena, que daría lugar en condiciones de hacinamiento a la inoculación del virus en el tracto respiratorio superior (Calvete, 1999). Sin embargo, el medio de transmisión más eficaz es la transmisión vía indirecta mediante la inoculación por la picadura de artrópodos hematófagos (Kerr et al., 2015).

El virus no se replica en el artrópodo, sino que las partículas víricas permanecen en las piezas bucales protegidas por las proteínas procedentes de los exudados mixomatosos, lo que favorece la posterior multiplicación del virus en el animal receptor. De esta forma, cuando el artrópodo pica a un animal infectado, transmite el virus al picar posteriormente a un animal sano de una manera más efectiva que la puramente mecánica (Joubert et al., citado en Calvete, 1999).

De todos los artrópodos hematófagos que pueden actuar como vectores son los mosquitos (Fenner y Woodroffe, citado en Calvete, 1999) y las pulgas (Bull y Mules, citado en Calvete, 1999) los que han demostrado una mayor importancia epidemiológica, aunque en el caso de las liebres, parece que las pulgas juegan un papel menor en la transmisión en comparación con los conejos (Sánchez-García et al., 2019). Por el contrario, el papel vectorial de las garrapatas podría considerarse inexistente (Calvete, 1999) ya que pican una sola vez en cada estado de su desarrollo, y al mudar a la siguiente fase mudan también las piezas bucales contaminadas (Joubert et al., citado en Calvete, 1999).

De todos modos, los factores bióticos y abióticos que suprimen la respuesta inmunológica del animal, como la edad, el estrés nutricional, los parásitos o las enfermedades bacterianas concurrentes, pueden dar lugar a un fenotipo vírico más virulento y, por lo tanto, alterar el potencial de transmisión (Cattadori, citado en Kerr et al., 2015; Marlier, citado en Kerr et al., 2015).

5. 2. 3 Inmunidad adquirida

La inmunidad adquirida tanto por vía maternal como por vía paternal desempeña un papel clave al atenuar la gravedad de la mixomatosis en las poblaciones silvestres y complementarse con la resistencia genética individual al permitir la activación del sistema inmunológico (Williams y Moore, citado en Calvete, 1999; Bertagnoli y Marchandeu, 2015).

El virus induce una rápida e intensa respuesta de las células T en el lugar de inoculación, pero la síntesis de factores de virulencia produce una reducción de esta inmunidad celular (Mossman et al., citado en Stanford et al., 2007) y aunque la inmunidad humoral no se ve afectada en gran medida, los anticuerpos circulantes (IgG, IgM e IgA), aún a elevados títulos, no protegen contra la severa patología producida por el virus en los puntos de replicación, su diseminación y la proliferación de las infecciones bacterianas concomitantes (Kerr, citado en Calvete, 1999; Wetherall et al., citado en Calvete, 1999; Fenner y Ratcliffe, citado en Stanford et al., 2007; Graham et al., citado en Stanford et al., 2007). Es decir, la protección frente a la mixomatosis depende más de la respuesta inmunitaria celular que de la respuesta humoral (OIE, 2018).

Las IgM pueden detectarse hacia los 5-6 días postinfección alcanzando unos niveles más elevados hacia el día 28 y persistiendo entre 30-40 días, mientras que el pico de IgG tiene lugar a los 20-30 días, perdurando su presencia durante al menos 2 años (Fenner y Woodroffe, citado en Calvete, 1999; OIE, 2018). En hembras lactantes, estos anticuerpos son traspasados a su camada y son detectables hasta las 4-5 semanas de vida, aunque siguen presentando resistencia incluso hasta las 8 semanas (Fenner y Marshall, citado en Calvete, 1999).

Por otro lado, Sobey y Conolly (1986) observaron que, si la cópula tenía lugar durante los siete meses posteriores a la infección, se confería cierto grado de resistencia a la camada durante los siguientes siete meses, lo que sugirió que posiblemente, el semen procedente de los machos que se recuperaban de la mixomatosis contenía algún factor que aumentaba la resistencia de la progenie (Sobey y Conolly, citado en Calvete, 1999).

5. 3 Patogenia

La patogenia en los poxvirus sigue un patrón similar. El virus se replica inicialmente en el punto de inoculación, probablemente en las células dendríticas de la dermis o las mucosas, donde se produce el mixoma primario, desde aquí se propaga a los macrófagos locales, a las

células epidérmicas y al ganglio linfático regional correspondiente (Calvete, 1999; Chapter 7 - *Poxviridae*, 2017). Posteriormente y hacia el cuarto día, tiene lugar la viremia (Calvete, 1999) y el virus se disemina transportado en los linfocitos y posiblemente en los monocitos a los tejidos distales sin que haya prácticamente ningún virus libre en el torrente sanguíneo (Fenner y Woodrooffe, citado en Calvete, 1999; Best et al., citado en Kerr et al., 2015). Hacia el octavo o noveno día, aparecen mixomas secundarios en cabeza, párpados, orejas, región anogenital y extremidades (Calvete, 1999; Bertagnoli y Marchandeu, 2015).

Del décimo al quinceavo día, si los animales no han desarrollado resistencia, tiene lugar la muerte, que se desencadena por inanición y las complicaciones secundarias producidas por el efecto inmunosupresor del virus (Heard et al., citado en Calvete, 1999), lo que favorece la infección bacteriana secundaria por bacterias Gram negativas como *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* (Graham et al., citado en Calvete, 1999; Joubert et al., citado en Calvete, 1999), o la proliferación de helmintos parásitos (Boag, citado en Calvete, 1999; Mykytowycz, citado en Calvete, 1999) que contribuyen a la letalidad de la enfermedad. Estos hallazgos coinciden con los análisis microbiológicos descritos por García-Bocanegra et al., (2019) en los que se aislaron de las lesiones de piel y pulmón de algunas de las liebres *Staphylococcus aureus* y *Pasteurella multocida* y con los análisis parasitológicos, en los que se hallaron *Eimeria* sp. y *Trichostrongylus* sp.

El título vírico en los tejidos linfoides puede ser muy alto, lo que produce una intensa depleción de linfocitos en los ganglios linfáticos y, dependiendo de la cepa, también en el bazo. Este título se incrementa sobre todo en las lesiones cutáneas secundarias, en particular en los párpados y en la base de las orejas. El virus también se encuentra en tejidos como el pulmón y el hígado, pero generalmente el título es significativamente menor (Best y Kerr, citado en Kerr et al., 2015; Fenner et al., citado en Kerr et al., 2015; Hurst, citado en Kerr et al., 2015).

5. 4 Distribución y estacionalidad

En la actualidad, la mixomatosis en las poblaciones de conejos silvestres europeos es endémica en la mayoría de los países europeos, con una seropositividad superior al 50 % y cursa con brotes epizooticos durante verano y otoño (García-Bocanegra et al., 2020). Hasta ahora, los únicos lugares en los que no se ha registrado son Asia, África del Sur y Nueva Zelanda (OIE, 2020).

En España, el elevado número de brotes detectados consecutivamente en los últimos dos años, sugiere una circulación endémica activa de esta nueva cepa en las poblaciones de

liebre ibérica (García-Bocanegra et al., 2020). Este hallazgo es consistente con la ocurrencia endémica de mixomatosis en las poblaciones de conejo silvestre en las últimas décadas (Calvete et al., 2002; Villafuerte et al., citado en García-Bocanegra et al., 2020).

Aunque el riesgo de infección existe durante todo el año, es evidente que la presentación de la enfermedad es estacional. Los brotes que se han observado en la liebre ibérica se han concentrado entre los meses de julio y octubre (Figura 8), y el mayor número de liebres enfermas y/o muertas se ha observado transcurridos unos 30 días desde la primera detección de la enfermedad.

El pico máximo de casos se ha producido durante los meses de septiembre y octubre (Figura 8), durando los brotes aproximadamente una media de 4 meses (Sánchez-García et al., 2019; García-Bocanegra et al., 2020).

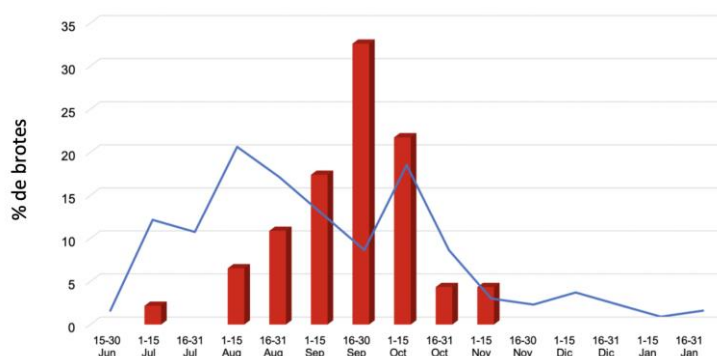


Figura 8. Evolución temporal y distribución de brotes de la enfermedad en el periodo “junio 2018 - enero 2019”, provocados por la cepa ha-MYXV en liebre ibérica (Fuente: García-Bocanegra et al., 2020).

Aunque los vectores podrían estar dispersando la enfermedad a otros territorios próximos geográficamente, los saltos observados entre diferentes provincias españolas también podrían deberse a translocaciones o movimientos ilegales de animales infectados tras la remisión de la enfermedad durante el invierno. Además, parece existir una relación entre la aparición de los brotes y los vectores, más numerosos y activos en los meses de verano y otoño, tal y como sucede con los brotes de mixomatosis en el conejo (Sánchez-García et al., 2019).

5.5 Cuadro clínico

En el conejo europeo se dan dos formas de presentación clínica, la forma clásica y la forma atípica. La forma clásica se divide a su vez en cuatro formas (sobreguada, aguda, subaguda

y subclínica). El período de incubación dura entre 5 y 7 días, aunque puede oscilar entre los 2 y los 18 días, según la virulencia de la cepa y la cantidad inoculada de virus (Calvete, 1999).

La forma sobreaguda es poco frecuente y los conejos sucumben en aproximadamente una semana. A menudo sólo muestran inflamación y edema palpebral como signos clínicos. Pueden observarse hemorragias cutáneas en la etapa final y las convulsiones suelen preceder a la muerte, desenmascarando un pronunciado neurotropismo, en detrimento del ectodermotropismo (Bertagnoli y Marchandeanu, 2015).

La forma aguda es frecuente en poblaciones que no han tenido contacto previo con el virus y se caracteriza por el desarrollo del mixoma primario, que habitualmente se localiza en la base de las orejas o en la periferia de las órbitas y evoluciona a un edema cefálico con blefaroconjuntivitis serosa que pasa a ser mucopurulenta y termina ocluyendo los párpados en pocas horas. Los pelos de la cara aparecen erizados y se aglutinan por las secreciones lo que confiere el aspecto típico de “cara leonina” al animal. En 2-3 días los mixomas invaden la región anogenital y pasados 9-10 días, al edema cefálico se le une un flujo nasal purulento. Al final los mixomas secundarios invaden toda la piel, sin afectar al tejido conjuntivo subcutáneo, siendo más numerosos en la base de las orejas y en la cara, además, es normal observar hipertrofia de los ganglios linfáticos de la región que ha sido invadida. Unos 12 días después de producirse la infección, el apetito desaparece y el animal adelgaza rápidamente, muriendo finalmente (Calvete, 1999; Bertagnoli y Marchandeanu, 2015).

La forma subaguda se da cuando la enfermedad lleva varios años entre la población y confluyen cepas poco virulentas y animales con cierto grado de resistencia. Esta forma es menos exudativa que la forma aguda, y se caracteriza por la presencia de nódulos mixomatosos en la cabeza y en las extremidades (Calvete, 1999; Bertagnoli y Marchandeanu, 2015).

La forma subclínica es la forma más leve de la enfermedad, se caracteriza por ser localizada, poco exudativa y autocurable. Los animales presentan un reducido número de nódulos de pequeño tamaño, que al principio son exudativos, pero pierden este carácter a los 5-6 días, su consistencia es firme y se localizan principalmente en la cabeza y en las extremidades (Calvete, 1999; Bertagnoli y Marchandeanu, 2015). A las 2-8 semanas, después de su cicatrización, aparecen áreas alopécicas que pueden ser visibles durante mucho tiempo (Joubert et al., citado en Calvete, 1999).

Por último, la forma atípica se caracteriza por cursar con una intensa dificultad respiratoria. Los animales afectados presentan blefaroconjuntivitis, rinitis, congestión auricular y cierto edema anogenital, siendo las lesiones cutáneas muy poco evidentes. Sin embargo, en los casos de mixomatosis típica también se registran lesiones pulmonares y viscerales, con hemorragias frecuentes asociadas a endoarteritis, así como lesiones en el epitelio bronquial (Joubert et al., citado en García-Bocanegra et al., 2019).

De la misma forma, la presentación de la forma atípica en liebres ibéricas se caracteriza por producir cambios vasculares intensos y reducidos signos clínicos cutáneos, siendo los mixomas reemplazados por un edema palpebral difuso que a veces también está presente en la región cefálica y anogenital (Joubert et al., citado en García-Bocanegra et al., 2019; Marlier et al., citado en García-Bocanegra et al., 2019).

Los dos primeros cadáveres de liebres ibéricas encontradas en Portugal con lesiones compatibles con la mixomatosis clásica que afecta al conejo europeo aparecieron con una buena condición corporal, al contrario de lo que es común en conejos, lo que sugiere un curso agudo de la enfermedad (Carvalho et al., 2020). Los típicos mixomas cutáneos descritos en conejos no se observaron en estos dos casos y quizás por ello, García-Bocanegra et al., (2019) sugieren que la forma de presentación de la enfermedad en la liebre ibérica en España podría ser mayoritariamente atípica. Hallazgos que contrastan con los anteriormente notificados en la liebre europea, en la que se habían descrito formas agudas (Barlow et al., 2014) o subclínicas (Collins, citado en Barlow et al., 2014).

Por el contrario, Águeda-Pinto et al., (2019) observaron lesiones compatibles con una presentación típica de la enfermedad, al encontrar los típicos mixomas cutáneos descritos en conejos en la base de la oreja de una liebre ibérica afectada. En este caso, la condición corporal de este animal era pésima, lo que sugiere un curso más virulento de la enfermedad que puede haber permitido la formación de mixomas cutáneos.

5. 5. 1 Lesiones macroscópicas

Las lesiones del cadáver de liebre ibérica adulta recogida durante el brote de 2018, incluían blefaroconjuntivitis bilateral y edema anogenital (Figura 9). En la base de la oreja izquierda identificaron dos lesiones compatibles con los mixomas cutáneos (Águeda-Pinto et al., 2019).

Además, observaron epistaxis y una fuerte congestión traqueal, siendo la pulmonar más leve y observándose adicionalmente edema y algunas hemorragias petequiales. Estas lesiones vasculares también se registraron en el hígado y en los riñones (Águeda-Pinto et al., 2019).



Figura 9. Liebre ibérica con blefaroconjuntivitis y edema en la región anogenital (Fuente: Tul, 2019. Laboratorio de Histología y Anatomía Patológica del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza).

Las lesiones más graves encontradas en los cadáveres de los dos primeros casos notificados de liebre ibérica en Portugal, incluían edema palpebral y secreción mucopurulenta de la conjuntiva ocular (Figura 10), siendo comunes en ambas formas de la enfermedad en los conejos (Carvalho et al., 2020).

Además, se observaron lesiones nodulares en la mucosa anogenital, en la región oronasal y en los párpados. También se registró congestión pulmonar (Carvalho et al., 2020).



Figura 10. Edema palpebral y secreción mucopurulenta de la conjuntiva (Fuente: (A) Carvalho et al., 2020, (B) Jara y Sedal, 2020).

Por otro lado, las principales lesiones descritas por García-Bocanegra et al., (2019) en liebres ibéricas, incluían blefarconjuntivitis, epistaxis, edema oronasal y anogenital, así como hemorragias rectales en algunos casos. Los órganos internos mostraban una grave congestión generalizada, que también se observaba en el tejido subcutáneo, pero no se encontraron mixomas cutáneos, lo que sugiere una presentación atípica de la enfermedad que se refuerza por la presencia concomitante de una severa congestión pulmonar, un intenso edema alveolar y pequeñas hemorragias pulmonares (Figura 11). Sin embargo, no lograron establecer una clara relación entre las lesiones pulmonares descritas y la presencia de material vírico en los pulmones.

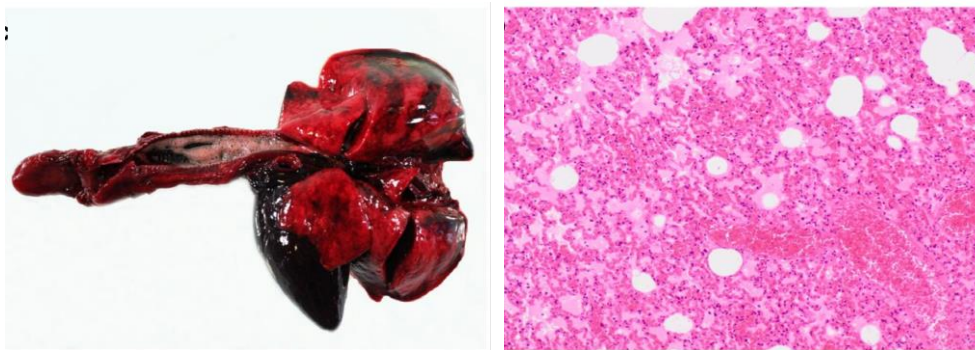


Figura 11. Severa congestión pericárdica y pulmonar, así como hemorragias y edema pulmonar (izquierda). Edema alveolar junto con leves hemorragias (derecha) (Fuente: García-Bocanegra et al., 2019).

5. 5. 2 Lesiones microscópicas

Los resultados histopatológicos de la piel de los párpados observados en el ejemplar de liebre ibérica adulta recogida durante el brote de 2018, mostraron hiperplasia, necrosis e hiperqueratosis epidérmica y degeneración celular, además, estas células contenían grandes corpúsculos de inclusión citoplasmáticos de carácter eosinófilo (Figura 12) (Águeda-Pinto et al., 2019).

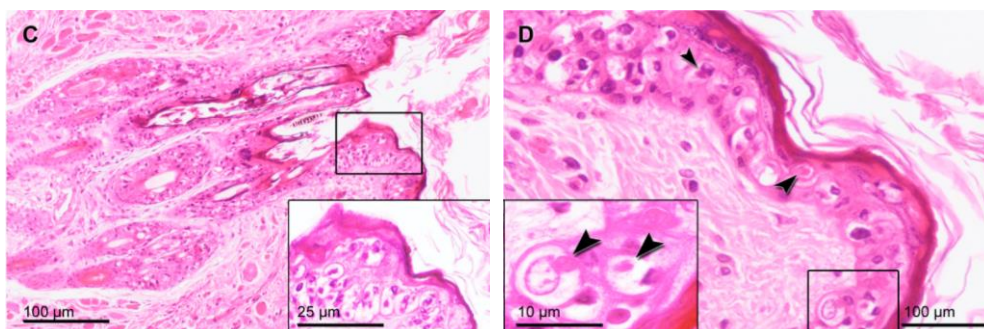


Figura 12. Hiperplasia, necrosis, hiperqueratosis epidérmica y degeneración celular. Nótese que las células contienen grandes corpúsculos de inclusión citoplasmáticos de carácter eosinófilo (flechas) (Fuente: Águeda-Pinto et al., 2019).

La blefaroconjuntivitis se asoció a una respuesta celular inflamatoria en la dermis subyacente, con infiltración de células reticuloendoteliales aumentadas de tamaño y en forma de estrella, con un núcleo grande y citoplasma abundante, acompañado de edema difuso y deposición de fibrina (Águeda-Pinto et al., 2019).

Por otro lado, a pesar de que los mixomas cutáneos estaban ausentes en los dos primeros casos notificados en Portugal, tras realizar el examen histopatológico de los párpados, Carvalho et al., (2020) confirmaron la presencia de una acumulación de material mucínico extracelular (matriz mixoide) con destrucción de la estructura del tejido conjuntivo de la dermis. El resto de los hallazgos fueron similares a los descritos por otros autores (Águeda-Pinto et al., 2019).

Los resultados histopatológicos descritos por García-Bocanegra et al., (2019) coinciden con los hallazgos descritos en otros artículos (Águeda-Pinto et al., 2019; Carvalho et al., 2020). Adicionalmente, añadieron que los hallazgos histopatológicos vasculares coincidían con las lesiones macroscópicas descritas, observándose hemorragias en los órganos afectados, especialmente en los pulmones, que, además, presentaban edema alveolar (Figura 11) lo que podía ser debido a la infiltración de células reticuloendoteliales en la dermis, que destruyen el endotelio de pequeños vasos, derivando en una extravasación eritrocitaria; estas células también se replican en el bazo y en los ganglios linfáticos, causando una completa pérdida de linfocitos (OIE, 2018), hallazgos que se corresponden con los descritos por algunos autores (García-Bocanegra et al., 2019).

5.6 Diagnóstico

El diagnóstico clínico de la mixomatosis se basa en la mayoría de los casos en el reconocimiento de las lesiones típicas de la forma clásica, resultando el diagnóstico clínico de la forma atípica mucho más difícil debido a la escasez de lesiones cutáneas siendo posible la aparición de una muerte súbita sin que se presenten signos clínicos evidentes. En todo caso, también se debe tener en cuenta el contexto epidemiológico. No obstante, realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad resulta de vital importancia, por ello las técnicas laboratoriales juegan un papel relevante en la detección del virus (Bertagnoli y Marchandea,

2015). De todos modos, la microscopía electrónica se sigue utilizando como diagnóstico para la detección de los viriones debido a su gran tamaño y morfología distintiva (Chapter 7 - *Poxviridae*, 2017).

En España, el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (LCV) es el responsable de realizar el diagnóstico oficial de la mixomatosis. En la actualidad, se remiten únicamente muestras procedentes de cotos en los que con anterioridad no se haya detectado la enfermedad. En Aragón, los ejemplares sospechosos se entregan primero al Laboratorio de Histología y Anatomía Patológica del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, y una vez realizada la necropsia se remiten, las muestras oficiales, al LCV (Gobierno de Aragón, 2018).

Aunque la capacidad de detectar el virus varía en función de las diversas técnicas disponibles, en todos los casos, el agente también puede identificarse mediante la detección de su genoma por medio de técnicas moleculares, como la PCR.

Para el diagnóstico de la forma atípica puede ser necesario el aislamiento vírico mediante su cultivo en líneas celulares sensibles, como la RK-13 (riñón de conejo), y también se pueden utilizar técnicas de identificación serológica para detectar anticuerpos frente al virus usando métodos inmunológicos (Bertagnoli y Marchandeu, 2015; OIE, 2018).

En el caso de la forma clásica se pueden utilizar muestras de lesiones cutáneas de párpados, de la mucosa de la zona perineal y de la vulva o de órganos internos (hígado, bazo y pulmón). Para la forma atípica, pueden utilizarse hisopos nasales y conjuntivales (OIE, 2018).

En función del propósito, se recomiendan diferentes técnicas. La histopatología se considera un método idóneo si lo que se pretende es la confirmación de casos clínicos y con esta intención la describen numerosos autores (García-Bocanegra et al., 2019; Carvalho et al., 2020).

Con el mismo objetivo que el de la técnica anterior, el cultivo del virus en células RK-13 para su aislamiento, se considera una técnica recomendable, y así lo describen autores como Águeda-Pinto et al., (2019) y Dalton et al., (2019).

Si, por otro lado, lo que se pretende es demostrar que un animal está infectado, uno de los métodos recomendados es la PCR en tiempo real (*Real time* qPCR), consistiendo el primer paso en la extracción de ADN, tanto de las muestras problema como de las muestras control, el segundo paso es la amplificación por RT-qPCR, y el tercer paso consiste en la detección de los

productos mediante electroforesis en gel de agarosa. Con esta técnica se diagnosticaron los dos primeros casos notificados en Portugal, en los que se detectó ADN vírico en los párpados, la nariz, la región perineal, los pulmones, el bazo y el hígado (Carvalho et al., 2020). Con los tres métodos mencionados anteriormente, la histopatología, el cultivo del virus en células RK-13 y la PCR, lo que se persigue es la identificación del agente, siendo recomendable la combinación de diferentes métodos para una misma muestra clínica (OIE, 2018).

Otro de los métodos recomendados por su simplicidad, rapidez, bajo coste, alta sensibilidad y especificidad, cuyo propósito es demostrar si un animal está infectado y también determinar su estado inmunitario, es el ELISA, pero a diferencia de los anteriores, con este método lo que se persigue es la detección de la respuesta inmunitaria (OIE, 2018). Esta técnica, nos permite diferenciar los tres tipos de inmunoglobulinas implicadas en la respuesta inmunitaria, IgG, IgM e IgA (Kerr, citado en Calvete, 1999; Wetherall et al., citado en Calvete, 1999).

El virus también se ha podido cultivar “*in vivo*” en la membrana corioalantoidea de huevos de gallina embrionados de 11 días de vida (OIE, 2018), donde al cabo de 3-4 días provoca su edematización y la formación de placas de color blanco, opacas y de bordes irregulares (Joubert et al., citado en García-Bocanegra et al., 2019). También se ha podido cultivar en fibroblastos de pollo, córnea de conejo, células de riñón de hámster o riñón de mono verde africano (Calvete, 1999; OIE, 2018).

Cabe señalar que la mixomatosis figura en el *Código Sanitario para los Animales Terrestres* de la OIE y, como tal, los países y territorios miembros deben notificar los brotes de la enfermedad de conformidad con las disposiciones incluidas en este Código.

5. 7 Medidas preventivas

La posibilidad de luchar contra la mixomatosis de forma directa no existe debido a la ausencia de un tratamiento específico. Por ello, sólo puede controlarse de forma preventiva y las actuaciones que más comúnmente se han llevado a cabo en las poblaciones de conejos silvestres han sido la práctica de la vacunación en campo y la utilización de productos insecticidas que redujeran el número de artrópodos vectores de la enfermedad (Calvete, 1999).

No obstante, los programas de vigilancia basados en el riesgo, la cría en cautividad, la repoblación sanitaria controlada, los programas específicos de vacunación, la reducción de la

presión de la caza y la eliminación de los animales encontrados muertos en el campo, son posibles medidas que ayudarían a limitar la circulación endémica del virus en las poblaciones de liebres ibéricas (García-Bocanegra et al., 2020).

5. 7. 1 Inmunoprofilaxis

El principal efecto de las vacunas es reducir el riesgo de transmisión del virus a animales sanos. Para vacunar contra el virus de la mixomatosis que afecta a las poblaciones de conejos, se han desarrollado dos tipos de vacunas vivas, las vacunas heterólogas, preparadas a partir del virus atenuado del fibroma de Shope (Fenner y Woodroffe, citado en OIE, 2018; Shope, citado en OIE, 2018), consideradas menos inmunógenas, y una vacuna homóloga preparada a partir de cepas atenuadas del virus de la mixomatosis (Angulo y Bárcena, 2007; Argüello, citado en OIE, 2018; Gorski y Mizak, citado en OIE, 2018; Saurat et al., citado en OIE, 2018; Tozzini y Mani, citado en OIE, 2018; Von Der Ahe et al., citado en OIE, 2018). Ambas se administran por vía subcutánea o intradérmica (OIE, 2018).

Por otro lado, se ha desarrollado una cepa recombinante atenuada del virus que expresa la proteína de la cápside del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo y consecuentemente confiere protección frente a las dos enfermedades (Bertagnoli et al., citado en OIE, 2018). Otra cepa de campo atenuada del virus de la mixomatosis de España (cepa 6918) se ha diseñado y probado de manera similar (Angulo y Barcena, 2007).

Sin embargo, existe constancia de que la resistencia frente a un tipo determinado de cepa es parcialmente específica (Ross y Sanders, citado en Calvete, 1999) ya que la resistencia desarrollada contra una cepa moderada no protege en la misma medida frente a otra cepa más virulenta (Calvete, 1999).

Shope (1932), determinó que el virus fibroma de la liebre, originalmente autóctono de Europa, era la enfermedad más estrechamente relacionada con el virus de la mixomatosis. Este hallazgo tuvo lugar tras descubrir que la inoculación con el virus fibroma actuaba como una forma de vacunación contra los efectos letales de la mixomatosis (Calvete, 1999; Chapter 7 - *Poxviridae*, 2017) considerándose eficaz una vacuna que lo contenga si como mínimo un 75 % de los conejos vacunados no presenta signos de la enfermedad (OIE, 2018). Por otro lado, una vacuna que contenga el virus de la mixomatosis se considera eficaz si como mínimo un 90 % de los conejos vacunados no presenta signos de la enfermedad (OIE, 2018).

Laboratorios Labiana lidera el estudio del mecanismo de infección de las cepas de mixomatosis facilitadas por el LCV y está trabajando en el desarrollo de una vacuna segura y eficaz para las liebres. Los análisis y resultados preliminares de vacunas homólogas comerciales realizados hasta la fecha en la liebre ibérica, proporcionan un cierto grado de protección, aunque todavía es pronto para conocer el grado y la robustez de dicho efecto inmunizador, especialmente en lo que respecta a la aplicación de nuevos prototipos vacunales en estudio (Sánchez-García et al., 2019).

Si finalmente se lograra obtener una vacuna efectiva para las liebres, sería utilizada como herramienta complementaria para la lucha frente al brote de mixomatosis, y principalmente se destinaría a liebres capturadas para repoblaciones y sueltas. No obstante, todos los organismos implicados en la gestión y en la caza de la liebre ibérica deben ser conscientes de que la vacuna no es la única solución. No es factible vacunar a un porcentaje tan elevado de la población como para proporcionar una adecuada inmunidad poblacional que permita lograr un control efectivo de la enfermedad (Sánchez-García et al., 2019).

6. La mixomatosis en el campo

6.1 Introducción

Se llevó a cabo un estudio de campo basado en la reunión de información epidemiológica de la mixomatosis a partir de la elaboración y posterior difusión de una encuesta a través de las redes sociales dirigida a personal relacionado con el sector cinegético y cuyo objetivo era determinar con una mayor exactitud el grado de afectación de la enfermedad en diferentes cotos.

Se recopilaron datos sobre la ubicación y el tamaño de los cotos, la fecha en la que se comenzaron a observar animales clínicamente afectados, el número estimado de los mismos, la edad, el sexo, la densidad durante la última temporada, los signos clínicos observados, así como la densidad de artrópodos hematófagos en los diferentes cotos.

6.2 Material y métodos

El diseño de la encuesta (Figura 13) se elaboró a través de la plataforma online “Formularios de Google” y posteriormente los datos se recopilaron y analizaron a través de Microsoft® Excel (versión 16.40).



Figura 13. Portada de la encuesta (Fuente: Tul, 2020).

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Estudio descriptivo

Los resultados descritos en este análisis se obtuvieron de un total de 13 respuestas. Todos los encuestados eran de sexo masculino y con edades comprendidas entre los 20 y los 59 años, siendo la edad media los 35 años y la desviación estándar 13,86. En su mayoría, los cotos se ubican en el municipio de Fuentes de Ebro, en la provincia de Zaragoza y el resto en diferentes municipios cercanos como Quinto y Gelsa, Sariñena, en la provincia de Huesca y Vall d'Alba y La Serra d'en Galceran, ambos de la provincia de Castellón. Su tamaño está comprendido entre 5.000 y 15.000 hectáreas, siendo la media de 10.850 hectáreas y la desviación estándar 2.638,35.

Un 69,2 % de los encuestados indicaron que el número aproximado de cazadores del coto es superior a 150, indicando un 23,1 % que en el coto al que pertenecen hay entre 100 y 150 cazadores y un 7,7 % de los encuestados cazan en un coto con aproximadamente 100 cazadores.

Respecto al estado sanitario general de los cotos, valorado sobre una escala Likert de 1 a 5, siendo el 1 la puntuación mínima y el 5 la puntuación máxima, se obtuvo una puntuación de 5 en el 46,2 % de respuestas, el mismo % que para la puntuación de 4, obteniendo la puntuación de 3 un 7,7 % de respuestas. Por otro lado, el estado sanitario general de las liebres en los cotos, valorado con la misma escala, obtuvo un 61,5 % de respuestas con una puntuación de 5, un 23,1 % de respuestas con una puntuación de 4 y un 15,4 % de respuestas una puntuación de 3.

Un 76,9 % de los encuestados indicaron que los cotos carecían de cercados, un 38,5 % indicaron que los cotos contaban con comederos artificiales, siendo en su mayoría entre 10-20 comederos y un 69,2 % de los encuestados contestaron que en sus cotos contaban con bebederos artificiales. Además, un 7,7 % indicaron que los cotos contaban con ríos, balsas, pantanos o barrancos como puntos de agua adicional para los animales.

La densidad de liebres en los cotos durante la última temporada parece haber incrementado según un 46,2 % de los encuestados, aunque un 38,5 % indicaron que era similar a dicha temporada y un 15,4 % que había disminuido. Según los estudios realizados por Sánchez-García et al., (2019) tras los brotes de mixomatosis se ha producido una reducción significativa de las poblaciones de liebres en los cotos que han sufrido la enfermedad. En Andalucía, han perdido un 57 % de sus liebres y en Castilla La Mancha, durante los meses de invierno y primavera de 2019, se censaron medias de 7-8 liebres por cada 100 hectáreas, mientras que a principios de los años 2000 se superaban las 10-15 liebres. En todo caso, resulta complicado determinar con exactitud el impacto real de la mixomatosis en las poblaciones de liebres ibéricas en España debido a la falta de datos de densidades justo antes de los brotes.

Hace aproximadamente 15 años, el coto de Fuentes de Ebro fue repoblado con liebres cuya procedencia era una granja a la que se le exigió un certificado sanitario, aunque no se especifica el tipo. Además, en este coto también se ha restringido o prohibido la caza de la liebre en los últimos dos años (Tul, 2020).

Un 92,3 % de los encuestados indican que las liebres comparten su hábitat en los cotos con los conejos. Además, la densidad de estos en los cotos se ha incrementado según un 84,6 % de los encuestados.

En relación con la densidad de artrópodos hematófagos, como mosquitos, pulgas y garrapatas en los cotos, la concentración de mosquitos es especialmente alta, siendo en su mayoría media, al igual que la densidad de garrapatas, siendo la de pulgas la más baja (Figura 14).

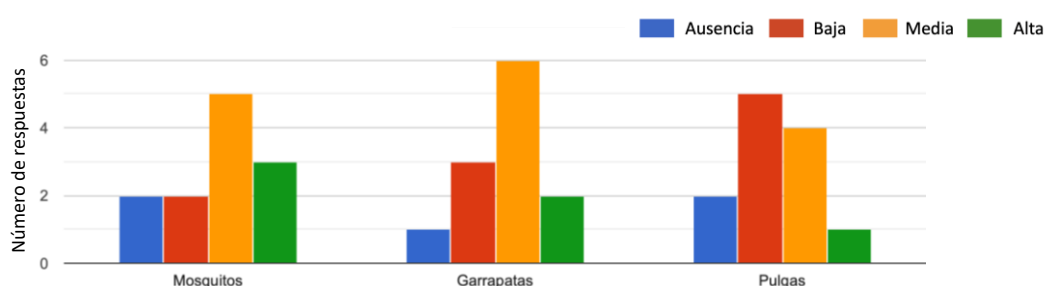


Figura 14. Densidad de artrópodos hematófagos en los cotos (Fuente: Tul, 2020).

Aunque indican que la presencia de liebres en los cotos es reducida, llama la atención que los signos clínicos observados en las liebres por los cazadores coinciden en su mayoría con los observados en los conejos, los cuales son párpados inflamados (18,2 %), ojos inflamados y con secreción purulenta (54,4 %), costras en orejas, ojos y boca (9,1 %) y ausencia de movimiento en patas traseras o generalizado (18,2 %) (Figura 15).

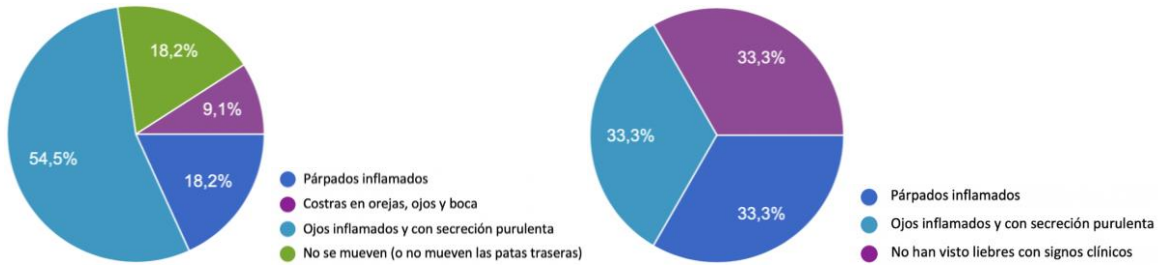
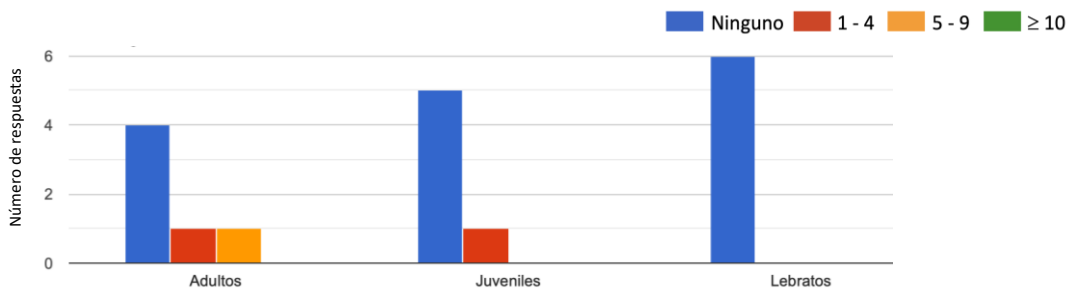


Figura 15. Signos clínicos y/o lesiones observadas en los conejos afectados (izquierda) y en las liebres afectadas (derecha) (Fuente: Tul, 2020).

Así mismo, parte de la información epidemiológica recogida a través de una encuesta realizada a guardas forestales entre julio de 2018 y abril de 2019, indicó que los signos clínicos más habituales eran conjuntivitis (63,4 %), mixomas cutáneos (33,5 %), blefaritis (32,9 %) y edema anogenital (20,2 %). También destacaban la caquexia, la epistaxis, la disnea, la diarrea, la postración, la parálisis, los opistótonos, las convulsiones y la muerte súbita (Sánchez-García et al., 2019; García-Bocanegra et al., 2020).

Respecto a las consecuencias epidemiológicas del efecto de la edad en las liebres encontradas con lesiones compatibles con la enfermedad en el campo, según los encuestados, lo más frecuente es encontrar individuos adultos y en menor medida, juveniles. Por otro lado, los conejos encontrados con lesiones compatibles son también en su mayoría adultos y en menor medida, juveniles y gazapos (Figura 16).



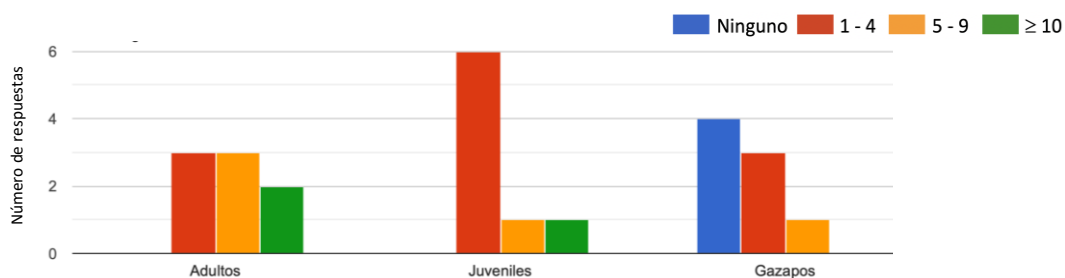


Figura 16. Número de animales afectados según la edad, liebres (arriba) y conejos (abajo) (Fuente: Tul, 2020).

En concordancia con lo descrito por otros autores (Sobey et al., citado en Calvete, 1999), de estos datos se podría deducir que la edad en que se produce la infección tiene una marcada influencia en el curso de la enfermedad, encontrándose en el campo una menor proporción de individuos juveniles con síntomas de mixomatosis debido a una mayor susceptibilidad a la infección, aumentando el tiempo medio y la tasa de supervivencia en individuos adultos hasta estabilizarse.

Relativo al sexo, según los encuestados, tanto las liebres de sexo masculino como de sexo femenino se ven afectadas por un igual, sin embargo, los conejos de sexo masculino parecen tener menos posibilidades de supervivencia (Figura 17).

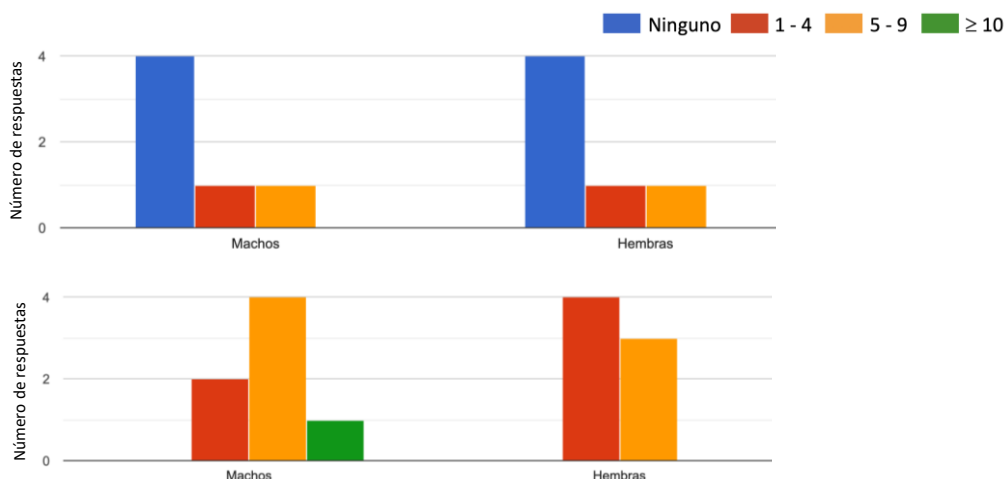


Figura 17. Número de animales afectados según el sexo, liebres (arriba) y conejos (abajo) (Fuente: Tul, 2020).

El 100 % de los encuestados indicaron que no existía ningún plan de vigilancia vigente sobre la mixomatosis en las liebres. Además, el 92,3% indicaron que no habían asistido a ninguna reunión informativa sobre la mixomatosis en esta especie y tampoco habían realizado ningún curso en el que se trataran temas sobre la enfermedad en los dos últimos años. El 91,7 %

también indicaron que ningún veterinario contratado por el coto ni el servicio comarcal (OCA) les había informado de este problema.

Por último, el 60,0 % de los cazadores indicaron que se habían enterado de la aparición de esta enfermedad por la observación de animales en el coto, un 20,0 % se había enterado por las redes sociales, un 10,0 % por divulgación popular y otro 10,0% por revistas.

6. 3. 2 Impacto de la enfermedad en las poblaciones de liebre ibérica

Resulta complicado determinar con exactitud el impacto real que ha tenido la mixomatosis en las poblaciones de liebre ibérica en España estos dos últimos años debido a la ausencia de datos de densidades justo antes de la aparición de los brotes. Aún siendo desconocido, la elevada tasa de mortalidad percibida en el campo, de hasta un 70 %, el gran número de casos confirmados en el LCV, así como la rápida expansión y la amplia distribución de los brotes, indican que esta nueva cepa ha puesto en grave riesgo a la especie (Sánchez-García et al., 2019; Carvalho et al., 2020; García-Bocanegra et al., 2020).

La evidente coevolución hospedador-patógeno, el desarrollo de una fuerte inmunidad de grupo y la dinámica y estructura espacial de las poblaciones, limitarían el impacto de la mixomatosis. Así como el tamaño de la población y la duración de la temporada de cría. Por el contrario, si la población se fragmenta se perturba su circulación y, por lo tanto, el mantenimiento de la inmunidad, lo que favorecería la aparición de formas más graves de la enfermedad (Bertagnoli y Marchandeu, 2015).

Queda claro que las poblaciones de liebre ibérica están amenazadas por diferentes factores naturales y antropogénicos, entre ellos, los depredadores y la presión de la caza, la fragmentación y la pérdida de su hábitat, el uso de herbicidas y plaguicidas, las condiciones meteorológicas, las muertes en carretera y las enfermedades, entre las que destacan la tularemia y la ocasionada por esta nueva cepa (García-Bocanegra et al., 2020).

6. 3. 3 Acciones prácticas para el control de la enfermedad

Hay que tener en cuenta las limitaciones que existen por la idiosincrasia de este tipo de poblaciones, como la extensión de la superficie en la que habitan o el difícil control de los movimientos naturales de los animales, además resulta muy difícil impedir la diseminación de la enfermedad al ser una de sus formas de transmisión la vectorial (Sánchez-García et al., 2019).

Por otro lado, resulta de vital importancia concienciar y fomentar la colaboración de los cotos para que comuniquen cualquier sospecha de la enfermedad en liebres a los Servicios Veterinarios Oficiales, de Medio Natural y de Caza, con el propósito de que propongan recomendaciones e informen a guardas forestales, ganaderos y cazadores. La utilización de aplicaciones móviles que permitan censar las especies cinegéticas de un coto resultaría útil para realizar una correcta monitorización y mejorar así la gestión y la conservación, además de ofrecer resultados válidos y contrastables con los datos recogidos por parte de las Administraciones. De esta forma, además, la evolución de la fauna cinegética en los cotos sería mucho más visible (Sánchez-García et al., 2019).

Como ya sabemos, el virus de la mixomatosis es altamente resistente en condiciones naturales, por ello, la recogida de animales enfermos y muertos es una acción fundamental para minimizar el riesgo de diseminación. Cuando se detectan liebres muertas en el campo, se debe avisar a las autoridades competentes y se recomienda enterrar los cadáveres impregnados con cal viva y a una profundidad suficiente para evitar que sean desenterrados por predadores. Otra opción es introducirlos en bolsas con cierre hermético y depositarlos posteriormente en contenedores específicos de subproductos animales no destinados al consumo humano (SANDACH) que deberán ser llevados a lugares adecuados de recogida de cadáveres dónde serán procesados, generalmente por cremación. Además, también es muy importante evitar mover los cadáveres de una zona a otra (Sánchez-García et al., 2019).

Si, por el contrario, lo que se detectan son liebres enfermas, tras realizar la correspondiente comunicación oficial, si se encuentran agonizantes e incapaces de correr ni defenderse, se recomienda sacrificarlas. No obstante, si lo que se observa es que las liebres permanecen alerta y con capacidad para correr, aunque no lo hagan de una forma normal, lo mejor es no sacrificarlas ya que podrían generar inmunidad y recuperarse (Sánchez-García et al., 2019).

Otra de las medidas que se puede adoptar para limitar la diseminación y el impacto de la enfermedad, es restringir las translocaciones y las sueltas, y si se hacen, asegurarse de que las liebres procedan de áreas no afectadas y se realicen controles sanitarios previos al movimiento (Sánchez-García et al., 2019).

Por último, ante el descenso de la densidad de animales en las zonas afectadas, se ha planteado el uso de zonas de cría de liebres en semi-libertad, conocidas comúnmente como

“cercones” (Figura 18), que podrían resultar útiles como herramienta de prevención contra la enfermedad y para la posterior repoblación abasteciendo las zonas requeridas con individuos autóctonos para que así los progenitores sean los del propio coto, evitándose translocaciones y la diseminación de patógenos. Actualmente, su aplicación sólo se permite en Andalucía debido a que está introducido en el Plan Técnico de Caza de cada coto. Los cercones se deben autorizar con una finalidad de mejora sanitaria y se debe proponer la elaboración de un manual de buenas prácticas en el que desarrollen diferentes aspectos de la cría, que debería tener una duración limitada; de las condiciones de suelta, del manejo de los animales, que debería ser el menor posible y bajo supervisión veterinaria; la tenencia de cobijo, agua y alimento y la aplicación de tratamientos anti-parasitarios, como piretrinas o diclorvos, que pueden resultar de gran utilidad para reducir el impacto de los vectores en la transmisión de la enfermedad, así como la aplicación de vacunas (Sánchez-García et al., 2019).



Figura 18. Zona de cría de liebres en semi-libertad (Fuente: Jara y Sedal, 2020).

7. Conclusiones

La realización del presente trabajo nos ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1.- Los brotes ocurridos en España exclusivamente en la liebre ibérica, indican una aparente resistencia en las otras dos especies de liebre presentes. La vigilancia epidemiológica sería una herramienta fundamental para la detección precoz de posibles casos en las poblaciones de liebre europea. De la misma forma, la liebre de pinnal debería tenerse en cuenta, aunque su riesgo es moderado debido al diferente contexto epidemiológico en el que habita.

2.- Los estudios realizados hasta la fecha, han permitido determinar que la causa del salto de especie se debe probablemente a la inserción de 2,8 kb encontrada en la región del

genoma correspondiente al gen M009L de la cepa ha-MYXV. Que la inserción, salvo con excepción de los casos descritos, no se haya encontrado en los conejos, podría estar indicando que esta cepa muestra una menor eficacia biológica para infectarlos, presentando actualmente en la liebre ibérica un elevado poder patógeno.

3.- Mediante los datos obtenidos en la encuesta, hemos conocido que el estado sanitario general de las liebres en los cotos era, en su mayoría, favorable. Por otro lado, los individuos juveniles presentaban una mayor susceptibilidad a la infección que los individuos adultos. No obstante, habría sido interesante que tras la última temporada se hubiera realizado esta encuesta en los mismos cotos con el objetivo de haber podido valorar la posterior situación de la enfermedad y de la población de liebre ibérica.

4.- Las liebres enfermas podrían generar resistencias si sobreviviesen, representando una subpoblación con mayor resiliencia a la enfermedad, aunque también hay liebres que se habían recuperado y posteriormente han vuelto a reinfectarse. De cualquier forma, las actuaciones orientadas a la recuperación de las poblaciones de esta especie deben ir dirigidas a las repoblaciones ya que constituyen la herramienta más eficaz.

Conclusions

This work has enabled us to draw the following conclusions:

1.- The outbreaks in Spain, which occurred exclusively in the Iberian hare, indicate an apparent resistance in the other two hare species present. Epidemiological surveillance would be a key tool for the early detection of possible cases in European hare populations. Similarly, the piornal hare should be considered, although its risk is moderate due to the different epidemiological context in which it lives.

2.- The studies carried out to date have determined that the cause of the species jump is probably due to the insertion of 2.8 kb found in the region of the genome corresponding to the M009L gene of the ha-MYXV strain. The fact that the insertion, with the exception of the cases described, has not been found in rabbits could indicate that this strain shows less biological efficiency in infecting them, and currently has a high pathogenic power in the Iberian hare.

3.- From the data obtained in the survey, we learned that the general health status of the hares in the reserves was mostly favourable. On the other hand, juvenile individuals were more susceptible to infection than adult individuals. Nevertheless, it would have been interesting if after the last season this survey had been carried out in the same preserves in order to assess the subsequent situation of the disease and the Iberian hare population.

4.- Sick hares could generate resistance if they survived, representing a subpopulation with greater resilience to the disease, although there are also hares that had recovered and have subsequently become reinfected. In any case, actions aimed at the recovery of populations of this species must be directed at repopulations as they are the most effective tool.

8. Valoración personal y agradecimientos

La realización de este trabajo ha supuesto una forma de trabajar novedosa y constante que ha tenido una trayectoria ascendente, no solo en cantidad, sino también en aprendizaje, profundidad y análisis de estudios y avances existentes para comprender así mejor el origen de la enfermedad y su impacto. Me ha aportado conocimientos que desconocía, sobre todo en todo lo relacionado con interés cinegético, y aunque no ha sido difícil trabajar sobre el tema, he tenido que profundizar en algunos conceptos. También ha supuesto una oportunidad para indagar en aspectos relacionados con otras materias, como la genética.

En definitiva, toda la información reunida he tenido que sintetizarla evitando sobrepasar el límite, lo que me ha supuesto un esfuerzo y además he tenido que eliminar partes que consideraba relevantes. A pesar de ello, estoy satisfecha con el resultado final y considero imprescindible la continua recogida de datos y su estudio para encontrar soluciones prácticas frente a la evolución de la enfermedad.

Por último, quiero expresar mi agradecimiento a mis tutores, por su ayuda y esfuerzo, sus consejos y correcciones, así como las sucesivas lecturas del presente trabajo; y que me hayan facilitado artículos a los que no tenía acceso ha sido vital para la elaboración del mismo. También quiero agradecer a José Alberto Viñuelas de la Fuente, Director del Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo, Guadalajara, por la cesión de las ponencias impartidas en el taller de trabajo sobre el presente y futuro de la liebre ibérica.

9. Bibliografía

Angulo, E. y Bárcena, J. (2007). "Towards a unique and transmissible vaccine against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease for rabbit populations". *Wildlife Research*, 34 (7), pp. 567-577. DOI: [10.1071/WR06160](https://doi.org/10.1071/WR06160)

Águeda-Pinto, A., Lemos de Matos, A., Abrantes, M., Krabberger, S., Rialde, M. A., Gortázar, C., McFadden, G., Varsani, A. y Esteves, P. J. (2019). "Genetic Characterization of a Recombinant Myxoma Virus in the Iberian Hare (*Lepus granatensis*). *Viruses*, 11 (6), pp. 530. DOI: [10.3390/v11060530](https://doi.org/10.3390/v11060530)

Agüero, M., Buitrago, D., Romero, L. J., Martínez, E., Ruano, M. J., Chico, I. y Sánchez, A. (2019). "Mixomatosis en liebre ibérica, julio 2018 - marzo 2019". *Taller de trabajo sobre la liebre ibérica: presente y futuro*. Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo, Guadalajara. Ponencia cedida por el Director del Centro, Viñuelas de la Fuente, J. A.

Badiola, I. (2019). "Proyecto MIXO-LEPUS". *Taller de trabajo sobre la liebre ibérica: presente y futuro*. Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo, Guadalajara. Ponencia cedida por el Director del Centro, Viñuelas de la Fuente, J. A.

Barlow, A., Lawrence, K., Everest, D., Dastjerdi, A., Finnegan, C. y Steinbach, F. (2014). "Confirmation of myxomatosis in a European brown hare in Great Britain". *Veterinary Record*, 175 (3), pp. 75-76. DOI: [10.1136/vr.g4621](https://doi.org/10.1136/vr.g4621)

Bertagnoli, S. y Marchandeu, S. (2015). "La myxomatose". *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 34 (2), pp. 539-556. DOI: [10.20506/rst.34.2.2378](https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2378)

Calvete, C. (1999). *Epidemiología de enfermedad hemorrágica (VHD) y mixomatosis en el conejo silvestre (Oryctolagus cuniculus L. 1758) en el valle medio del Ebro: modelización de VHD y herramientas de gestión*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10532/1142>

Calvete, C., Estrada, R., Villafuerte, R., Osácar, J. J. y Lucientes, J. (2002). "Epidemiology of viral haemorrhagic disease and myxomatosis in a free-living population of wild rabbits". *Veterinary Record*, 150 (25), pp. 776-782. DOI: [10.1136/vr.150.25.776](https://doi.org/10.1136/vr.150.25.776)

Chapter 7 - *Poxviridae*. (2017). En: MacLachlan, N. J. y Dubovi, E. J. (Coord.). *Fenner's Veterinary Virology*. ScienceDirect: Elsevier; 5th Edition, pp. 157-174. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128009468000076?via%3Dihub>

[Consultado 17-08-2020]

Dalton, K. P., Martín, J. M., Nicieza, I., Podadera, A., De Llano, D., Casais, R., Gimenez, S., Badiola, I., Agüero, M., Duran, M., Buitrago, D., Romero, L. J., García, E. y Parra, F. (2019). "Myxoma virus jumps species to the Iberian hare". *Transboundary and Emerging Diseases*, 66 (6), pp. 2218–2226. DOI: [10.1111/tbed.13296](https://doi.org/10.1111/tbed.13296)

Fenner, F. y Marshall, I. D. (1957). "A comparison of the virulence of European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America." *Journal of Hygiene*, 55, pp. 149-191. DOI: [10.1017/s0022172400037098](https://doi.org/10.1017/s0022172400037098)

García-Bocanegra, I., Camacho-Sillero, L., Rialde, M. A., Dalto, K. P., Caballero-Gómez, J., Agüero, M., Zorrilla, I. y Gómez-Guillamón, F. (2019). "First outbreak of myxomatosis in Iberian hares (*Lepus granatensis*). *Transboundary and Emerging Diseases*, 66 (8), pp. 2204–2208. DOI: [10.1111/tbed.13289](https://doi.org/10.1111/tbed.13289)

García-Bocanegra, I., Camacho-Sillero, L., Caballero-Gómez, J., Agüero, M., Gómez-Guillamón, F., Ruiz-Casas, J. M., Díaz-Cao, J. M., García, E., Ruano, M. J. y De La Haza, R. (2020). "Monitoring of emerging myxoma virus epidemics in Iberian hares (*Lepus granatensis*) in Spain, 2018-2020". *Transboundary and Emerging Diseases*. DOI: [10.1111/tbed.13781](https://doi.org/10.1111/tbed.13781)

Gobierno de Aragón (2018). Protocolo de Actuación ante la Mixomatosis en Liebre. En: Departamento de Desarrollo Rural y Sostenibilidad, Gobierno de Aragón. Disponible en: https://www.aragon.es/documents/20127/674325/RESOLUCION_PROTOCOLO_LIEBRE.pdf/6f20ff73-5a89-c85f-3560-9b5579162374 [Consultado 20-02-2020].

Gobierno de Aragón (2020). Mixomatosis en liebre. En: Servicio de Caza y Pesca, Gobierno de Aragón. Disponible en: <https://www.aragon.es/-/mixomatosis-en-liebre> [Consultado 08-08-2020]

Isla, J. (2019). "Mixomatosis en la liebre ibérica". *Sanidad y biotecnología animal*, 3 de mayo. Disponible en: <https://sabiotech.es/es/blog/34-mixomatosis-en-la-liebre-iberica> [Consultado 21-02-2020]

Jara y Sedal. (2019). *La crisis de la liebre*. Disponible en: <https://www.rtve.es/alacarta/videos/jara-y-sedal/jara-sedal-crisis-liebre/4991278/> [Consultado 21-02-2020]

Jara y Sedal. (2020). *MIXOlepus, el futuro de la liebre*. Disponible en: <https://www.rtve.es/alacarta/videos/jara-y-sedal/jara-sedal-mixolepus-futuro-liebre/5505821/> [Consultado 10-08-2020]

Kerr, P. J., Rogers, M. B., Fitch, A., DePasse, J. V., Cattadori, I. M., Twaddle, A. C., Hudson, P. J., Tschärke, D. C., Read, A. F., Holmes, E. C. y Ghedin, E. (2013). "Genome scale evolution of myxoma virus reveals host-pathogen adaptation and rapid geographic spread". *Journal of Virology*, 87 (23), pp. 12900-12915. DOI: [10.1128/JVI.02060-13](https://doi.org/10.1128/JVI.02060-13)

Kerr, P. J., Liu, J., Cattadori, I., Ghedin, E., Read, A. F. y Holmes, E. C. (2015). "Myxoma Virus and the Leporipoxviruses: An Evolutionary Paradigm". *Viruses* 2015, 7 (3), pp. 1020-1061. DOI: [10.3390/v7031020](https://doi.org/10.3390/v7031020)

Longdon, B., Brockhurst, M. A., Russell, C. A., Welch, J. J. y Jiggins, F. M. (2014). "The evolution and genetics of virus host shifts". *PLOS Pathogens*, 10 (11), pp. e1004395. DOI: [10.1371/journal.ppat.1004395](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004395)

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2020). Situación de brote de mixomatosis en liebre ibérica, 16 de enero de 2020. En Madrid: MAPA. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/notamixomatosis16012020_2_tcm30-482844.pdf [Consultado 06-07-2020]

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2020). Mixomatosis. En Madrid: MAPA. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/mixomatosis/Mixomatosis.aspx> [Consultado 27-08-2020]

Padgett, B. L., Wright, M. J., Jayne, A. y Walker, D. L. (1964). "Electron microscopic structure of myxoma virus and some reactivable derivatives". *Journal of Bacteriology*, 87 (2), pp. 454-460. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC277030/pdf/jbacter00442-0232.pdf> [Consultado 17-08-2020]

Palomo, L. J., Gisbert, J. y Blanco, J. C. (2007). *Atlas y Libro Rojo de los Mamíferos Terrestres de España*. Dirección General para la Biodiversidad-SECEM-SECEMU, Madrid, pp. 588. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/inventario-especies-terrestres/inventario-nacional-de-biodiversidad/ieet_mamif_atlas.aspx [Consultado 28-08-2020]

Sánchez-García, C., Guzmán, J. L., Romero, L., Parra, F., Dalton, K., Agüero, M., Badiola, I., García-Bocanegra, I., Crespo, M. J., Ramos, M., Viñuelas, J. A., Rodríguez, O., Gabaldón, L., Gómez-Guillamón, F., Urbani, N. y Villanueva, L. F. (2019). “Preguntas y respuestas sobre el brote de mixomatosis en liebres. Grupo MIXOlepus.” Edita: Fundación Artemisan. Madrid, España. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/mixolepus_online_tcm30-523001.pdf [Consultado 22-01-2020].

Stanford, M. M., Werden, S. J. y McFadden, G. (2007). “Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host”. *Veterinary Research*, 38 (2), pp. 299-318. DOI: [10.1051/vetres:2006054](https://doi.org/10.1051/vetres:2006054)

Tul, R. (2020). *Estudio y repercusión de la mixomatosis en las poblaciones silvestres de liebre*. Disponible en: <https://forms.gle/ufX1GXjAeygAE6pc9> [Consultado 21-08-2020].

World Organisation for Animal Health (2018). *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*. Standards and Guidelines: OIE. Capítulo 3. 6. 1. Mixomatosis. pp. 1-20. Disponible en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.06.01_Mixomatosis.pdf [Consultado 08-08-2020]

World Organisation for Animal Health (2020). *Mixomatosis*. OIE. Disponible en: <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/mixomatosis>. [Consultado 19-08-2020]