

PATOLOGÍA

- **Las nuevas metodologías moleculares y los cultivos de órganos han abierto una nueva perspectiva en la investigación de la Enteropatía Epizootica del Conejo**

Bäuerl C., Cabrera Rubio R., Gallina O., Valero A., Collado M.C., Pérez Martínez G.

- **Tipado capsular de *Pasteurella multocida* mediante PCR en tiempo real y su aplicación directa en muestras clínicas de conejo**

Arnal J.L., Sanz C., Serrano D., Benito A., Chacón G., Fernández A.

- **Detección y aislamiento de virus de la enfermedad hemorrágica del conejo RHDV2/b en micromamíferos silvestres en el Norte de España**

Mendoza M., Calvete C., Sarto M.P., Jiménez de Bagüés M.P., Luján Ll., Molín J., Calvo A.J., Monroy F., Calvo J.H.

- **Respuesta inmunitaria del conejo frente a *Staphylococcus aureus***

Muñoz-Silvestre A., Pérez-Fuentes S., Moreno-Grúa E., Corpa J.M., Selva L., Viana D.

- **Estado actual de las cepas de *Staphylococcus aureus* en granjas cunícolas**

Pérez-Fuentes S., Muñoz-Silvestre A., Moreno-Grúa E., Viana D., Selva L., Corpa J.M.

- **Evolución de la virulencia de *Staphylococcus aureus* en los últimos 15 años**

Moreno-Grúa E., Muñoz-Silvestre A., Pérez-Fuentes S., Corpa J.M., Viana D., Selva L.

- **Detección mediante PCR-dúplex a tiempo real y aislamiento de virus RHDV2/b durante un brote de enteropatía mucoide**

Mendoza M., Calvete C., Comenge J., Sarto M.P., Jiménez de Bagüés M.P., Calvo J.H.

- **Primeiro caso de deteção de *Talaromyces marneffe* numa lebre (*Lepus granatensis*)**

Alves D., Matos A.C., Saraiva S., Soares A.S., Figueira L., Pinheiro V., Matos M., Coelho A.C.

Las nuevas metodologías moleculares y los cultivos de órganos han abierto una nueva perspectiva en la investigación de la Enteropatía Epizoótica del Conejo

New molecular and organ culture methods opened new research perspectives for the Epizootic Rabbit Enteropathy

Bäuerl C.¹, Cabrera Rubio R.², Gallina O.¹, Valero A.¹, Collado M.C.¹, Pérez Martínez G.^{1*}

¹ Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Valencia, España

² Dirección actual: TEAGASC Food Research Centre, Moorepark, Fermoy, Co., Cork, Irlanda

* Dirección de contacto: gaspar.perez@iata.csic.es

Resumen

Hasta el momento diversos métodos se han utilizado para estudiar la etiología de la Enteropatía Epizoótica del Conejo (EEC). Con el fin de desarrollar un método *in vitro* que permita buscar las bacterias causantes, se han utilizado explantes de intestino y cultivos celulares para determinar la expresión de marcadores inflamatorios provocada por filtrados cecales de EEC. El método *in vitro* desarrollado para la selección de posibles causantes deberá contrastarse con ensayos de infección controlada. También aplicamos nuevas técnicas de secuenciación para comparar las poblaciones bacterianas (microbiota) del ciego de conejos de granjas que usan o no antibióticos (con diferente incidencia de EEC) y de animales salvajes. Los datos obtenidos sugieren que los animales criados con antibióticos pueden carecer de bacterias protectoras, cuyo aislamiento será nuestro próximo objetivo.

Palabras clave: Nuevas metodologías, Enteropatía Epizoótica del Conejo (EEC), microbiota cecal, antibióticos, bacterias protectoras, posibles patógenos.

Abstract

Different methods have been used in numerous attempts to characterize aetiology of Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE). In order to develop a new *in vitro* method that would allow the screening of causative agents, we used intestinal explant and cell cultures to determine the expression of inflammatory markers induced by ERE cecal filtrates. The *in vitro* method developed for the selection of possible pathogens must now be cross checked with controlled infection assays. Also, new sequencing techniques have been used to compare cecal bacterial populations (microbiota) from rabbits in farms that use antibiotics or that do not use them with different ERE incidence-, and also from wild rabbits. Data obtained suggest that animals bred with antibiotics may lack protective bacteria, the isolation of these bacteria are our next research objective.

Keywords: New methodologies, Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE), cecal microbiota, antibiotics, protective bacteria, putative pathogens.

Introducción

La Enteropatía Epizoótica del Conejo (EEC) ocurre en las primeras semanas de vida, con frecuencia tras el destete (Lebas, 2001). Otros animales también padecen enteropatías en el destete o la lactancia lo que denota la fragilidad de los animales en este periodo (Sekirov and Finlay, 2009). Los primeros casos de EEC documentados en USA datan de 1929 y en Gran Bretaña de 1943 (ver revisión de Kruiningen and Williams, 1972). Sin embargo, sólo al final de los años 90 se describe como un problema de dimensiones alarmantes en Europa (ver revisión de Licois *et al.*, 2005). Pronto se observó experimentalmente que la transmisión de esta enfermedad se controla con antibióticos (Kruiningen and Williams, 1972), por lo que su etiología se asoció a un agente bacteriano. Pero transcurrido todo este tiempo, no se ha podido todavía encontrar la bacteria causante ni reproducir la enferme-

dad en el 100% de los casos. Con el fin de determinar el agente causante de la EEC, en diversos estudios previos se trató de reproducir la enfermedad inoculando conejos sanos con heces (Kruiningen and Williams, 1972) y filtrados de contenido del ciego (TEC1-4) (Huybens et al., 2009) de conejos enfermos. La infección vírica se descartó en los primeros ensayos, y se determinó que podrían haber dos factores implicados en la patogénesis de EEC: una toxina y una bacteria (Szalo et al., 2007). Aunque se mostraron con eficacia variable, dichos filtrados de contenido ciego han logrado reproducir la enfermedad, resultando la única herramienta utilizable como prueba de patogénesis.

Diversos trabajos recientes describen la microbiota intestinal de conejos que ha sido recientemente caracterizada por técnicas moleculares y de secuenciación masiva del rDNA 16S (Bäuerl et al., 2014; Combes et al., 2011; Huybens et al., 2013; Zeng et al., 2015). En un trabajo previo (Bäuerl et al., 2014) nuestro grupo estudió la microbiota de muestras de ciego en conejos sanos, tratados o no con antibióticos y enfermos de EEC. Los resultados indicaron que el ciego de conejos sanos está dominado por bacterias de la familia Clostridia (78%), Bacteroidia (15,7%), Verrucomicrobiae (2,4%) y Mollicutes (2,4%). Parece muy interesante que en la granja estudiada, en la que se administraba pienso medicado, el perfil de poblaciones bacterianas de los animales sanos, no se diferenciaba de los sanos aunque se les hubiera retirado los antibióticos. Los animales con EEC mostraron una marcada disbiosis con reducción de la diversidad de especies y disminuyeron los géneros dominantes en animales sanos, *Alistipes* y *Ruminococcus*, acompañados de un incremento significativo de los géneros *Bacterioides*, *Akkermansia* y *Rikenella*, así como *Clostridium* y gamma-Proteobacteria y otras especies patógenas y oportunistas. Estos últimos grupos bacterianos se han asociado a la EEC desde hace más de 40 años (Sinkovics, 1976). Aunque estudios previos describían ausencia de procesos inflamatorios en EEC, también estudiamos la expresión génica en la mucosa del ciego y del apéndice de estas muestras, observando un alto nivel de expresión de citoquinas pro-inflamatorias en las muestras de EEC. Sin embargo, aunque las gamma-Proteobacteria en general se asocian a perfiles inflamatorios como el observado, no se pudo hallar correlación estadística con ninguna especie bacteriana.

En este trabajo, hemos utilizado filtrados de contenido cecal de conejos enfermos para poner a punto métodos basados en cultivo de tejidos y de células epiteliales intestinales para la posible selección de bacterias. Además se han comparado las poblaciones cecales de bacterias de conejos sanos, susceptibles de adquirir la enfermedad, con conejos silvestres y se han identificado grupos bacterianos específicos de estos últimos.

Material y métodos

Muestras, animales y tratamiento con antibióticos

Las muestras de ciego de conejos alimentados con pienso con y sin antibióticos (lincomicina 29 ppm, espectinomicina 29 ppm, tiamutina 40 ppm, neomicina 121 ppm) (Nanta, Nutreco España) y con EEC provienen de un trabajo previo (Bäuerl et al., 2014), realizado en el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), y se han mantenido congeladas a -80°C. En total, se analizaron de esta primera granja UPV: 10 animales tratados con antibióticos, 10 sin antibióticos sanos (Control) y 10 sin antibióticos con EEC. Nuevas muestras de conejos de granja sin antibióticos y con muy baja incidencia de EEC han sido suministradas por y provienen de la granja experimental de Toledo (Nanta, Nutreco, España). La lactación duró 35 días y se separaron en jaulas de 10 animales. De esta segunda granja se estudió el contenido cecal de 5 animales en el día 35 y 5 en el día 80. Tras el destete se les administró pienso comercial *ad libitum* (Nanta, Nutreco, España). Los animales se han sacrificado por dislocación cervical. Las 5 muestras de animales salvajes fueron suministradas por cazadores locales anónimos. En todos los casos el ciego se ligó y extrajo rápidamente tras el sacrificio y se congeló inmediatamente o se mantuvo en hielo hasta su llegada al laboratorio.

Este estudio se ha realizado de acuerdo con las normas españolas que regulan el uso de animales de experimentación y otros propósitos (RD 223/1988, RD 1201/2005 y RD 53/2013). El protocolo ha sido aprobado por el comité de Ética de la UPV y del CSIC.

Extracción, secuenciación y métodos de trabajo con ácidos nucleicos

La extracción de DNA y de RNA de la mucosa, cultivos de órganos, células epiteliales humanas y cecum se realizó con el kit Qiagen Stool DNA extraction (QIAgen, Hilden, Alemania), tal como se describe en nuestro trabajo previo (Bäuerl et al., 2014). La estimación de expresión génica se realizó mediante PCR a tiempo real mediante SYBR® Green PCR Master Mix (Roche) en un equipo LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche), tal como

se describió anteriormente (Bäuerl *et al.*, 2014). El análisis estadístico se realizó con el paquete IBM-SPSS 19.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se amplificó el fragmento de 500 nt que incluye las regiones V1-V3 del gen ribosomal 16S y se secuenció en un equipo de secuenciación masiva Genome Sequencer FLX Titanium Series (454 Life Science, Branford, USA). Las secuencias se alinearon con la base de datos SILVA y se realizó el análisis estadístico y bioinformático con los programas STAMP, QIIME y UniFrac, según se describió anteriormente (Bäuerl *et al.*, 2014). La comparación de nuevas secuencias de animales salvajes y de la granja sin tratamiento con antibióticos se realizó con programación en R (Cabrera Rubio *et al.*, 2017).

Preparación de los filtrados de contenido cecal y ensayo sobre explantes de intestino de conejo y cultivos celulares humanos

Los filtrados de contenido cecal se realizaron como se describe por Licois *et al.* (2005). Se recoge el intestino de la granja experimental de la Universidad Politécnica de Valencia a primera hora de la mañana, realizamos biopsia de animales sanos y extracción del intestino delgado (ID), se puso en hielo en medio DMEM. En el laboratorio las secciones de ID se lavan con PBS estéril y se cortan en fragmentos cuadrados de unos 5 mm de lado con bisturí estéril y en cabina de flujo laminar. A continuación se colocan directamente en placas transwell de 12 pocillos con 900 µl de medio DMEM (**Figura 1**). Sobre las muestras se añade 100 µl de filtrado de contenido cecal y se incuban durante 4 horas y 45 minutos. Terminado el tiempo de incubación se colocan en TRIZOL y se procede a la extracción de RNA. Más detalles del protocolo experimental se detallan en un trabajo previo (Bäuerl *et al.*, 2013).

La línea de células epiteliales humanas utilizada fue HT-29, que se mantuvo en DMEM High glucose con 10% FBS, 1 mM piruvato sódico y antibióticos y se incuban en cámara con atmósfera humidificada y 5% CO₂. Las células se inocularon con una concentración de 75.000 células/cm² en placas de 12 o 24 pocillos hasta alcanzar 90-100 % de confluencia. Se lavaron las células y añadieron los filtrados de ciego, y se incubó 3 horas. A continuación se lavan una vez con PBS y se recogen con TRIZOL. El resto del procedimiento se ha descrito arriba y/o se publicará en breve (Bäuerl *et al.*, 2017).

Resultados y discusión

Como se ha mencionado, el uso de filtrados de contenido cecal (TEC1-4) (Huybens *et al.*, 2009; Licois *et al.*, 2005) ha sido históricamente clave para el estudio de los posibles causantes de esta enfermedad. En un trabajo previo describimos que los animales que sufren EEC muestran una acusada reacción inflamatoria en la mucosa cecal (marcadores como IL-8, IFN γ y TNF α) (Bäuerl *et al.*, 2014). Se han desarrollado diferentes métodos *in vitro* para examinar la respuesta de filtrados cecales (de conejos sanos y EEC) que han permitido diferenciar los extractos procedentes de EEC porque inducen una acusada expresión génica de marcadores pro-inflamatorios (**Figura 1**).

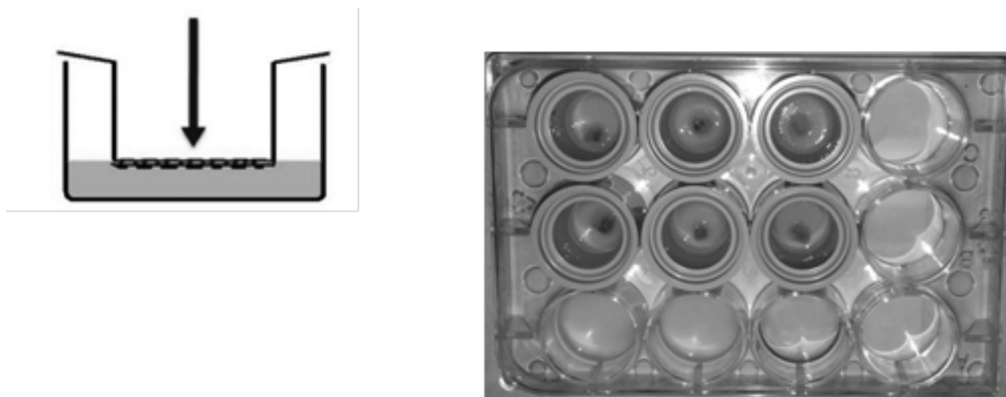


Figura 1. Disposición de los fragmentos de intestino delgado y ciego en placas multipocillo para los ensayos de cultivo de explantes de intestino.

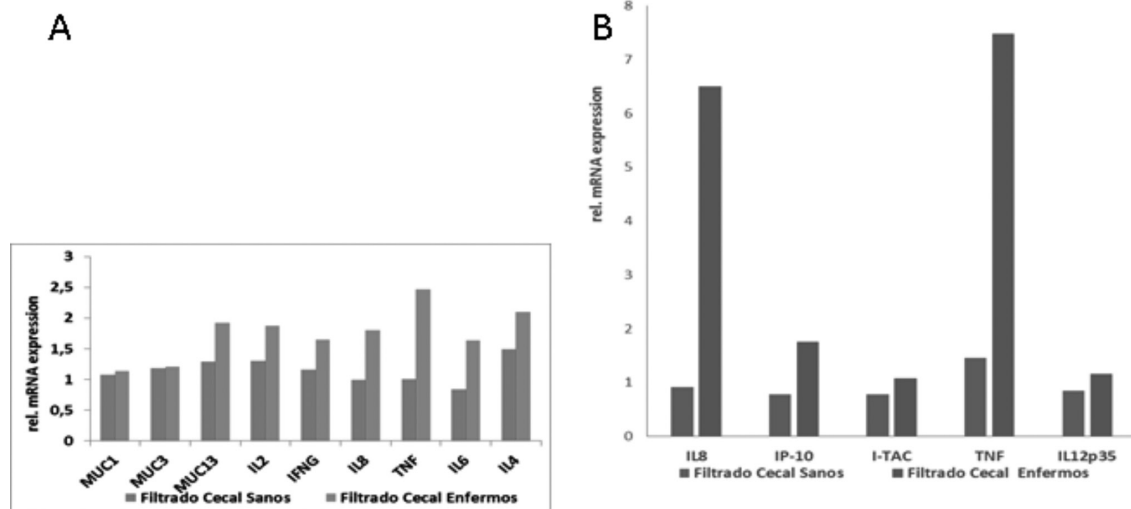


Figura 2. Inducción de expresión génica en fragmentos de ID con placas de peyer (Gráfica A) y en células epiteliales intestinales humanas (Gráfica B) por filtrados de contenido cecal de conejos sanos (barras de la izquierda) y enfermos de EEC (barras de la derecha).

Con filtrados de ciego de animales enfermos y sanos, en el laboratorio de cultivos celulares hemos ensayado la expresión génica de explantes de mucosa cecal, de explantes de ID y de placas de peyer de ID, obtenidos de conejos sanos. En todos los casos se observó una acusada inducción de mRNA de genes pro-inflamatorios, en particular de TNF α , pero también en algunos casos de IFN γ y IL-8 (**Figura 2A**). Dado que la obtención de fragmentos de intestino lleva un proceso largo y que la variabilidad entre individuos es grande, se ensayó también el uso de líneas celulares intestinales humanas, como HT-29. Los resultados de expresión génica de marcadores de la ruta inflamatoria TNF α -NF-KB fueron muy significativos (**Figura 2B**). Ello significa que posiblemente en el filtrado de ciego de animales enfermos hay componentes bacterianos pro-inflamatorios muy potentes, posiblemente LPS (toxina termoestable), flagelina de coliformes, o bien, componentes de la pared y toxinas de clostridios. Aunque este trabajo está ahora en curso y se necesitan realizar numerosas pruebas complementarias, diferentes aislados de bacterias anaerobias aisladas de dichos filtrados, posiblemente sean bacterias del género *Clostridium*, poseen una potente actividad pro-inflamatoria (datos no publicados).

La administración de antibióticos constituye la práctica más eficaz para el tratamiento de enteropatía epizootica del conejo (EEC), sin embargo, el uso de antibióticos debe limitarse progresivamente porque tiene consecuencias imprevisibles, como las que se desprenden de este trabajo. Aquí compararemos los patrones de las bacterias del ciego de conejos silvestres, con los de una granja libre de antibióticos y libre de EEC y también con animales de una granja históricamente tratada con antibióticos donde estudiaron animales sanos y enfermos de EEC. Resulta bastante llamativo que los animales de la granja con antibióticos posean mayor diversidad que los silvestres y la granja sin antibióticos (y sin casos de EEC) (**Figura 3**).

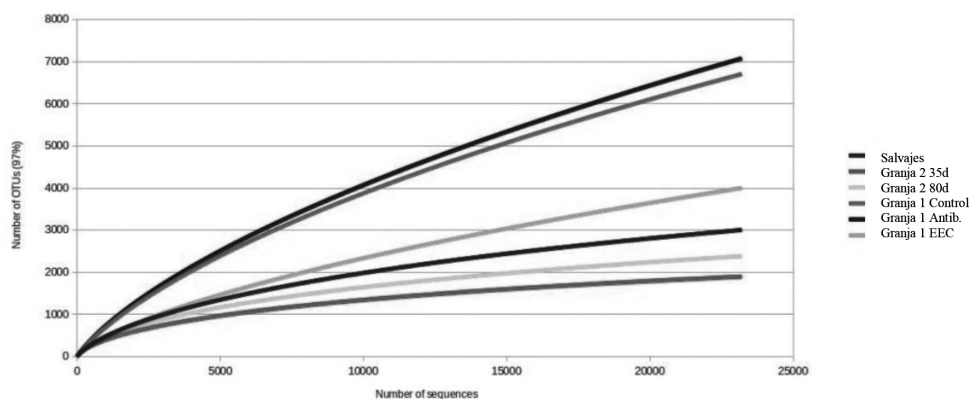


Figura 3. Curvas de rarefacción (diversidad beta).

Los animales alimentados con pienso medicado y los que no lo fueron, pero que estaban en la misma granja, poseen microbiota cecal muy similar. La microbiota de los conejos de la granja sin antibióticos, que tampoco tiene casos de EEC, se parece más a la de animales silvestres que a la tratada con antibióticos (**Figura 4**), en ella son abundantes las familias bacterianas Bacteroidaceae, Ruminococcaceae y Lachnospiraceae. Se podría sugerir que, aunque la EEC se considera una enfermedad multifactorial, el uso frecuente de antimicrobianos podría generar un importante sesgo en las poblaciones bacterianas del ciego, y posiblemente también en el ambiente microbiológico de la granja, dando lugar a una comunidad más susceptible a EEC. Sin embargo, ninguno de los tests estadísticos aplicados nos ha indicado cuál podría ser el oportunista o patógeno asociado a la disbiosis observada en muestras con EEC. Como hipótesis atractiva para futuros estudios, podemos proponer a partir de nuestros datos que los conejos criados en un entorno con antibióticos carecen de bacterias que los protegen de la EEC.

Como conclusión se puede afirmar que las metodologías utilizadas ofrecen una nueva perspectiva de cuál puede ser el escenario que favorece la aparición de la EEC, y también posibles nuevas soluciones, como la recolonización con especies microbianas beneficiosas.

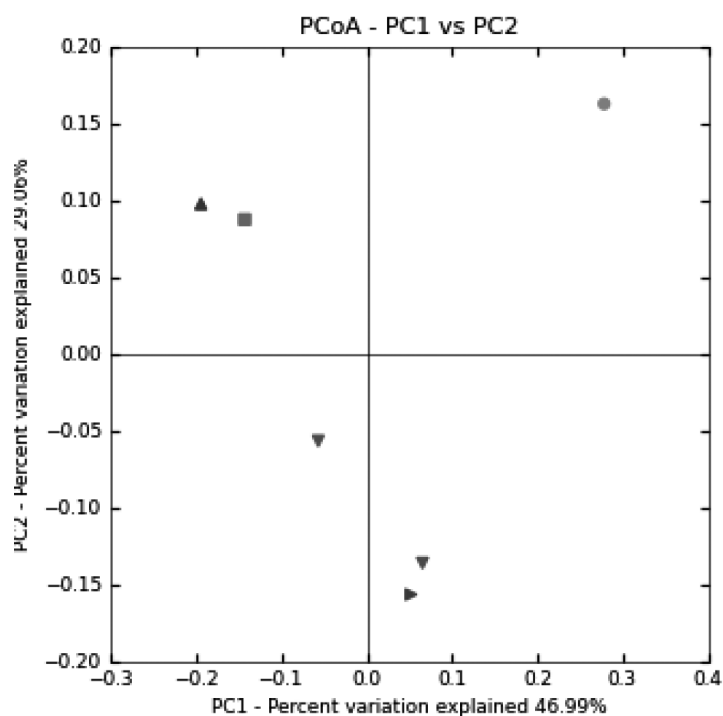


Figura 4. Análisis de componentes principales de las muestras de conejos agrupadas de la granja 1, en la que se administraban antibióticos y con incidencia de EEC (▲ tratados con antibióticos, ■ sanos sin antibióticos (control), ● sin antibióticos enfermos EEC), ▼ granja 2 sin antibióticos y sin EEC y ▶ conejos salvajes.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer el apoyo, consejo y muestras de Enrique Blas, del Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia, a Manuel Marco Laguna de Nutreco España, la aportación de muestras y agradecen la financiación de los proyectos del Plan Nacional AGL2013-47420-R y AGL2015-70487-P.

Bibliografía

Bäuerl C., Collado M.C., Zúñiga M., Blas E., Pérez Martínez, G. 2014. Changes in cecal microbiota and mucosal gene expression revealed new aspects of epizootic Rabbit Enteropathy. *PLoS One*, 9: e105707.

- Bäuerl C., Llopis M., Antolín M., Monedero V., Mata M., Zúñiga M., Guarner F., Pérez Martínez G. 2013. *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus plantarum* strains downregulate proinflammatory genes in an ex vivo system of cultured human colonic mucosa. *Genes & Nutrition*, 8: 165-180.
- Bäuerl C., Valero Peñarrocha A., Pérez Martínez G. 2017. *In vitro* and *ex vivo* rationale for the selection of candidate causative agents of Epizootic Rabbit Enteropathy showed protein-bound inflammatory stimulus. *En preparación*.
- Cabrera Rubio R., Collado M.C., Bäuerl C., Pérez Martínez G. 2017. Differences in the cecal microbiota of rabbits from farms with and without antibiotics and wild rabbits. *En preparación*.
- Combes S., Michelland R.J., Monteils V., Cauquil L., Soulié V., Tran N.U., Gidenne T., Fortun-Lamothe L. 2011. Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 77: 680-689.
- Huybens N., Houeix J., Licois D., Mainil J., Marlier D. 2009. Inoculation and bacterial analyses of fractions obtained from the reference inoculum TEC4 which experimentally reproduces epizootic rabbit enteropathy. *World Rabbit Sci.*, 17: 185-193.
- Huybens N., Houeix J., Licois D., Mainil J., Marlier D. 2013. Pyrosequencing of epizootic rabbit enteropathy inocula and rabbit caecal samples. *The Veterinary Journal*, 196: 109-110.
- Kruiningen H.J.v., Williams, C.B. 1972. Mucoïd enteritis of rabbits: Comparison to cholera and cystic fibrosis (with color plate II). *Veterinary Pathology*, 9: 53-77.
- Lebas F. 2001. Entérocólite : situation en juin 2001. *Cuniculture*, 28: 183.
- Licois D., Wyers M., Coudert P. 2005. Epizootic Rabbit Enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet. Res.*, 36: 601-613.
- Sekirov I., Finlay B.B. 2009. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *The Journal of Physiology*, 587: 4159-4167.
- Sinkovics G. 1976. Intestinal flora studies in rabbit mucoïd enteritis. *Veterinary Record*, 98: 151-152.
- Szalo I.M., Lassence C., Licois D., Coudert P., Poulipoulis A., Vindevogel H., Marlier, D. 2007. Fractionation of the reference inoculum of epizootic rabbit enteropathy in discontinuous sucrose gradient identifies aetiological agents in high density fractions. *The Veterinary Journal*, 173: 652-657.
- Zeng B., Han S., Wang P., Wen B., Jian W., Guo W., Yu Z., Du D., Fu X., Kong F., Yang M., Si X., Zhao J., Li, Y. 2015. The bacterial communities associated with fecal types and body weight of rex rabbits. *Scientific Reports*, 5: 9342.

Tipado capsular de *Pasteurella multocida* mediante PCR en tiempo real y su aplicación directa en muestras clínicas de conejo

Pasteurella multocida capsular typing by qPCR. Direct application in rabbit clinical samples

Arnal J.L.*, Sanz C., Serrano D., Benito A, Chacón G., Fernández A.

EXOPOL Autovacunas y Diagnóstico, Pol. Río Gállego, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza, España

* Dirección de contacto: jlarnal@exopol.com

Resumen

La pasterelosis, causada por diversas cepas de los serotipos A, D y F de *Pasteurella multocida*, es una de las principales enfermedades bacterianas de las granjas comerciales de conejos en España. Diversas técnicas de PCR convencional han sido descritas para la caracterización capsular de cepas. El objetivo de este trabajo fue desarrollar nuevos ensayos PCR a tiempo real (qPCR) para el tipado capsular de cepas de *P. multocida*. Se ha demostrado que dichos ensayos también son válidos para la detección de los distintos tipos directamente sobre muestras clínicas siendo más convenientes para el diagnóstico por su sensibilidad, especificidad, rapidez y menor costo.

Palabras clave: *Pasteurella multocida*, pasterelosis, serotipo, cápsula, qPCR.

Abstract

Pasteurellosis, caused by *Pasteurella multocida* serotypes A, D and F, is one of the main bacterial diseases on Spanish rabbit commercial farms. So far different conventional PCR techniques have been described for capsular characterization. The aim of this study was to develop novel real time PCR (qPCR) technique assays for *P. multocida* strains capsular typing. Good results have been also obtained by direct application of these assays in rabbit clinical samples. Due to their high sensibility, specificity and lower cost on money and time, they are very convenient to be applied in a diagnostic laboratory.

Keywords: *Pasteurella multocida*, pasteurellosis, serotype, capsule. qPCR.

Introducción

La pasterelosis es una de las enfermedades infecciosas no digestivas más frecuentes en las granjas de conejos, afectando tanto a reproductoras en las que produce septicemias, neumonías, mamitis y metritis principalmente, como a gazapos de cebo a los que afecta sobre todo a nivel respiratorio aunque también produciendo infecciones piogénicas subcutáneas (Rosell, 2000). Diversos estudios han demostrado que de los 5 serotipos de *Pasteurella multocida* descritos (A, B, D, E y F), 3 (A, D y F) están asociados a patología en granjas cunícolas, utilizando diversas técnicas de PCR convencional para el tipado capsular a partir de las cepas aisladas en cultivo (Jaglic et al., 2004; El-Tayeb et al., 2004; Stahel et al., 2009; García-Alvarez et al., 2015).

Sin embargo, el aislamiento, identificación y posterior tipado de cada una de las cepas obtenidas en un conjunto de muestras proveniente de un mismo caso clínico es muy costoso, y tiene el riesgo de detectar únicamente los tipos presentes de forma mayoritaria. El objetivo de este trabajo fue desarrollar nuevos ensayos qPCR para la identificación del tipo capsular de cepas de *P. multocida* y valorar su aplicación directa sobre muestras clínicas para identificar todos los serotipos presentes en un conjunto de dichas muestras.

Material y métodos

Seis ensayos PCR en tiempo real (qPCR) con sonda de hidrólisis fueron desarrollados y validados para este trabajo. Inicialmente se trabajó en un ensayo destinado a la detección de *P. multocida* cuyo gen diana era *kmt1* y que detectaba cualquier tipo capsular a través de una sonda marcada en fluoróforo FAM. En la misma reacción se dispuso un ensayo para la detección de un gen constitucional del conejo a través de una sonda marcada en HEX a modo de control endógeno (Benito *et al.*, 2013).

Para la determinación de los distintos tipos capsulares de *P. multocida*: A, B, D, E y F, se desarrollaron 5 ensayos qPCR adicionales, diseñados para poder trabajar en formato individual marcados en FAM o en versión multiplex utilizando sondas marcadas con distintos fluoróforos: FAM, HEX y CY5.

Para la validación de estos test se utilizó una colección de cepas previamente referenciadas que habían sido aisladas a partir de muestras clínicas de distintos procesos patológicos de conejos (García-Alvarez *et al.*, 2015). Se utilizaron 10 cepas de cada uno de los únicos tipos capsulares encontrados en conejos hasta el momento: A, D y F.

Una vez validados los ensayos, se seleccionaron 20 casos clínicos de patología respiratoria, procedentes de distintas granjas cunícolas, remitidos al laboratorio entre septiembre de 2016 y febrero de 2017, que habían obtenido un resultado positivo a *P. multocida* por qPCR al aplicarlo directamente sobre muestras. En cada caso clínico se analizaron entre 1 y 5 muestras que podían ser pulmones (n=13) o bien hisopados de tejido pulmonar (n=7).

De cada una de las muestras se realizó el cultivo microbiológico mediante siembra en agar sangre Columbia (Oxoid PB5039A) e incubación a 37 °C durante 24 horas, y se identificaron las cepas aisladas mediante pruebas bioquímicas convencionales (Quinn *et al.*, 1994). Las muestras testadas para qPCR fueron analizadas individualmente o en pools de hasta 5, dependiendo del número de muestras enviadas para cada caso, y en todos los casos se realizó la detección molecular de *P. multocida* así como sus tipos capsulares mediante los citados ensayos qPCR.

La detección molecular mediante qPCR de *P. multocida* y todos sus tipos capsulares se realizó directamente sobre las muestras clínicas, y posteriormente además sobre los aislamientos microbiológicos obtenidos en cada una de las muestras. El proceso se inició con la extracción de los ácidos nucleicos mediante un equipo automatizado (LabTurbo 48C Compact System, Taigen, Taiwan) utilizando el kit comercial (LabTurbo LGD 480 mini kit, Taigen, Taiwan) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la amplificación se utilizó un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) con un único protocolo térmico para todos los ensayos que consistía en un ciclo de activación de 5 minutos a 95 °C y 42 ciclos de 95 °C 15 segundos y 60 °C 1 minuto. Un oligonucleótido sintético con número conocido de copias se utilizó a modo de control positivo que posibilitaba la cuantificación de cada uno de los ensayos utilizados. El valor Cq establecido como cut-off fue 38, considerando todas aquellas muestras cuyo valor Cq era igual o inferior como positivas.

Resultados y discusión

El panel de cepas utilizado para la validación de los ensayos qPCR obtuvo los siguientes resultados detallados en la **Tabla 1**.

Todas las cepas (n=30) resultan positivas al ensayo de *P. multocida* con un rango de valores Cq comprendido entre 12,5 y 14,9. Se observa además que los ensayos para el tipado capsular obtienen una sensibilidad del 100% y especificidad del 100%. Estas qPCR son capaces de detectar todos los aislamientos propios de su tipo y resultan completamente negativos al analizar cepas de otros tipos capsulares diferentes para el que están diseñadas.

Tabla 1. Resultados de validación de ensayos qPCR para tipado capsular de *P. multocida*.

Cepa	<i>P. multocida</i> qPCR			Tipado qPCR, valor Cq				
	Tipo	RESULTADO	Cq	A	B	D	E	F
77171	A	Positivo	14,3	13,74	neg	neg	neg	neg
77002	A	Positivo	13,5	13,29	neg	neg	neg	neg
76939	A	Positivo	13,2	12,95	neg	neg	neg	neg
76918	A	Positivo	12,9	12,86	neg	neg	neg	neg
76736	A	Positivo	13,4	12,86	neg	neg	neg	neg
76520	A	Positivo	13,6	13,63	neg	neg	neg	neg
76513	A	Positivo	13,3	13,96	neg	neg	neg	neg
76505	A	Positivo	13,8	14,20	neg	neg	neg	neg
76503	A	Positivo	14,1	14,37	neg	neg	neg	neg
76326	A	Positivo	13,3	13,63	neg	neg	neg	neg
76131	D	Positivo	12,7	neg	neg	12,59	neg	neg
76037	D	Positivo	13,9	neg	neg	13,89	neg	neg
76016	D	Positivo	12,5	neg	neg	12,34	neg	neg
75366	D	Positivo	12,8	neg	neg	12,87	neg	neg
75260	D	Positivo	13,3	neg	neg	13,34	neg	neg
75189	D	Positivo	13,0	neg	neg	13,11	neg	neg
75119	D	Positivo	13,8	neg	neg	14,37	neg	neg
75039	D	Positivo	13,3	neg	neg	13,96	neg	neg
75011	D	Positivo	14,0	neg	neg	14,93	neg	neg
74532	D	Positivo	13,4	neg	neg	14,51	neg	neg
76154	F	Positivo	12,6	neg	neg	neg	neg	12,59
73827	F	Positivo	12,6	neg	neg	neg	neg	13,89
73811	F	Positivo	13,8	neg	neg	neg	neg	12,40
73688	F	Positivo	13,6	neg	neg	neg	neg	12,87
72896	F	Positivo	14,5	neg	neg	neg	neg	13,35
71955	F	Positivo	13,7	neg	neg	neg	neg	13,11
71948	F	Positivo	14,1	neg	neg	neg	neg	14,95
71471	F	Positivo	14,6	neg	neg	neg	neg	15,34
71375	F	Positivo	14,5	neg	neg	neg	neg	15,01
71161	F	Positivo	14,9	neg	neg	neg	neg	15,59

Al comparar los valores Cq resultantes de cada cepa para el ensayo de *P. multocida* y el respectivo tipo capsular (A, D o F) observamos que el mayor incremento registrado es de 1,4, un valor relativamente bajo. Este hecho podría ser debido a una notable homogeneidad en la eficiencia de todos los ensayos; característica que resultará útil para una posterior interpretación de los valores Cq cuando se aplica la técnica directamente sobre las muestras clínicas.

Al analizar la colección de 20 casos clínicos mediante qPCR directa sobre muestras se encontró únicamente 4 casos en los que sólo se detecta un tipo capsular. Vale la pena resaltar la alta heterogeneidad de tipos capsulares de *P. multocida*, ya que en el 80% de los casos se detecta más de 1 tipo y en el 25% se detectan los 3 tipos A, D y F (Tabla 2). Tras haber investigado los 5 tipos capsulares, en ninguno de los casos el tipo B ni E fueron detec-

Tabla 2. Heterogeneidad del tipo capsular encontrado en muestras clínicas por qPCR.

	nº casos	%
1 tipo capsular	4	20
2 tipos capsulares	11	55
3 tipos capsulares	5	25

tados. Parece que, como se ha descrito anteriormente, los tipos A, D y F son los únicos presentes en la especie cunícola (Jaglic et al., 2004; El-Tayeb et al., 2004; Stahel et al., 2009; García-Alvarez et al., 2015).

El tipo capsular más frecuente fue el A, detectado en el 95% de los casos, mientras que los tipos D y F se detectaron en el 50% y 65% de los casos respectivamente (Tabla 3), lo que está en consonancia con las proporciones obtenidas por García-Alvarez et al. (2015), que encontró unas proporciones del 47%, 28% y 25% para A, D y F respectivamente, al analizar cepas aisladas de casos clínicos de conejos en la Península Ibérica.

Tabla 3. Prevalencia de cada tipo capsular mediante qPCR directa sobre muestras clínicas.

	nº casos	%	Rango valores	Cq
Tipo A	19	95	17,33	36,94
Tipo D	10	50	15,84	35,24
Tipo F	13	65	16,78	37,81

En los 20 casos clínicos se aisló *P. multocida* en al menos una muestra. Mediante el tipado capsular de cada uno de los aislamientos obtenidos se detectó la presencia de más de un tipo únicamente en el 30% de los casos (Tabla 4), un porcentaje mucho más bajo que cuando se analizó por qPCR directamente sobre muestra clínica (30% vs 80%). La disparidad de resultados es entendible dado que la técnica qPCR presenta una sensibilidad mayor que el cultivo microbiológico, detectando cepas presentes de forma minoritaria que no pueden ser aisladas si se encuentran en muy baja proporción respecto al total de bacterias presentes en la muestra. Los altos valores Cq, inversamente proporcionales a la cantidad de bacteria presente en la muestra, obtenidos en algunos casos para determinados tipos capsulares confirman este hecho.

Tabla 4. Prevalencia de cada tipo capsular mediante qPCR sobre aislamiento.

	nº casos	%
Tipo A	9	45
Tipo D	3	15
Tipo F	2	10
Tipo A+D	2	10
Tipo A+F	4	20

En ninguno de los 20 casos analizados se identificó un aislamiento con un determinado tipo capsular que no hubiera sido previamente detectado mediante qPCR directa sobre la muestra. Al comparar el valor Cq obtenido por el ensayo de *P. multocida* y los distintos tipos capsulares vemos que, en la mayoría de los casos, el cultivo microbiológico únicamente es capaz de aislar aquellos tipos que tienen un valor Cq similar al valor Cq obtenido mediante el ensayo de *P. multocida*.

Gracias a la capacidad cuantificadora de la técnica podemos interpretar cuáles son los tipos más abundantes en la muestra y así prever cuál tendrá mayor probabilidad de ser aislado. La mayor sensibilidad de la metodología propuesta permite la detección de tipos capsulares que por el método de cultivo tradicional hubieran sido ignorados. Sin lugar a dudas, la mera detección de un tipo capsular no sugiere su implicación directa en el proceso patológico. No obstante este tipo de información puede ser valiosa para una mejor aproximación al diagnóstico de la enfermedad y el diseño más preciso de autovacunas para su prevención.

Conclusión

Mediante el presente trabajo quedan validados los ensayos qPCR tanto para el tipado capsular de aislamientos de *P. multocida* así como para la detección de los diferentes tipos capsulares en un análisis directo sobre la

muestra. Los resultados obtenidos demuestran que en un porcentaje considerable de casos clínicos de pastere-
losis hay más de un tipo capsular implicado.

Bibliografía

Benito A., Arnal J.L., De Tomas E., Serrano D., Villa A. 2013. Internal controls for reliable results in real-time PCR diagnostic assays. WAVLD 2013 Congress. Berlin.

El-Tayeb A.B., Morishita T.Y., Angrick E.J. 2004. Evaluation of *Pasteurella multocida* isolated from rabbits by capsular typing, somatic serotyping, and restriction endonuclease analysis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 16: 121-125.

García-Alvarez A., Chaves F., Fernández A., Sanz C., Borobia M., Cid D. 2015. An ST11 clone of *Pasteurella multocida*, widely spread among farmed rabbits in the Iberian Peninsula, demonstrates respiratory niche association. *Infect. Genet. Evol.*, 34: 81-87.

Jaglic Z., Kucerova Z., Nedbalcova K., Hlozek P., Bartos M. 2004. Identification of *Pasteurella multocida* Serogroup F isolates in rabbits. *J. Vet. Med. B.*, 51: 467-469.

Quinn P.J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, Mosby-Year Book Europe Limited. London, England.

Rosell J.M. 2000. Capítulo nº 17. Pasteurelosis. En: Rosell J.M. (ed). *Enfermedades del conejo*. Vol II. Mundi-Prensa, Madrid, pp. 71-122.

Stahel A.B., Hoop R.K., Kuhnert P., Korczak B.M. 2009. Phenotypic and genetic characterization of *Pasteurella multocida* and related isolates from rabbits in Switzerland. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 21: 793-802.

Detección y aislamiento de virus de la enfermedad hemorrágica del conejo RHDV2/b en micromamíferos silvestres en el Norte de España

Detection and isolation of rabbit haemorrhagic disease virus RHDV2/b in wild micromammals in Northern Spain

Mendoza M.¹, Calvete C.^{1*}, Sarto M.P.¹, Jiménez de Bagüés M.P.¹, Luján Ll.³, Molín J.³, Calvo A.J.², Monroy F.², Calvo J.H.^{1,4}

¹ Dept. Sanidad y Producción Animal, Centro de Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), 50059 Zaragoza, España

² Gerencia de Sanidad, Seguridad Alimentaria y Salud Pública de TRAGSATEC, C/ Julián Camarillo 6, 28037 Madrid, España

³ Departamento de Patología Animal, Universidad de Zaragoza, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), 50013 Zaragoza, España

⁴ ARAID, 50004 Zaragoza, España

*Dirección de contacto: ccalvete@aragon.es

Resumen

El presente trabajo explora la existencia de infección natural por RHDV2/b en micromamíferos simpátricos del conejo silvestre. Durante el período comprendido entre 2014 y 2016 se monitorizaron varias poblaciones de conejo de monte en semilibertad donde se hallaron cuatro cadáveres de micromamíferos muertos por causas naturales. Mediante un protocolo de PCR dúplex en tiempo real, se intentó determinar la presencia del virus RHDV2/b en los animales muestreados. En total se encontraron, dos topillos mediterráneos (*Microtus duodecimcostatus*) y dos musarañas grises (*Crocidura russula*), resultando un topillo y ambas musarañas positivos a RHDV2/b. Para comprobar la infectividad de las muestras, se inoculó a un lote de conejos de laboratorio con homogeneizados procedentes de los hígados de los micromamíferos, muriendo algunos con lesiones compatibles con RHD. El análisis por PCR dúplex en tiempo real de los hígados de los conejos demostró la presencia de virus en los mismos, confirmando su pertenencia al genotipo RHDV2/b mediante secuenciación del gen que codifica para la proteína VP60. Este hallazgo es a nuestro conocimiento el primer aislamiento de RHDV2/b en micromamíferos silvestres y sugiere que la epidemiología de la enfermedad puede ser más complicada de lo que se conoce actualmente. El estudio además pone de manifiesto la necesidad de realizar una correcta desratización en las granjas cunícolas para evitar la posible entrada del virus por esta vía. Deberían realizarse estudios ulteriores para elucidar completamente el rol de los micromamíferos y otras especies animales en la epidemiología de la enfermedad hemorrágica.

Palabras clave: Enfermedad hemorrágica del conejo, RHDV2/b, *Oryctolagus cuniculus*, *Microtus duodecimcostatus*, *Crocidura russula*.

Abstract

Present work explores the natural RHDV2/b infection of wild rabbit-sympatric micromammals. Between 2014 and 2016 several wild rabbit populations kept in semi-freedom enclosures were monitored where four micromammal carcasses were found, dead by natural causes. A duplex real time PCR procedure was used in order to assess the presence of RHDV2/b in all sampled animals. In total, two Mediterranean Pine Voles (*Microtus duodecimcostatus*) and two White-toothed Shrews (*Crocidura russula*) were found. One vole and both shrews resulted positive to RHDV2/b. To assess the infectiousness of the isolates, a batch of laboratory rabbits was inoculated with homogenates obtained from the livers of positive micromammals, where some died showing compatible RHD lesions. The Duplex real time PCR analysis of the livers from the rabbits demonstrated the infection and

nucleotide sequences of *VP60* gene confirmed their genotype as RHDV2/b. This finding is to our knowledge the first report of RHDV2/b in wild micromammals and it suggests that the epidemiology of the disease could be more convoluted than initially understood. The study also manifests the importance of implementing good micromammal pest control programs in rabbitries in order to avoid the possible entrance of the virus in this manner. Further studies are necessary to fully assess the role of micromammals and other animal species in RHD epidemiology.

Keywords: Rabbit haemorrhagic disease, RHDV2/b, *Oryctolagus cuniculus*, *Microtus duodecimcostatus*, *Crocidura russula*.

Introducción

La enfermedad hemorrágica del conejo (RHD) está causada por un calicivirus del género *Lagovirus* que afecta gravemente al conejo Europeo (*Oryctolagus cuniculus*) y todas sus variedades domésticas. Actualmente es una enfermedad muy importante debido a las altas pérdidas económicas que supone para la cunicultura (Abrantes *et al.*, 2012). Además es uno de los principales factores que afectan a la recuperación de las poblaciones de conejo silvestre en su área de distribución original, que es la península Ibérica y donde es una especie clave para el mantenimiento de los ecosistemas y depredadores emblemáticos como el lince ibérico (*Lynx pardinus*) y el águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*) (Delibes-Mateos *et al.*, 2008).

Por otro lado, a partir de 2010 tras el estudio de unos brotes de RHD en Francia, se detectó un nuevo virus relacionado con el RHDV (Le Gall-Reculé *et al.*, 2011). Este nuevo virus, bautizado como RHDVb (Dalton *et al.*, 2012) o RHDV2 (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013), en adelante RHDV2/b, es filogenéticamente distinto a otros lagovirus, presentando un perfil antigénico propio y, además, parece tener una mortalidad media menor que los virus clásicos y, al contrario de éstos, puede inducir mortalidad en gazapos muy jóvenes (Dalton *et al.*, 2012; Le Gall-Reculé *et al.*, 2013).

El RHDV2/b se ha extendido rápidamente por toda Europa occidental, sustituyendo a las cepas clásicas en Francia y la península Ibérica (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013; Calvete *et al.*, 2014; Dalton *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2015) presentándose como una nueva amenaza tanto para la cunicultura como para las poblaciones silvestres. En poco tiempo se ha observado la capacidad del RDHV2/b para infectar varias especies de lepóridos, entre ellos la liebre sarda (*Lepus capensis mediterraneus*) (Puggioni *et al.*, 2013), la liebre europea (*Lepus europaeus*) (Camarda *et al.*, 2014) la liebre de Córcega (*Lepus corsicanus*) (Le-Gall Reculé *et al.*, 2016; Velarde *et al.*, 2016) y recientemente, la liebre variable (*Lepus timidus*) (OIE, 2017), causándoles una enfermedad similar a la RHD. Estos hallazgos, unidos a los realizados por Merchán *et al.* (2011) que aislaron RNA vírico de RDHV clásico en especímenes de ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*) y ratón moruno (*Mus spretus*) simpátricos del conejo silvestre, y Rocha *et al.* (2017) con la posterior comprobación experimental de la infección desde el conejo a estos micromamíferos, sugieren que los virus causantes de la RHD tienen un amplio rango de hospedadores susceptibles, lo que incrementaría en gran medida la complejidad epidemiológica de la enfermedad.

Ampliando el espectro de hospedadores aún más, nuestro trabajo presenta la detección y aislamiento de RDHV2/b en el hígado de dos especies diferentes de micromamíferos, lo que constituye el primer hallazgo de RDHV2/b en especies no pertenecientes al orden *Lagomorpha* además del primer aislamiento de lagovirus infectantes no procedentes de lagomorfos.

Material y métodos

Se hallaron cuatro cadáveres de micromamíferos durante el seguimiento rutinario de cuatro poblaciones de conejo silvestre en semilibertad localizadas en la finca experimental que el CITA tiene en la provincia de Zaragoza. El seguimiento de las poblaciones, realizado entre 2014-2016, estuvo englobado en el marco de ejecución de un proyecto de investigación sobre la epidemiología de RHD en dichas poblaciones. Se encontraron dos ejemplares de topillo mediterráneo (*Microtus duodecimcostatus*) denominados Md-Sep14-P3 y Md-Nov14-P3, y dos individuos de musaraña gris (*Crocidura russula*) denominados Cr-Feb15-P1 y Cr-Jun15-P4. Tras la recogida, se realizó la necropsia de los animales en las instalaciones del CITA, para identificar la especie y extraer el hígado, almacenándolo a -20°C para su posterior análisis mediante PCR dúplex en tiempo real (qPCR-dúplex).

El procedimiento de qPCR-dúplex se ha desarrollado y puesto a punto durante el presente proyecto de investigación con el fin de facilitar la detección simultánea de virus RHDV clásico o RHDV2/b en un mismo ensayo.

La extracción del ARN vírico se realizó utilizando el reactivo TRI Reagent (SIGMA, Life Science) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La síntesis de ADNc mediante la retrotranscripción del ARN se llevó a cabo usando el kit SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) conforme a las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

Posteriormente, a partir de cada espécimen de micromamífero se preparó un homogeneizado de 0,2 g de tejido hepático en 1 ml de PBS estéril. Esta suspensión fue centrifugada y el sobrenadante obtenido, una vez filtrado (tamaño de poro: 0,22 μm), se utilizó para la realización de infecciones experimentales en conejos de laboratorio.

En total, se inocularon ocho conejos de la raza Blanco de Nueva Zelanda de 12 semanas de edad (Granja San Bernardo, Tulebras, España), no vacunados frente a RHD y procedentes de progenitores no vacunados. La ausencia de anticuerpos anti RHD fue confirmada mediante ELISA indirecto comercial (Ingezim RHDV ref.17.RHD.K1, Laboratorios INGENASA, Madrid, España). Con cada suspensión procedente de la muestra de micromamífero se inoculó simultáneamente a dos conejos, a razón de 0,3ml de inóculo por vía intramuscular. Una vez inoculados los animales fueron mantenidos en las instalaciones de bioseguridad del CITA durante todo el ensayo.

Los conejos se monitorizaron para observar cambios clínicos y mortalidad durante tres semanas. A los animales muertos así como a los que se les practicó la eutanasia al finalizar el estudio, se les realizó la necropsia para examinar las lesiones macroscópicas y recoger muestras de hígado, bazo, riñón, timo y duodeno para analizar mediante qPCR-dúplex. Una parte del tejido hepático de los animales muertos se utilizó para apoyar el diagnóstico de muerte por RHD mediante un test ELISA directo comercial (Ingezim RHDV DAS ref.17.RHD.K2, Laboratorios INGENASA, Madrid, España). Un duplicado de todas las muestras se conservó en formol para su examen histopatológico. A los animales supervivientes se les extrajo una muestra de sangre 21 días después de la inoculación, para comprobar la seroconversión utilizando el test ELISA indirecto mencionado anteriormente.

Para la secuenciación completa del gen VP60 se utilizó la PCR convencional. La purificación de los productos obtenidos en la PCR se realizó con el kit Macherey-Nagel-Extract II purification (Macherey-Nagel, Alemania) y fueron secuenciados en una plataforma ABI Prism 3700 (Applied BioSystems, Madrid, España) conforme a las instrucciones del fabricante.

Resultados y discusión

Los resultados de la qPCR-dúplex fueron positivos para los especímenes Md-Nov14-P3, Cr-Feb15-P1 y Cr-Jun15-P4. La media de los valores de Cq fue alta en todos los casos, 36,5, 32,5 y 38 respectivamente, sugiriendo una baja cantidad de partículas víricas.

En la infección experimental, murieron los dos conejos inoculados con la suspensión obtenida de Md-Nov14-P3 a las 64h y 163h post-inoculación respectivamente, y un conejo inoculado con la suspensión de Cr-Jun15-P4 (37h post-inoculación). A la necropsia, los tres ejemplares mostraron lesiones evidentes de cuadro agudo de enfermedad hemorrágica. La causa de muerte por RHD fue confirmada en los tres animales mediante qPCR-dúplex, demostrando la presencia del virus RHDV2/b con unos valores de Cq entre 16 y 20 (indicativos de animales muertos en fase aguda de la enfermedad). El test ELISA directo corroboró la causa de muerte. Las lesiones histopatológicas principales también fueron características de RHD, con hepatitis necrótica aguda por pérdida de hepatocitos como resultado de apoptosis inducida, así como hemorragia y congestión en pulmones, riñones y bazo a causa de una CID masiva. También se registró necrosis tubular en los riñones y depósitos de fibrina en la pulpa roja y apoptosis de los centros germinales del bazo, mientras que en los pulmones las principales lesiones fueron edema, hemorragias intraalveolares y trombosis vascular.

Respecto a los tres conejos supervivientes, no se observaron signos clínicos, lesiones macroscópicas o histopatológicas en ninguno de ellos. Los resultados de la qPCR-dúplex fueron negativos en todas las muestras excepto en el hígado y bazo pertenecientes al conejo superviviente inoculado con suspensión de Cr-Jun15-P4, aunque con Cq medios muy altos (40,5 y 42 respectivamente). Además se detectó la seroconversión a los 21 días post-inoculación en este conejo y otro inoculado con Cr-Feb15-P1.

La secuenciación completa del gen VP60 de los aislados obtenidos de los conejos muertos por RHD confirmó la pertenencia de todos ellos al genotipo RHDV2/b.

En conclusión, el RHDV2/b parece tener un rango mucho más amplio de hospedadores que las cepas clásicas de RHDV, ya que otros autores han demostrado la infección de varias especies de liebres mencionadas anteriormente. Nuestros resultados van más allá, presentando el hallazgo de una infección natural por RHDV2/b de dos especies de roedores, el topillo mediterráneo (*Microtus duodecimcostatus*) y la musaraña gris (*Crocidura russula*) siendo a nuestro conocimiento el primer aislamiento de este virus fuera del orden de los lagomorfos, lo que implica un importante salto en la supuesta barrera de hospedador del virus RHDV2/b. Además se confirma que los virus aislados en los micromamíferos mantienen su capacidad infectante, siendo capaces de producir enfermedad en los conejos. Se están realizando más estudios para elucidar la filogenética de las cepas aisladas en los micromamíferos y los conejos silvestres de nuestras poblaciones.

Estos resultados sugerirían que la epidemiología de la enfermedad hemorrágica podría ser más compleja de lo que se asume en la actualidad, y refuerzan la posibilidad de que el origen del agente etiológico de la RHD, sin determinar todavía en la actualidad, haya sido consecuencia de un salto del virus entre especies, por lo que es necesario seguir invirtiendo en investigación sobre la RHD. Por otro lado, la implicación para la cunicultura pondría de manifiesto la importancia de aplicar protocolos eficaces para mantener las explotaciones libres de micromamíferos, reduciendo las probabilidades de re-introducir o mantener el virus RHDV2/b en ellas tras un brote de enfermedad.

Agradecimientos

Este trabajo se ha desarrollado gracias al convenio de colaboración entre el Centro de Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) y Tecnologías y Servicios Agrarios S.A., S.M.E., M.P. (TRAGSATEC), para la realización de las actividades del proyecto "Aplicación del protocolo de Hiperinmunización frente a la Enfermedad Vírica Hemorrágica (RHD) en poblaciones naturales de Conejo Silvestre (INMUNIZADOS 1316)" y ha sido cofinanciado por el proyecto de investigación E-RTA2014-00009-00-00 del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

Bibliografía

- Abrantes J., Van Der Loo W., Le Pendu J., Esteves P.J. 2012. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Veterinary Research*, 43: 12.
- Calvete C., Sarto P., Calvo A.J., Monroy F., Calvo J.H. 2014. Could the new rabbit haemorrhagic disease virus variant (RHDVb) be fully replacing classical RHD strains in the Iberian Peninsula? *World Rabbit Science*, 22: 91.
- Camarda A., Pugliese N., Cavadini P., Circella E., Capucci L., Caroli A., Legretto M., Mallia E., Lavazza A. 2014. Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Italian hare (*Lepus corsicanus*). *Research in Veterinary Science*, 97: 642-645.
- Dalton K.P., Nicieza I., Balseiro A., Muguerza M.A., Rosell J.M., Casais R., Álvarez A.L., Parra F. 2012. Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 18: 2009-2012.
- Dalton K.P., Nicieza I., Abrantes J., Esteves P.J., Parra F. 2014. Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula. *Veterinary Microbiology*, 169: 67-73.
- Delibes-Mateos M., Delibes M., Ferreras P., Villafuerte R. 2008. Key role of European rabbits in the conservation of the Western Mediterranean basin hotspot. *Conservation Biology*, 22: 1106-1117.
- Le Gall-Reculé G., Zwingelstein F., Boucher S., Le Normand B., Plassiart G., Portejoie Y., Decors A., Bertagnoli S., Guérin J-L., Marchandeu S. 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Veterinary Record*, 168: 137-138.
- Le Gall-Reculé G., Lavazza A., Marchandeu S., Bertagnoli S., Zwingelstein F., Cavadini P., Martinelli N., Lombardi G., Guérin J-L., Lemaitre E., Decors, A. Boucher A., Le Normand B., Capucci L. 2013. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. *Veterinary Research*, 44:81.
- Le Gall-Reculé G., Lemaitre E., Bertagnoli S., Hubert C., Top S., Lequeux T., Decors A., Marchandeu S., Guitton J.S. 2016. Large scale detection of the rabbit haemorrhagic disease virus RHDV2 in European hare (*Lepus europaeus*) populations

in France causing European brown hare syndrome EBHS-like outbreaks. En: 5th World Lagomorph Conference. Turlock CA, EE.UU., p. 67.

Lopes A.M., Correia J., Abrantes J., Melo P., Ramada M., Magalhães M.J., Alves P.C., Esteves P.J. 2015. Is the new variant RHDV replacing genogroup 1 in Portuguese wild rabbit populations? *Viruses*, 7: 27-36.

Merchán T., Rocha G., Alda F., Silva E., Thompson G., Hidalgo de Trucios S., Pagés A. 2011. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in nonspecific vertebrate hosts sympatric to the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Infection, Genetics and Evolution*, 11: 1469-1474.

Velarde R., Cavadini P., Neimane A., Chiari M., Cabezón O., Lavín S., Gaffuri A., Grilli G., Gavier-Widén D., Lavazza A., Capucci L. 2016. Detection of the new emerging rabbit hemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in European brown hares (*Lepus europaeus*) from Italy and Spain. En: 5th World Lagomorph Conference. Turlock CA, EE.UU., p. 66.

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal, 2017. Interfaz de la base de datos del sistema mundial de información zoonosanitaria (WAHID/WAHIS).

http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=22452.

Puggioni G., Cavadini P., Maestrone C., Scivoli R., Botti G., Ligios C., Le Gall-Reculé G., Lavazza A., Capucci L. 2013. The new French 2010 rabbit hemorrhagic disease virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Veterinary Research*, 44: 96.

Rocha G., Alda F., Pagés A., Merchán T. 2017. Experimental transmission of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) from rabbit to wild mice (*Mus spretus* and *Apodemus sylvaticus*) under laboratory conditions. *Infection, Genetics and Evolution* 47: 94-98.

Respuesta inmunitaria del conejo frente a *Staphylococcus aureus*

Immune response of the rabbit to Staphylococcus aureus

Muñoz-Silvestre A.* , Pérez-Fuentes S., Moreno-Grúa E., Corpa J.M., Selva L., Viana D.

Instituto CEU de Ciencias Biomédicas (Grupo de Patología y Sanidad Animal), Facultad de Veterinaria, PASAPTA, Universidad CEU Cardenal Herrera, Tirant lo Blanc 7, 46115 Alfara del Patriarca (Valencia), España

* Dirección de contacto: asuncion.munoz@uchceu.es

Resumen

En el ámbito de la cunicultura comercial *Staphylococcus aureus* es una bacteria con notable interés desde el punto de vista sanitario debido a que afecta a conejos de todas las edades y produce diferentes tipos de lesiones supurativas. En el presente trabajo se plantea estudiar la respuesta inmunitaria local desarrollada en los animales tras la inoculación intradérmica de la cepa más extendida de *S. aureus* aislada en granja: la ST121. El 100% de los animales infectados con la cepa ST121 desarrollaron lesiones. Los resultados de las poblaciones leucocitarias analizadas mediante tinción inmunohistoquímica revelaron un aumento de linfocitos T a partir de las 48 horas post-infección (p.i.), cuyos niveles se mantuvieron elevados hasta los 21 días p.i. El número de células fagocíticas (macrófagos) aumentó a partir de las 72 horas p.i., alcanzando sus valores más elevados a los 7 días p.i., coincidiendo con la apertura y el drenaje de los abscesos. Las células plasmáticas manifestaron un primer aumento a las 48 horas p.i., y un posterior incremento progresivo entre los 7 y 21 días p.i. Estos hallazgos describen la evolución de un absceso intradérmico en un modelo de infección en piel de conejo, estableciendo la interacción entre el sistema inmunitario del hospedador y el agente patógeno, y confirmando la importancia de los mecanismos de defensa innatos del hospedador frente a las infecciones producidas por *S. aureus*.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, absceso, inmunidad innata, infección experimental.

Abstract

Staphylococcus aureus is a bacterium with remarkable interest from a sanitary point of view in commercial rabbitries because it affects rabbits of all ages and produces different types of suppurative lesions. An experimental infection was designed in order to study the local immune response developed in the animals after the intradermal inoculation using the most widespread strain of *S. aureus* (ST121) isolated from farm. One hundred per cent of the animals infected with the strain ST121 developed lesions. The results of the leukocyte populations analyzed by immunohistochemical staining revealed an increase of T lymphocytes after 48 hours post infection (p.i.), whose levels remained elevated up to 21 days after infection. The number of phagocytic cells (macrophages) increased after 72 hours post-infection, reaching their highest values at 7 days p.i., coinciding with the opening and drainage of abscesses. Plasma cells showed a first increase at 48 hours p.i., and a subsequent progressive increase between 7 and 21 days p.i. These findings describe the evolution of an intradermal abscess in a rabbit skin infection model, establishing the interaction between the host immune system and the pathogen, and confirming the importance of innate host defense mechanisms against infections produced by *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, abscess, innate immunity, experimental infection.

Introducción

Staphylococcus aureus es una de las especies bacterianas considerada de mayor interés sanitario tanto para humanos como para animales. En cunicultura comercial esta bacteria puede afectar a conejos de todas las edades produciendo diferentes lesiones: dermatitis supurativa, mastitis, abscesos multisistémicos o pododermatitis (Segura *et al.*, 2007; Corpa *et al.*, 2009). La cepa de *S. aureus* más extendida en las explotaciones cunícolas pertenece al clon ST121 (Vancraeynest *et al.*, 2006; Viana *et al.*, 2007; Viana *et al.*, 2011).

El éxito de *S. aureus* como patógeno está relacionado con su capacidad de adaptarse a diversos ambientes y de producir una gran variedad de factores de virulencia, que juegan un papel importante en todos los niveles de las interacciones hospedador-patógeno, y permiten a las bacterias eludir la inmunidad innata y adaptativa del hospedador. Cuando las bacterias invaden un tejido son reconocidas por el sistema inmunitario innato, que inicia la cascada de señalización para promover el reclutamiento de células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) al lugar de la infección y facilitan la formación del absceso. Una característica notable de los abscesos producidos por *S. aureus* es la masiva infiltración de células inmunitarias en respuesta a la destrucción celular y a las señales proinflamatorias, dando lugar a la licuefacción del tejido que finalmente es drenado, momento que se considera un signo clínico de curación de la lesión (Krishna y Miller, 2012; Kobayashi et al., 2015; Malachowa et al., 2015).

La respuesta inmunitaria que manifiestan los conejos frente a las infecciones por *S. aureus* no está del todo descrita. Nuestro grupo de investigación con anterioridad describió la existencia de diferencias en la respuesta inmunitaria producida por las dos cepas aisladas con mayor frecuencia de casos de mastitis naturales (ST121 y ST96) (Guerrero et al., 2015). Por ello, en este estudio se plantea la inducción de una infección experimental en piel con la cepa de *S. aureus* más extendida en las explotaciones cunícolas (ST121), con el objetivo de estudiar la evolución de la respuesta inmunitaria local (estudiando las células tisulares), permitiendo así profundizar en el conocimiento de la patogenia de las estafilococias cunícolas, y comprender mejor los mecanismos de interacción entre el patógeno y el hospedador.

Material y métodos

Cepas y animales empleados

Para llevar a cabo las infecciones experimentales se empleó una cepa de *S. aureus* perteneciente al clon ST121 y se utilizaron 90 conejos (*Oryctolagus cuniculus*) de dos meses de edad.

Infección experimental en piel

El modelo de infección experimental se basó en protocolos de infecciones descritas con anterioridad (Kennedy et al., 2010; Li et al., 2010). La carga bacteriana empleada fue de 300 unidades formadoras de colonias en 100 µL de PBS ("Phosphate Buffer Saline"). En cada conejo se llevaron a cabo dos puntos de inoculación (en la región lumbar, a ambos lados del raquis) intradérmicamente con una aguja hipodérmica (25G). La zona de inoculación fue previamente rasurada.

Examen macroscópico y toma de muestras

Durante 28 días post-inoculación (p.i.) se realizó un seguimiento de la evolución de las lesiones en la piel, anotando sus medidas y la presencia de dermonecrosis. Diez animales fueron sacrificados a las 0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días p.i., respectivamente. De cada animal se tomó una muestra de tejido lesionado para llevar a cabo estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos.

Estudios histológicos e inmunohistoquímicos

Las muestras de tejido se fijaron en formol tamponado al 10%, y se procesaron de manera rutinaria, tiñéndose mediante las técnicas de hematoxilina-eosina para proceder a su estudio microscópico. Para realizar el estudio de la respuesta inmunitaria celular a nivel local mediante técnicas de inmunohistoquímica se emplearon los anticuerpos recogidos en la **Tabla 1**. El recuento de células positivas se llevó a cabo utilizando el análisis de imagen

Tabla 1. Anticuerpos primarios usados en el estudio.

Anticuerpos	Células	Compañía
Mouse anti-Rabbit Light Chain	Células plasmáticas	Millipore
Mouse anti-Human CD79α	Linfocitos B	AbD Serotec
Mouse anti-Canine CD3	Linfocitos T	UC Davis
Mouse anti-Rabbit RAM11	Macrófagos	Dako

NIS-Elements D 2.30 (Nikon), realizando un recuento de veinte campos a 400X seleccionados aleatoriamente bordeando el área de lesión, representando un área total de 1,6 mm².

Análisis estadístico

Los datos de los recuentos de las poblaciones leucocitarias en los distintos tiempos fueron analizados utilizando la prueba t de Student. Se consideró significativo un valor de P inferior a 0,05.

Resultados y discusión

Tras ser inoculados con la cepa ST121, todos los animales desarrollaron lesiones en la piel localizadas en el punto de inoculación a las 24 horas p.i. Las lesiones de la piel se caracterizaron por presentar pápulas eritematosas de tamaño variable, que a nivel microscópico se correspondieron sobre todo con un incremento del número de células inflamatorias (heterófilos) e hiperemia. A las 48 horas p.i. estas pápulas se incrementaron de tamaño (2,5 cm de diámetro) y a nivel histológico los heterófilos comenzaron a agruparse formando abscesos. A partir de las 72 horas p.i. continuó el incremento de tamaño de los nódulos, llegando al máximo tamaño (3 cm de diámetro), observándose características de maduración en los abscesos, como el incremento de la cápsula fibrosa y el tejido de granulación. La dermonecrosis apareció a partir de las 72 horas p.i., manifestándose en todos los animales a partir del 7º día p.i., con el consiguiente drenaje del contenido purulento y la recuperación progresiva de las lesiones hasta los 28 días p.i., donde a nivel histológico se correspondió con la reepitelización de la zona de la lesión y la disminución progresiva de las células inflamatorias.

Los resultados de la respuesta inmunitaria local obtenidos mediante inmunohistoquímica revelaron que los mayores recuentos correspondieron a los linfocitos T CD3⁺ y células plasmáticas, seguidas de los macrófagos RAM11⁺. Los linfocitos T CD3⁺ se localizaron principalmente de forma difusa en el tejido conjuntivo próximo a las zonas de lesión y manifestaron un aumento significativo (p<0,05) en su número a partir de las 48 horas p.i., manteniéndose elevados hasta los 21 días p.i., tiempo en el que alcanzaron su máximo valor (18,8±10,23 células/mm²), para disminuir de nuevo a los 28 días p.i. (Figura 1). Con respecto a la presencia de células plasmáticas, experimentaron un aumento significativo (p<0,05) en su número a las 48 horas p.i. y otro incremento progresivo a partir del 7º día p.i. que se mantuvo hasta los 21 días p.i., momento en el que alcanzaron su máximo valor (13,9±14,12 células/mm²) (Figura 2). En cuanto al comportamiento de los macrófagos RAM11⁺, localizados alrededor de los focos de necrosis, comenzaron a incrementarse a partir de las 72 horas p.i., coincidiendo con los primeros signos de cronicidad, alcanzando su máximo valor (10,2±3,00 células/mm²), a los 7 días p.i. (Figura 3). Por su parte, las variaciones en el número de linfocitos B CD79⁺ durante los 28 días del periodo experimental no fueron significativas. A los 28 días p.i. todas las células analizadas experimentaron un descenso, sin mostrar diferencias respecto a los controles, coincidiendo con el momento de recuperación de las lesiones.

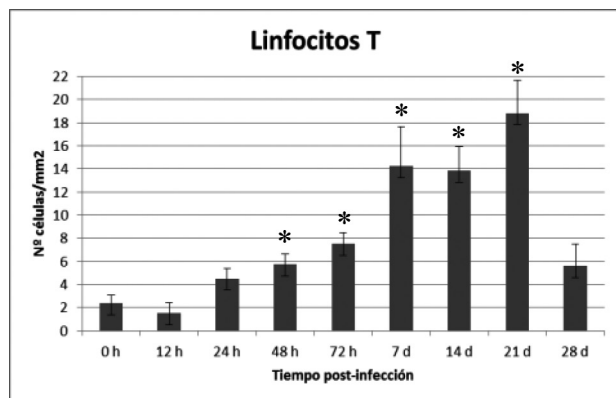


Figura 1. Variación del número de linfocitos T locales. *P<0,05 respecto al día 0.

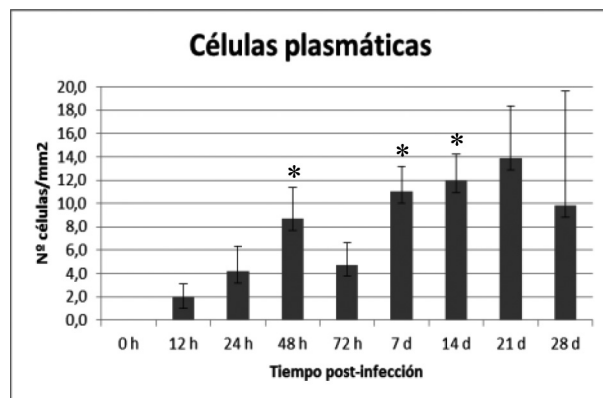


Figura 2. Variación del número de células plasmáticas locales. *P<0,05 respecto al día 0.

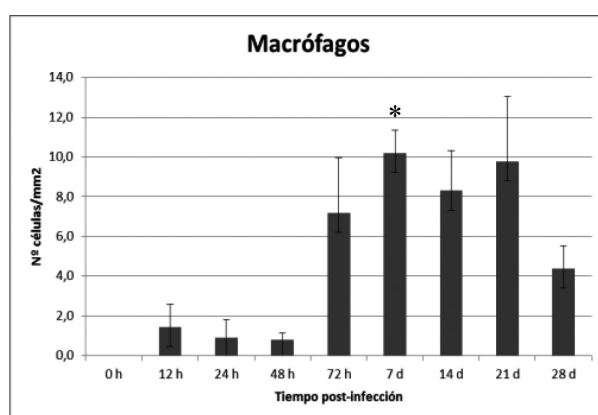


Figura 3. Variación del número de macrófagos locales.
* $P < 0,05$ respecto al día 0.

Los hallazgos histopatológicos tanto a nivel macroscópico como microscópico explican la evolución de las lesiones, guardando relación con resultados previos sobre la respuesta inmunitaria celular periférica (Muñoz-Silvestre *et al.*, 2015). En una fase inicial aguda (12-48 horas p.i.) solo los granulocitos aumentan significativamente ($p < 0,05$), coincidiendo con los primeros signos clínicos de inflamación (eritema), y manifiestan una respuesta crónica mediante otro incremento progresivo en su número a partir del 7º día p.i. hasta los 14 días p.i., periodo que se caracteriza por el inicio de la recuperación de la lesión tras el drenaje del contenido purulento. Por otra parte, coincidiendo con el inicio de la respuesta inflamatoria los monocitos sanguíneos aumentan de manera significativa ($p < 0,05$) a partir del 2º día p.i., siendo este aumento progresivo hasta los 14 días p.i. Este incremento de los monocitos sanguíneos está relacionado con el aumento del número de macrófagos alrededor de los focos de lesión, lo cual sería indicativo de que las lesiones evolucionan hacia la recuperación. En cuanto a los niveles generales de linfocitos sanguíneos, éstos aumentan significativamente ($p < 0,05$) desde las 72 horas p.i. hasta los 14 días p.i., coincidiendo con el aumento del número de linfocitos T en el tejido lesionado en los mismos tiempos.

En este trabajo se ha estudiado la respuesta local del sistema inmunitario del conejo frente a un modelo de infección bacteriana en piel, y al unificar estos resultados con estudio anteriores, se pone de manifiesto que el desarrollo y la evolución de las lesiones en piel producidas por *S. aureus* no sólo se debe a la multiplicación in situ de las bacterias, sino también al incremento del número de leucocitos sanguíneos y a la afluencia de células inflamatorias a partir de las 48-72 h.p.i., demostrando así que la respuesta inmunitaria del hospedador es fundamental frente a las infecciones producidas por *S. aureus*.

Agradecimientos

El presente estudio ha sido financiado gracias a sendos proyectos de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2014-53405-C2-2-P) y la Generalitat Valenciana (Grupos de Investigación Emergentes GV/2015/090).

Bibliografía

- Corpa J.M., Hermans K., Haesebrouck F. 2009. Main Pathologies associated with *Staphylococcus aureus* infections in rabbits: a review. *World Rabbit Science*, 17: 1-11.
- Guerrero I., Ferrián S., Penadés M., García-Quirós A., Pascual J.J., Selva L., Viana D., Corpa J.M. 2015. Host responses associated with chronic staphylococcal mastitis in rabbits. *The Veterinary Journal*, 204(3): 338-344.
- Kennedy A.D., Bubeck Wardenburg J., Gardner D.J., Long D., Whitney A.R., Braughton K.R., Schneewind O., DeLeo F.R. 2010. Targeting of alpha-hemolysin by active or passive immunization decreases severity of USA300 skin infection in a mouse model. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(7): 1050-1058.
- Kobayashi S.D., Malachowa N., DeLeo F.R. 2015. Infectious disease theme issue: Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. *The American Journal of Pathology*, doi: 10.1016/j.ajpath.2014.11.030.

- Krishna S., Miller L.S. 2012. *Host-pathogen interactions between the skin and Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Microbiology*, 15(1): 28-35.
- Li M., Cheung G.Y., Hu J., Wang D., Joo H.S., DeLeo F.R., Otto M. 2010. *Comparative analysis of virulence and toxin expression of global Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus strains*. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(12): 1866-1876.
- Malachowa N., Kobayashi S.D., Sturdevant D.E., Scott D.P., DeLeo F.R. 2015. *Insights into the Staphylococcus aureus-Host interface: Global changes in host and pathogen gene expression in a rabbit skin infection model*. *Plos One*, 10:e0117713.
- Muñoz-Silvestre A., Penadés M., García-Quirós A., Selva L., Viana D., Corpa J.M. 2015. *¿Qué armas inmunológicas presentan los conejos frente a las infecciones por Staphylococcus aureus? En: 40 Symposium de Cunicultura. Santiago de Compostela, pp. 174-177 España.*
- Segura P., Martínez J., Peris B., Selva L., Viana D., Penades J.R., Corpa J.M. 2007. *Staphylococcal infections in rabbit does on two industrial farms*. *Veterinary Record*, 160: 869-872.
- Vancraeynest D., Haesebrouck F., Deplano A., Denis O., Godard C., Wildemauwe C., Hermans K. 2006. *International dissemination of a high virulence rabbit Staphylococcus aureus clone*. *Journal of Veterinary Medicine*, 53(9): 418-422.
- Viana D., Selva L., Callanan J.J., Guerrero I., Ferrian S., Corpa J.M. 2011. *Strains of Staphylococcus aureus and pathology associated with chronic suppurative mastitis in rabbits*. *The Veterinary Journal*, 190(3):403-407.
- Viana D., Selva L., Segura P., Penades J.R. Corpa J.M. 2007. *Genotypic characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from rabbit lesions*. *Veterinary Microbiology*, 121: 288-298.

Estado actual de las cepas de *Staphylococcus aureus* en granjas cunícolas

Current status of Staphylococcus aureus strains in rabbit farms

Pérez-Fuentes S.* , Muñoz-Silvestre A., Moreno-Grúa E., Viana D., Selva L., Corpa J.M.

Instituto CEU de Ciencias Biomédicas (Grupo de Patología y Sanidad Animal). Facultad de Veterinaria. PASAPTA. Universidad CEU Cardenal Herrera. C/ Tirant lo Blanc, 7. 46115 Alfara del Patriarca (Valencia), España

* Dirección de contacto: sara.perezfuentes@uchceu.es

Resumen

Staphylococcus aureus es una bacteria ampliamente distribuida en cunicultura que provoca sobre todo mastitis, pododermatitis y abscesos en conejos comerciales. El clon más prevalente es el ST121, con genotipo A1 II1 δ, seguido del ST96. Los objetivos de este estudio fueron: (1) caracterizar las cepas de *S. aureus* involucradas en brotes y casos crónicos de estafilococias desde el año 2014 y (2) conocer la distribución geográfica de los distintos clones de *S. aureus* en los últimos años. Para ello se muestrearon 34 granjas, de las cuales se aislaron 124 muestras positivas a *S. aureus*. Se observó que en el 66,7% de las granjas con muestreos en diversos años se mantuvo el mismo genotipo, y que las cepas, aparentemente, no se distribuyeron de forma uniforme. Se ha identificado dos nuevos clones (ST3761 y ST3764) y un nuevo genotipo (B1 I1 λ) no detectados hasta la fecha.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, brote, mutación, distribución geográfica.

Abstract

Staphylococcus aureus is a bacterium widely distributed in rabbitries causing mastitis, pododermatitis and abscesses. The most prevalent clone is ST121, with A1 II1 δ genotype, followed by ST96. The aims of this study were: (1) to characterize strains of *S. aureus* involved in outbreaks and chronic cases since year 2014; (2) to know the geographical distribution of the different *S. aureus* clones in recent years. For this purpose, 34 farms were sampled, from which 124 samples were positive for *S. aureus*. The 66.7% of the farms with samplings in several years maintained the same genotype, and the strains apparently were not homogeneously distributed. Two new clones (ST3761 and ST3764) and a new genotype (B1 I1 λ), not previously detected have been identified.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, outbreak, mutation, geographical distribution.

Introducción

Staphylococcus aureus es una bacteria que afecta a numerosas especies animales y a humanos. Coloniza la piel, uñas y fosas nasales, pero necesita factores predisponentes (inmunosupresión, heridas, otras enfermedades...) para multiplicarse y generar lesiones, generalmente de carácter supurativo (Corpa et al., 2009). Se transmite por contacto directo o mediante secreciones o utensilios.

En cunicultura, *S. aureus*, provoca principalmente mastitis y pododermatitis en hembras reproductoras y pio-dermas en gazapos, aunque también son comunes las otitis y las rinitis (Corpa et al., 2009). También es importante el papel que juegan los portadores nasales asintomáticos. La alta prevalencia de portadores podría aumentar la incidencia de estafilococias en las granjas (Selva et al., 2015).

Existen numerosas cepas de *S. aureus* que pueden caracterizarse mediante diferentes técnicas. La técnica MLST (Multilocus Sequence Typing) es la más utilizada hoy en día. Esta técnica compara 7 genes (*arc*, *aro*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi* y *yqi*) altamente conservados en la bacteria, asignando el mismo número "ST" a cepas pertenecientes al mismo origen clonal y números diferentes cuando sufren mutaciones y se van distanciando filogenéticamente. También se usa el tipado molecular, basado en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción

(RFLP) de los genes *coa*, *spa* y *clfB*. Con esta técnica se obtiene el genotipo, una combinación de letras latinas, números y letras griegas, como por ejemplo, A1 II1 δ. Estas dos técnicas (MLST y RFLP) se complementan y son necesarias para hacer una óptima identificación de cada cepa de *S. aureus*.

El clon de *S. aureus* más frecuente en cunicultura es el ST121, seguido del clon ST96, con una prevalencia mucho más baja. A su vez, el genotipo más habitual es el A1 II1 δ, que se incluye dentro del clon ST121 (Viana, 2009; Pérez-Fuentes et al., 2016).

En los últimos años, tanto veterinarios como ganaderos han puesto de manifiesto su preocupación por la aparición de brotes de estafilococias especialmente virulentos. Por esta razón, los objetivos de este trabajo fueron: (1) caracterizar las cepas de *S. aureus* involucradas en brotes y casos crónicos de estafilococias desde el año 2014 y (2) conocer la distribución geográfica de los distintos clones de *S. aureus* en los últimos años.

Material y métodos

En este trabajo se han tomado 148 muestras, recogidas entre 2014 y 2017, de 34 granjas que presentaban brotes graves o casos crónicos asociados a infecciones por *Staphylococcus aureus*, situadas en el Norte y Este de España.

Las muestras se tomaron mediante una torunda estéril de diferentes lesiones y de fosas nasales, tanto de animales clínicamente enfermos como sanos. Se sembraron en placas de agar sangre y se incubaron a 37°C durante 24h. Posteriormente se sembraron las colonias compatibles con *S. aureus* en caldo de soja tríptico (TSB) y se incubaron 24h a 37°C con agitación.

Estos cultivos se guardaron en stock a -80°C y también se extrajo el ADN mediante el kit Genelute Bacterial Genomic ADN (SIGMA) siguiendo el protocolo del fabricante, lisando previamente la pared celular mediante 12,5 µg/ml de lisostafina durante una hora a 37°C. Con este ADN se realizaron PCRs de *coa*, *spa* y *clfB* (RFLP) y el tipado por MLST. El tamaño del producto de PCR (5µ de alícuota) se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% y los geles se revelaron con ImageQuant™ LAS 4000.

Los productos de PCR de *coa* y *spa* se purificaron con el kit GenElute™ PCR Clean-Up Kit (SIGMA), se digirieron con la enzima HinóI en baño húmedo a 37°C 1,5 horas y se analizaron los resultados por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los geles se revelaron con ImageQuant™ LAS 4000.

Por otra parte, los productos de PCR para el tipado por MLST fueron purificados y secuenciados por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de la Universitat Politècnica de Valencia. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos "MLST database" (www.mlst.net).

Resultados y discusión

De las 148 muestras, 124 (83,8%) fueron positivas a *S. aureus*. Se aislaron 21 genotipos diferentes, siendo el más común el A1 II1 δ con 24 aislados (19,35% del total de muestras positivas), y 9 ST diferentes, siendo el clon ST121 el más común, con 36 muestras (29%) (Tablas 1 y 2).

En el 2014 se identificó por primera vez un nuevo clon, el ST3764. Este nuevo clon difiere del ST121 en un nucleótido del gen *gfp*, dando lugar a un nuevo alelo. Hasta la fecha se ha aislado de 19 muestras procedentes de 7 granjas diferentes del norte de España (A Coruña, León y Palencia) (Figura 1). Su genotipo es A1 II1 κ y se ha aislado de lesiones variadas: abscesos, mastitis, pododermatitis y también rinitis, otitis, neumonías y conjuntivitis. En otras zonas geográficas muestreadas este genotipo no posee la mutación y, por lo tanto, sigue correspondiendo al clon ST121. No obstante, hay que señalar que en la zona donde se ha aislado este clon no se tenían muestras previamente al 2014, por tanto no se puede saber si ya estaba presente y aún no se había extendido o, por el contrario, es una mutación reciente de ST121. Por este motivo, se debe confirmar con más muestreos en esa zona geográfica para comprobar si se está extendiendo a otras provincias. Además se aisló otro clon nuevo de 3 muestras en el 2014, el ST3761, que se diferencia del ST121 en el gen *pta*, es decir, hay un cambio de alelo. Según la base de datos MLST, el alelo *pta* de este clon está presente en aislados de mastitis caprina en Italia.

En este estudio también se ha aislado un nuevo genotipo (B1 II1 λ), que presenta una mutación en el gen *clfB* y que pertenece al clon ST96. Se identificó, por primera vez, en el año 2016 y, hasta el momento, sólo se ha detectado

Tabla 1. Relación de genotipos aislados.

Genotipo	Cepas	Porcentaje
A1 II1 δ	24	19,35
A1 II1 κ	22	17,74
B1 I1 α	10	8,06
B1 IV1 α	8	6,45
A1 III1 δ	7	5,65
B1 I1 λ	5	4,03
A1 II1 ε	4	3,23
B1 IV2 α	4	3,23
D2 V1 β	3	2,42
D2 V1 δ	3	2,42
B1 I1 β	2	1,61
B1 I1 κ	2	1,61
B1 II1 α	2	1,61
B3 IV1 γ	2	1,61
C2 V1 θ	2	1,61
A1 II1 β	1	0,81
A1 II1 η	1	0,81
B1 IV2 γ	1	0,81
B3 I1 θ	1	0,81
B3 I1 ι	1	0,81
D2 V1 γ	1	0,81
Desconocido	18	14,52
Total	124	100

Tabla 2. Relación de ST aislados.

MLST	Cepas	Porcentaje
121	36	29,03
96	32	25,81
3764	19	15,32
1	10	8,06
3761	3	2,42
5	2	1,61
146	2	1,61
398	2	1,61
2855	2	1,61
Desconocido	16	12,90
Total	124	100



Figura 1. Mapa de España con los clones aislados, por provincias, desde 2014 a 2017.

en una granja. Esta cepa se ha relacionado con lesiones atípicas y graves, como pericarditis, metritis y neumonías.

En 10 granjas de las 34 muestreadas (29,4%) se aisló el genotipo más abundante, el A1 II1 δ. Debido al reducido número de muestras en algunas granjas, no puede descartarse que este genotipo no esté presente. No obstante, este resultado es similar al descrito por Viana *et al.* (2007), donde el genotipo A1 II1 δ se aisló en el 20% de las explotaciones.

En 10 de las 15 explotaciones (66,7%) con más de un muestreo, vuelve a aparecer el mismo genotipo con el tiempo. En algunos casos, la misma cepa se mantiene hasta 15 años. Esto concuerda con la persistencia de problemas crónicos de estafilococias en algunas granjas (Adlam *et al.*, 1976). De hecho, en una de las granjas muestreadas, en la que se identificó la cepa A1 II1 δ, se sustituyó la línea cunícola, sin vaciar completamente la nave, y en un muestreo posterior se volvió a aislar el mismo genotipo.

Estos resultados coinciden con estudios previos (Viana *et al.*, 2007) donde se describía que el genotipo más prevalente era el A1 II1 δ, aunque con un porcentaje muy superior (70,76%) a nuestros resultados. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la aparición y diseminación del clon ST3764, cuyo genotipo es A1 II1 κ, ya que ha sido aislado a partir del 2014 y el anterior estudio analiza muestras hasta el 2006.

En conclusión, (1) se han aislado dos clones nuevos (ST3761 y ST3764) y un genotipo (B1 II1 λ), que (2) perduran en las granjas a lo largo del tiempo y, (3) aparentemente, el clon ST3764 está localizado únicamente en el noroeste de España y el ST121 por el este, aunque hace falta incrementar la toma de muestras y ampliarla a más provincias para confirmar este dato.

Actualmente estamos investigando la repercusión que estas nuevas cepas pueden tener en cunicultura, mediante el estudio del efecto de las mutaciones detectadas en su virulencia, sobre todo de las cepas ST3764 y B1 II1 λ.

Agradecimientos

El presente estudio ha sido financiado gracias a sendos proyectos de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2014-53405-C2-2-P) y la Generalitat Valenciana (Grupos de Investigación Emergentes GV/2015/090). Así mismo, quisiéramos dar las gracias a todos los veterinarios y ganaderos que han colaborado en la toma y remisión de las muestras.

Bibliografía

- Adlam C., Thorley C.M., Ward P.D., Collins M., Lucken R.N., Knight P.A. 1976. Natural and experimental staphylococcal mastitis in rabbits. *Journal of Comparative Pathology*, 86: 581-593.
- Corpa J.M., Hermans K., Haesebrouck F. 2009. Main pathologies associated with *Staphylococcus aureus* in rabbits: a review. *World Rabbit Science*, 17: 115-125.
- Pérez-Fuentes S., Muñoz-Silvestre A., Viana D., Corpa J.M., Selva L. 2016. Importancia del tipado de *Staphylococcus aureus*: origen, virulencia y evolución de las cepas. En: 41 Symposium de Cunicultura. Hondarribia, pp. 117-120 España.
- Selva L., Viana D., Corpa J.M. 2015. *Staphylococcus aureus* nasal carriage could be a risk for development of clinical infections in rabbits. *World Rabbit Science*, 23: 181-184.
- Viana D., Selva L., Segura P., Penadés J.R., Corpa J.M. 2007. Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbit lesions. *Veterinary Microbiology*, 121: 288-298.
- Viana D. 2009. Estafilococia en conejos: relación entre genotipos, virulencia y lesiones (Tesis Doctoral). Moncada, Valencia: Universidad CEU Cardenal Herrera. Facultad de Veterinaria.

Evolución de la virulencia de *Staphylococcus aureus* en los últimos 15 años

Evolution of virulence of Staphylococcus aureus in the last 15 years

Moreno-Grúa E.,* Muñoz-Silvestre A., Pérez-Fuentes S., Corpa J.M., Viana D., Selva L.

Instituto CEU de Ciencias Biomédicas (Grupo de Patología y Sanidad Animal). Facultad de Veterinaria. PASAPTA. Universidad CEU Cardenal Herrera. C/ Tirant lo Blanc, 7. 46115 Alfara del Patriarca (Valencia), España.

* Dirección de contacto: elena.moreno3@uch.ceu.es

Resumen

Los clones de *Staphylococcus aureus* más comúnmente aislados de conejos tanto enfermos como sanos son el ST121 y el ST96. Diferentes estudios han evidenciado la escasa capacidad del clon ST96 para provocar infección en el conejo. Sin embargo, en los últimos años, se ha observado un aumento en la prevalencia de los aislados ST96 de lesiones de conejos. El presente trabajo propone la hipótesis de un cambio en la virulencia de los clones ST96 y, para demostrarlo, se realiza un estudio retrospectivo comparando cepas ST96 y ST121 antiguas y recientes. Para comparar la virulencia de ambos clones, se realizan pruebas *in vitro* de cada una de las cepas seleccionadas.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, ST96, virulencia, resistencia a antibióticos.

Abstract

The most commonly isolated *Staphylococcus aureus* clones from diseased and healthy rabbits are ST121 and ST96. Different studies have shown the limited ability of the ST96 clone to cause infection in the rabbit. However, in recent years an increase in the prevalence of ST96 isolates from rabbit lesions has been observed. The present work proposes the hypothesis of a change in virulence of ST96 clones, and to prove this, a retrospective study has been carried out comparing both old and recent ST96 and ST121 strains. To compare the virulence of both clones, it is intended to perform *in vitro* tests of each of the selected strains.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, ST96, virulence, resistance to antibiotics.

Introducción

Staphylococcus aureus es una bacteria ampliamente distribuida que afecta tanto a humanos como animales. En conejos las principales patologías asociadas a esta bacteria son: mastitis, abscesos y pododermatitis (Corpa *et al.*, 2009). Se han desarrollado diferentes técnicas de tipado molecular con el fin de conocer los clones de *S. aureus* predominantes. Uno de los métodos más utilizados es el tipado por MLST (Multilocus Sequence Typing) (Enright *et al.*, 2000). Estudios previos demuestran la existencia de clones ampliamente distribuidos y adaptados a producir infecciones en conejo, siendo el más frecuente el ST121, seguido del ST96, con mucha menor prevalencia (Viana *et al.*, 2011). Los clones ST96 carecen de ciertas enterotoxinas que las cepas tipo ST121 sí poseen (Viana *et al.*, 2015). Estas enterotoxinas tienen actividad superantigénica, pueden activar la población de células T y alteran la liberación de citoquinas para evadir el sistema inmune del hospedador (Projan y Novick, 1997).

En los últimos años se ha observado un aumento de las lesiones producidas por clones ST96, lo que podría indicar un aumento en la virulencia de dicho clon. Por ello, el objetivo de este estudio es comparar clones ST96 y ST121 de *S. aureus* aislados de conejos comerciales en los últimos 15 años.

Material y métodos

Cepas empleadas

Se seleccionaron 18 clones de *S. aureus*: 13 clones ST96, 5 clones ST121 (**Tabla 1**). Se compararon 13 cepas (11 ST96 y 2 ST121) aisladas recientemente (entre 2014 y 2017) con 5 cepas (2 ST96 y 3 ST121) aisladas entre 2001 y 2007. Estas últimas son cepas de referencia de nuestro laboratorio y se encuentran bien caracterizadas y estudiadas.

Tabla 1. Clones ST96 y ST121 seleccionados para este estudio.

Cepa	ST	Año	Observaciones
CEU22	121	2001	Cepa tipo
DL40	121	2002	Mastitis
CEU268	121	2007	Nariz sana
CEU231	96	2003	Mastitis
CEU238	96	2001	Mastitis
CEU581	96	2014	Aislado nasal
CEU713	96	2014	Mastitis
CEU796	96	2015	Dermatitis
CEU842	96	2016	Mastitis
CEU852	96	2016	Pododermatitis
CEU853	96	2016	Pododermatitis
CEU862	96	2016	Dermatitis
CEU868	96	2016	Metritis
CEU886	96	2016	Mastitis
CEU887	96	2016	Pododermatitis
CEU890	121	2016	Osteomielitis
CEU903	121	2016	Mastitis
CEU908	96	2017	Pododermatitis

Prueba de hemólisis

Se realizaron estrías con una colonia aislada de la cepa RN4220 en el centro de placas de agar Columbia con 5% de sangre de oveja. A continuación se realizaron dos estrías perpendiculares de una colonia aislada de cada clon de los 22 seleccionados, sin que llegaran a tocar la estría de RN4220 (Traber *et al.*, 2008). Por último, se dejó crecer 24h a 37°C, analizándose posteriormente el tipo de hemólisis.

Prueba de supervivencia en sangre

Primero se elaboró un inóculo a una concentración de 4×10^5 ufc/mL y se enfrentaron 25µL de este inóculo a 75µL de sangre heparinizada extraída de conejo. A continuación se incubó en agitación constante y se sembró en TSA a las 0h, 1h, 2h y 3h para contar las ufc/mL. Por último, se comprobó la concentración del inóculo mediante la siembra en TSA. También se comprobó que la sangre no estaba contaminada con bacterias, mediante su siembra en TSA. En cada réplica se empleó una cepa control (CEU 568 $\Delta dltB$), realizándose tres réplicas de cada clon.

Antibiograma

Se elaboró un inóculo a una concentración aproximada de 10^6 ufc/mL, para lo cual se midió la absorbancia de un cultivo crecido durante 12h de una colonia aislada de cada cepa, y se realizaron diluciones hasta alcanzar la concentración deseada. Seguidamente, con un hisopo se sembró en superficie de manera uniforme una placa de agar Muller Hinton. A continuación, se depositaron los discos impregnados con el antibiótico de elección

sobre la placa, y se incubaron en estufa a 37°C durante 20h. Por último se midió el halo de inhibición y se clasificó cada cepa como S (Sensible), I (Intermedio) o R (Resistente) (Thompson y Brown, 2014). Los antibióticos empleados fueron: Gentamicina (GM), Cloranfenicol (C), Eritromicina (E), Neomicina (N), Doxiciclina (D), Penicilina (P), Enrofloxacino (ENO), Tetraciclina (TE), Amoxicilina + Ac. Clavulánico (AMC), Estreptomocina (S) y Sulfamethoxazol + Trimethoprim (SXT).

Resultados y discusión

Prueba de hemólisis

Esta prueba permitió conocer las hemolisinas que producían las diferentes cepas, teniendo en cuenta que la cepa RN4220 sólo produce hemolisina β . El 100% de los clones ST121 aislados en ambos periodos (2001-2007 y 2014-2017) presentaban α - β - δ -hemolisinas. Por el contrario, mientras que los clones ST96 aislados entre 2001 y 2007 presentaron sólo δ -hemolisina (la hemolisina típica de este clon), las cepas ST96 aisladas en 2014-2017, además de δ -hemolisina presentaron también β -hemolisina y las tres hemolisinas (α - β y δ) típicas de los clones ST121.

Prueba de supervivencia en sangre

La respuesta inmunitaria innata resulta fundamental para evitar la infección por *S. aureus*. Mediante esta prueba se valoró la capacidad de las bacterias para evadir la respuesta innata del hospedador cuando se cultivan en sangre entera de conejo, una de las muchas características que influyen en la patogenicidad de cada cepa. Todos los clones sobrevivieron y mostraron un comportamiento similar, mostrando un crecimiento exponencial en el tiempo. No se observaron, por lo tanto, diferencias evidentes en la supervivencia en sangre entre los clones aislados en los diferentes periodos (2001-2007 frente a 2014-2017). Únicamente se observaron las diferencias propias que hay entre los clones ST121 y ST96.

Antibiograma

Mediante esta prueba se pretendió conocer las resistencias de cada cepa a los diferentes antibióticos. Las cepas de referencia, aisladas entre 2001 y 2007, no mostraron resistencia a ninguno de los antibióticos empleados. Sin embargo, se observaron resistencias a diversos antibióticos en las cepas aisladas entre 2014 y 2017. Los antibióticos frente a los que se observaron un mayor número de resistencias fueron: Eritromicina, Espiramicina, Tetraciclinas, Enrofloxacino, Estreptomocina y Gentamicina. El aumento de las resistencias de este microorganismo a un amplio rango de antibióticos (Chambers y DeLeo, 2009) complica el tratamiento de las infecciones estafilocócicas. Nuestros datos demuestran la inquietante aparición de resistencias frente a algunos de los antibióticos utilizados y confirma los fallos del empleo de los mismos en la lucha frente a *S. aureus*. Por ello, es necesario el empleo racional de estos fármacos (Ventola, 2015).

La clasificación clásica de Hermans *et al.* (1999) en base a la virulencia de los aislados de *S. aureus*, en cepas de alta y baja virulencia, fue confirmada en estudios posteriores, asociándose estas cepas de alta virulencia al clon ST121 (Vancraeynest *et al.*, 2006; Viana *et al.*, 2011). No hay estudios previos sobre la virulencia de los clones ST96 en conejos, aunque dada su distribución, procedencia y comportamiento experimental se consideraban como aislados de baja virulencia. A la vista de los resultados obtenidos, podría haberse producido un cambio en el comportamiento de las cepas ST96 a lo largo de los años (2003 vs. 2014 o 2016), que se pretende confirmar mediante una infección experimental in vivo en conejos comerciales.

Agradecimientos

El presente estudio ha sido financiado gracias a sendos proyectos de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2014-53405-C2-2-P) y la Generalitat Valenciana (Grupos de Investigación Emergentes GV/2015/090). Así mismo, quisiéramos dar las gracias a todos los veterinarios y ganaderos que han colaborado en la toma y remisión de las muestras.

Bibliografía

Chambers H.F., DeLeo F.R. 2009. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. *Nature reviews Microbiology*, 7: 629-641.

- Corpa J.M., Hermans K., Haesebrouck F. 2009. Main pathologies associated with *Staphylococcus aureus* in rabbits: a review. *World Rabbit Science*, 17: 115-125.
- Enright M.C., Day N.P., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 1008-1015.
- Hermans K., De Herdt P., Devriese L.A., Hendrickx W., Godard C., Haesebrouck F. 1999. Colonisation of rabbits with *Staphylococcus aureus* in flocks with and without chronic staphylococcosis. *Veterinary Microbiology*, 67: 37-46.
- Projan S.J., Novick R.P. 1997. The molecular basis of pathogenesis, En: Crossley, K.B., Archer, G.L. (ed). *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York.
- Thompson T., Brown P.D. 2014. Comparison of antibiotic resistance, virulence gene profiles, and pathogenicity of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Pathogens Global Health*, 108: 283-291.
- Traber K.E., Lee E., Benson S., Corrigan R., Cantera M., Shopsin B., Novick R.P. 2008. *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology*, 154: 2265-2274.
- Vanraeynest D., Haesebrouck F., Deplano A., Denis O., Godard C., Wildemauwe C., Hermans K. 2006. International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone. *Journal of Veterinary Medicine*, 53: 502-502.
- Ventola C.L. 2015. *The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats*. *Pharmacy and Therapeutics*, 40: 277-283.
- Viana D., Selva L., Callanan J.J., Guerrero I., Ferran S., Corpa J.M. 2011. Strains of *Staphylococcus aureus* and pathology associated with chronic suppurative mastitis in rabbits. *The Veterinary Journal*, 190: 403-407.
- Viana D., Selva L., Penades M., Corpa J.M. 2015. Screening of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits. *World Rabbit Science*, 23: 185-195.

Detección mediante PCR-dúplex a tiempo real y aislamiento de virus RHDV2/b durante un brote de enteropatía mucoide

Real time duplex-PCR detection and isolation of infective RHDV2/b during a mucoid enteropathy outbreak

Mendoza M.¹, Calvete C.^{1*}, Comenge J.², Sarto M.P.¹, Jiménez de Bagüés M.P.¹, Calvo J.H.^{1,3}

¹ Dept. Sanidad y Producción Animal, Centro de Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), 50059 Zaragoza, España

² NANTA.SA. 28760 Tres Cantos, Madrid, España

³ ARAID, 50004 Zaragoza, España

*Dirección de contacto: ccalvete@aragon.es

Resumen

El presente trabajo describe la detección mediante PCR-dúplex a tiempo real de virus RHDV2/b en muestras de duodeno, bazo y timo de un conejo de cebo de 50 días de edad muerto durante un brote de enteropatía mucoide. El brote tuvo una duración de 31 días afectando a animales con edades comprendidas entre los 42 y los 72 días, produciendo 1113 bajas (17,5%) del total de animales en cebo. En ningún momento, a lo largo de la evolución del brote, se detectaron signos típicos de mortalidad por enfermedad hemorrágica (RHD). Para confirmar la infecciosidad del virus y utilizando un inóculo purificado preparado a partir de las muestras analizadas, se infectó por vía intramuscular a un conejo susceptible a la enfermedad el cual murió tras desarrollar un cuadro agudo de RHD. A partir de una muestra de hígado de este conejo infectado se procedió a caracterizar el virus implicado mediante la secuenciación del gen que codifica para la proteína VP60, confirmando su pertenencia a la variante RHDV2/b. Este hallazgo sugiere la posibilidad de que el virus RHDV2/b pueda circular de forma silente sin causar brotes aparentes de RHD.

Palabras clave: Enfermedad hemorrágica del conejo, Enteropatía mucoide, RHDV2/b, *Oryctolagus cuniculus*.

Abstract

This work describes the duplex real time PCR detection and isolation of infective RHDV2/b virus from duodenum, spleen and thymus from a 50 days old rabbit dead during a mucoid enteropathy outbreak in a Spanish commercial rabbitry. The outbreak lasted 31 days resulting in 17.5% of mortality (1113 individuals) in 42-72 days old rabbits. During the outbreak, no sign or lesion compatible with RHD was found. One 7-week-old specific minimal disease level rabbit was inoculated intramuscularly with an inoculum obtained from homogenized positive samples, dying after developing the acute form of rabbit haemorrhagic disease (RHD). Analysis of the VP60 gene nucleotide sequence confirmed that isolated virus was RHDV2/b. This finding suggests that RHDV2/b might persist and circulate in a silent way without causing RHD outbreaks.

Keywords: Rabbit haemorrhagic disease, Mucoid enteropathy, RHDV2, *Oryctolagus cuniculus*.

Introducción

En la actualidad, la enfermedad hemorrágica del conejo (RHD) y la enteropatía mucoide (EM) son dos de las principales causas de mortalidad en las granjas cunícolas de nuestro país (Rosell y de la Fuente, 2016). La RHD está causada por un calicivirus que suele cursar con formas agudas o subagudas de la enfermedad, las cuales producen la muerte de los animales a los pocos días tras la infección, con tasas de mortalidad que pueden ser muy variables, aunque casi siempre elevadas. Durante varias décadas, el control de la enfermedad se ha basado en el vaciado sanitario de las granjas afectadas y, sobre todo, en la instauración de programas de inmunización vacunal, mediante la utilización de vacunas comerciales de elevada eficacia. No obstante, desde la aparición de

la nueva variante vírica RHDV2/b en 2010 en Francia (Le Gall-Reculé *et al.*, 2011) y su expansión a la península Ibérica en 2011 (Dalton *et al.*, 2012) la importancia de esta enfermedad se ha incrementado de manera sustancial. Ello ha sido debido tanto al rápido desplazamiento (hasta su práctica desaparición) de las cepas clásicas del virus RHDV por la variante RHDV2/b, como a la considerable pérdida de eficacia de las vacunas existentes, en combinación con la limitada disponibilidad de vacunas específicas contra el RHDV2/b, las cuales no estuvieron disponibles (con autorización) hasta 2015 y comercializadas la primavera de 2016. Todo ello, además, se ha visto acompañado de una, todavía, incompleta caracterización de la epidemiología y patogenia de este nuevo virus.

La EM, por su parte, se asume como un proceso de origen multifactorial cuya etiología es todavía difusa. Se considera que el principal proceso implicado en el desarrollo de la enfermedad es un desequilibrio en la biota intestinal del conejo que favorece la proliferación de diferentes patógenos (Baeuerl *et al.*, 2014), si bien no está claro si los agentes desencadenantes son factores medioambientales o de manejo como el tipo de alimentación (Haligur *et al.*, 2009) o bien agentes de naturaleza infecciosa como virus (Licois *et al.*, 2005; Stenglein *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se describe la detección de virus RHDV2/b en muestras obtenidas durante un brote de EM acaecido en una granja industrial en la que no se detectaron signos aparentes de incidencia de RHD.

Material y métodos

Entre diciembre de 2015 y enero de 2016 se registró un brote de EM en una de las líneas de cebo de una granja de 1200 madres situada en la provincia de Zaragoza. En el historial de la explotación figura el haber sufrido un brote de RHD por RHDV2/b en la primavera de 2015 que fue controlado mediante vacunación, manteniendo desde entonces un programa de inmunización vacunal estándar en reproductores y reposición utilizando vacunas frente a cepas clásicas.

Los primeros casos de EM comenzaron afectando a animales de 42 días de edad, persistiendo durante los siguientes 31 días, momento en que los animales supervivientes fueron enviados a matadero con edades comprendidas entre los 64 y los 72 días. En total se produjeron 1113 bajas (17,5%) cuyo patrón de incidencia se caracterizó por una tendencia creciente durante la primera semana y una estabilización de la misma (sin aparente remisión) a lo largo de todo el brote. Durante los primeros diez días desde la aparición de los primeros casos se instauraron medidas para el control del proceso, incluyendo cambio de medicación vía pienso (Valnemulina 30 ppm), restricción de pienso, y un tratamiento anticoccidiótico vía agua.

En las necropsias realizadas a lo largo del brote se observaron claras lesiones compatibles con EM en todos los casos, con recuentos elevados de coccidios en las muestras que se remitieron a laboratorio. En ningún momento se detectaron cuadros clínicos o lesionales indicativos de RHD, salvo la presencia de marcada esplenomegalia en algunos ejemplares. Debido a ello, se remitieron muestras de duodeno, timo y bazo de un conejo de 50 días de edad con claras lesiones de EM al laboratorio del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Zaragoza (CITA) con el fin de analizar la posible presencia de calicivirus. La elección de este tipo de muestras, y no de hígado, se debió a la mayor probabilidad de detectar virus RHD en estos órganos en ausencia de cuadros agudos de la enfermedad.

Una vez en el CITA las tres muestras se analizaron por separado mediante PCR-dúplex a tiempo real (dúplex-qPCR). Esta técnica de diagnóstico, desarrollada y puesta a punto en el CITA dentro del ámbito de diferentes proyectos de investigación sobre la RHD, es altamente sensible y específica y capaz de detectar simultáneamente la presencia de virus RHDV2/b o de variantes clásicas RHDV en un mismo ensayo.

La extracción del ARN vírico se realizó utilizando el reactivo TRI Reagent (SIGMA, Life Science) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La síntesis de ADNc mediante la retrotranscripción del ARN se llevó a cabo usando el kit SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) conforme a las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

Posteriormente, y para verificar la capacidad infectante del aislado, a partir de las tres muestras se preparó un único homogeneizado con 0,2 g de cada tejido y 3 ml de PBS estéril. Esta suspensión fue centrifugada y el sobrenadante obtenido, una vez filtrado (tamaño de poro: 0,22 µm), se utilizó para infectar, vía intramuscular (0,3ml) a un conejo de la raza Blanco de Nueva Zelanda de 12 semanas de edad (Granja San Bernardo, Tulebras, España), no vacunado frente a RHD y procedente de progenitores no vacunados. La ausencia de anticuerpos anti RHD fue confirmada mediante ELISA indirecto comercial (Ingezim RHDV ref.17.RHD.K1, Laboratorios INGENASA, Madrid, España). La infección experimental se realizó en las instalaciones de bioseguridad del CITA.

El conejo se monitorizó hasta su muerte, procediéndose a la necropsia y a la correspondiente toma de muestras. Una parte de tejido hepático fue analizada mediante la dúplex-qPCR para comprobar la presencia de virus RHD. Para confirmar la identidad del virus aislado se procedió a la secuenciación completa del gen que codifica para la proteína VP60. Para ello se utilizó PCR convencional, tras la cual los productos obtenidos se purificaron utilizando el kit Macherey-Nagel-Extract II purification (Macherey-Nagel, Alemania), siendo secuenciados en una plataforma ABI Prism 3700 (Applied Biosystems, Madrid, España) conforme a las instrucciones del fabricante.

Resultados y discusión

Los resultados de la dúplex-qPCR fueron positivos para RHDV2/b en las tres muestras analizadas, si bien a valores de Cq muy elevados (38-41 Cq), lo que sugiere una reducida densidad de partículas víricas en los tejidos. El conejo infectado experimentalmente murió a las 48 horas post-infección, presentando lesiones características de RHD en su forma aguda. El análisis de tejido hepático con dúplex-qPCR fue positivo para RHDV2/b mientras que el análisis de la secuencia del gen para la VP60 confirmó al aislado como perteneciente a esta variante vírica.

Estos resultados sugieren que el virus RHDV2/b podría persistir o incluso circular de forma silente sin producir brotes aparentes de mortalidad por RHD, posiblemente asociado a explotaciones con historial de brotes anteriores de RHD causados por este virus y en donde la vacunación con vacuna clásica proporciona una protección parcial frente al mismo. La asociación del RHDV2/b con procesos digestivos ya fue descrita durante los primeros brotes de la enfermedad en granjas cunícolas (Grasa y Malo, 2012). En conejo silvestre también se ha detectado este virus asociado a brotes de mortalidad con lesiones típicas de enteropatía mucoide (Calvete, datos no publicados), mientras que a lo largo de 2016, de las muestras procedentes de otras siete explotaciones con problemas debidos a procesos digestivos, y que fueron remitidas al laboratorio del CITA para ser analizadas mediante la dúplex-qPCR, en tres de ellas se detectó también la presencia del RHDV2/b en condiciones similares; baja densidad de partículas víricas en los tejidos analizados y ausencia de cuadros típicos de RHD en las explotaciones. Todo ello apoyaría la hipótesis de la persistencia y circulación del virus RHDV2/b en determinadas circunstancias sin producir brotes de RHD, asociado a procesos digestivos originados por su mayor tropismo hacia las células del epitelio intestinal en comparación a las cepas clásicas del virus (Dalton *et al.*, 2012).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de investigación E-RTA2014-00009-00-00 del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

Bibliografía

- Baeuerl C., Collado M.C., Zuniga M., Blas E., Martínez G.P. 2014. Changes in cecal microbiota and mucosal gene expression revealed new aspects of epizootic rabbit enteropathy. *PLOS ONE*. 9.
- Dalton K.P., Nieceza I., Balseiro A., Muguerza M.A., Rosell J.M., Casais R., Álvarez A.L., Parra F. 2012. Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 18: 2009-2012.
- Grasa J.R., Malo M. 2012. Enfermedad vírica-hemorrágica: Nueva variante. *Boletín de Cunicultura*, 169: 6-24.
- Haligur M., Ozmen O., Demir N. 2009. Pathological and ultrastructural studies on mucoide enteropathy in New Zealand Rabbits. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18: 224-228.
- Le Gall-Reculé G., Zwingelstein F., Le Normand B., Plassiart G., Portejoie Y., Decors A., Bertagnoli S., Guérin J.L., Marchandeaup S. 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Veterinary Record*, 5: 137-138.
- Licois D., Wyers M., Coudert P. 2005. Epizootic rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Veterinary Research*. 36:601-613.
- Rosell J.M., de la Fuente L.F. 2016. Causes of mortality in breeding rabbits. *Preventive Veterinary Medicine*, 127: 56-63.
- Stenglein M.D., Velazquez E., Greenacre C., Wilkes R.P., Ruby J.G., Lankton J.S., Ganem D., Kennedy M.A., DeRisi J.L. 2012. Complete genome sequence of an astrovirus identified in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) with gastroenteritis. *Virology Journal*, 9: 216.

Primeiro caso de deteção de *Talaromyces marneffe* numa liebre (*Lepus granatensis*)

Primer caso de detección de *Talaromyces marneffe* en una liebre (*Lepus granatensis*)
First case of detection of *Talaromyces marneffe* in a hare (*Lepus granatensis*)

Alves D.¹, Matos A.C.², Saraiva S.¹, Soares A.S.¹, Figueira L.², Pinheiro V.^{3,*}, Matos M.^{4,5}, Coelho A.C.⁶

¹ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

² Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal

³ Departamento de Zootecnia, CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

⁴ Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

⁵ Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, BiOSI – Biosystems & Integrative Sciences Institute, Lisboa, Portugal

⁶ Departamento de Ciências Veterinárias, CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

* Dirección de contacto: vpinheir@utad.pt

Resumen

En este trabajo se presentan los resultados de un estudio clínico realizado en una liebre (*Lepus granatensis*) encontrada muerta en Penamacor, Castelo Branco, Portugal, que consistió en la detección e identificación de hongos filamentosos en la piel de animales salvajes. Las muestras recogidas se sembraron en medio de cultivo específico. La identificación fúngica se realizó en base de las características fenotípicas de las colonias al nivel macroscópico y microscópico. En esta investigación, hemos podido aislar el hongo *Talaromyces marneffe* de la piel de la liebre. Este resultado fue confirmado posteriormente por Nested-PCR. Hasta donde sabemos, este es el primer caso documentado de la presencia de *T. marneffe* en animales salvajes en Europa, reportado aquí en una liebre.

Palabras clave: Liebre, Nested-PCR, *Talaromyces marneffe*.

Abstract

This paper presents the results of a clinical study, which was performed in one hare (*Lepus granatensis*) found dead in Penamacor, Castelo Branco, Portugal. This study consisted in the detection and identification of filamentous fungi in the fur of wild animals. The collected samples were seeded into specific culture media. Fungal identification was made based on phenotypic characteristics of the colonies at the macroscopic and microscopic level. In this investigation, we were able to isolate the fungus *Talaromyces marneffe* from the fur of one hare. This result was posteriorly confirmed by Nested-PCR. To our knowledge, this is the first documented case of *T. marneffe* in animals in Europe, reported here in a hare.

Keywords: Hare, Nested-PCR, *Talaromyces marneffe*.

Introdução

O fungo *Talaromyces marneffe*, anteriormente conhecido como *Penicillium marneffe* é caracterizado como sendo dimórfico e patogénico. Este fungo pode provocar peniciliose, uma infeção oportunista e considerada endémica do continente asiático (Tailândia, China, Vietnam, Taiwan, Singapura e Índia), especialmente em pacientes imunodeprimidos com o vírus da imunodeficiência humana (VIH). A infeção envolve a pele, pulmões e sistema reticuloendotelial (Xiang et al., 2015). Embora existam anualmente centenas de casos de pessoas com VIH, não se verificou a existência de casos reportados sobre peniciliose marneffe em humanos na Península Ibérica e, todos os casos europeus são de indivíduos imunodeprimidos que viajaram até à Ásia e tiveram aí contacto com o agente.

O reservatório natural e os modos de transmissão e de infeção de *T. marneffe* ainda não são conhecidos. Até ao momento, os únicos reservatórios naturais conhecidos são os ratos-de-bambu *Rhizomys* e *Cannomys* spp. (Cao et al., 2011) e os humanos (Devi et al., 2009). Existem, no entanto, autores que afirmam que os cães errantes também poderão ser um potencial reservatório deste agente patogénico (Chaiyun et al., 2011). No que diz respeito ao continente Europeu, o isolamento de *Talaromyces marneffe* nunca foi reportado em animais. Neste estudo efetuou-se um rastreio fúngico a diferentes animais selvagens dos quais apenas fazia parte uma lebre.

Materiais e métodos

Neste trabalho, uma lebre (*Lepus granatensis*) fêmea e adulta, encontrada morta em Penamacor, Portugal (Figura 1) foi submetida a um exame post mortem no Serviço de Histopatologia do Departamento de Ciência Animal da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco. O animal apresentava uma boa condição corporal.



Figura 1. Local de recolha da amostra.

Após o exame post mortem, foram colhidas amostras de pelo e pele para cultura micológica. As placas foram incubadas a 28°C durante 3 a 5 dias. Os isolados fúngicos foram identificados ao nível do género de acordo com as suas características microscópicas e macroscópicas. O fungo *T. marneffe* foi identificado com base na cor das colónias e identificação microscópica, assim como, pela conversão à sua fase leveduriforme.

O DNA deste fungo foi extraído com recurso ao kit Plant/ Fungi DNA Isolation, Norgen Biotek® de acordo com as instruções do fabricante. Uma amostra de água destilada foi usada simultaneamente com as amostras (extração do controlo negativo). Para a realização da Nested-PCR foi utilizado o procedimento de Vanittanakom et al. (2002). Na primeira reação 3 µL do DNA extraído foram utilizados, juntamente com 10 µL de Mastermix (Bioron®), 1 µL de primer RRF1 (5'ATCTA AATCCCTTAACGAGGAACA3') e 1 µL de primer RRH1 (5'CCGTCAATTTCTTTAAGTTTCAGCCTT3', sendo o volume final da mix de 20 µL. As condições de PCR foram: 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 30 s; 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 2 min, e, por fim, 72 °C durante 10 min. A partir dos produtos de reação da primeira PCR, um microlitro de cada amostra foi diluído numa razão de 1:1000 e sujeito a uma segunda PCR usando primers específicos, Pm1 (5'ATGGGCCTTTCTTTCTGGG3') e Pm2 (5'GCGGGTCATCATAGAAACC). A composição da mix e as condições de PCR foram as mesmas enunciadas anteriormente, com exceção da temperatura de annealing que foi de 65 °C. Seguidamente, catorze microlitros dos produtos de reação da segunda PCR foram analisados em géis de agarose a 1%.

Resultados e discussão

Através da realização da análise macroscópica e microscópica foi possível efetuar a identificação do fungo em questão como sendo, *Talaromyces marneffe* (Figura 2). Os resultados obtidos através da técnica de Nested-PCR também comprovaram a identificação positiva para esta amostra, verificando-se a amplificação de um fragmento na zona dos 400 pb. Através destas duas metodologias foi então confirmada a presença de *T. marneffe* no pelo da lebre. A nosso ver, este é o primeiro caso documentado de isolamento de *T. marneffe* em animais na Europa, sendo este caso reportado numa área bastante afastada do seu reservatório geográfico de origem.

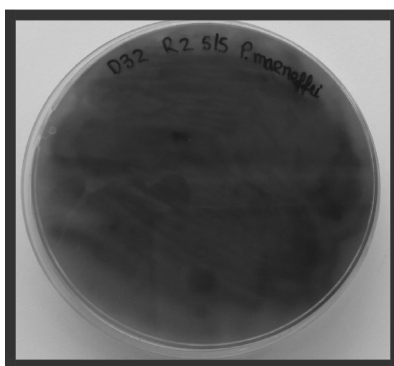


Figura 2. *Talaromyces marneffeii* em cultura.

Neste estudo, foi possível identificar a presença de *Talaromyces marneffeii*, um fungo patogénico e endémico do continente asiático no pelo de um animal selvagem. Este isolamento tem uma elevada relevância e poderá ter implicações na saúde pública, uma vez que, tanto os veterinários como os caçadores, técnicos das zonas de caça e meso as pessoas do mundo rural, têm contato frequente com animais desta espécie. Deverá então ser feito um alerta para o risco de infeção ao manusear amostras e tecidos infetados e alertar para a importância da utilização de equipamentos de proteção individual como batas, luvas e máscaras, para reduzir a possibilidade de contágio.

É ainda importante referir que, no caso da lebre, existe um risco acrescido devido ao facto de ser um animal utilizado na alimentação humana. Por isso, devem prosseguir estes estudos aumentando a amostragem para estudar a prevalência do fungo e cobrindo outras zonas do País.

Agradecimentos

Os autores agradecem a colaboração das técnicas do laboratório de Microbiologia Médica do Departamento de Ciências Veterinárias e do laboratório de Genética e Biotecnologia do Departamento de Genética e Biotecnologia.

Este trabalho obteve financiamento da FCT através do Projeto UID/CVT/00772/2013.

Bibliografia

- Cao C., Liang L., Wang W., Luo H., Huang S., Liu D., Xu J., Henk D.A., Fisher M.C. 2011. Common reservoirs for *Penicillium marneffeii* infection in humans and rodents, China. *Emerging Infectious Diseases*, 17(2): 209-214.
- Chaiwun B., Vanittanakom N., Jiviriyawat Y., Rojanasthien S., Thorner P. 2011. Investigation of dogs as a reservoir of *Penicillium marneffeii* in northern Thailand. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(4): e236-239.
- Devi S.B., Devi T.S., Ningshen R., Devi Kh.R., Singh T.B., Singh N.B. 2009. *Penicillium morneffeii*, an emerging AIDS-related pathogen—a RIMS study. *Journal of the Indian Medical Association*, 107: 208-210.
- Vanittanakom N., Vanittanakom P., Hay R.J. 2002. Rapid identification of *Penicillium marneffeii* by PCR-based detection of specific sequences on the rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5): 1739-1742.
- Xiang Y., Guo W., Liang K. 2015. An unusual appearing skin lesion from *Penicillium marneffeii* infection in an AIDS patient in Central China. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(1):3.