

# PATOLOGÍA

***Alternativa natural frente a alteraciones patológicas en el tracto digestivo en conejo de cebo***

*Domingo P., Martínez C., Olave M., Martín B.*

***Influencia del alojamiento sobre la salud de las conejas***

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

***Evaluación del efecto de una infección experimental con diferentes cepas de Staphylococcus aureus en conejos comerciales: resultados preliminares***

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

***Caracterización de cepas MRSA y MSSA aisladas en conejos comerciales. Estudio preliminar***

*Moreno-Grúa E., Pérez-Fuentes S., Muñoz-Silvestre A., Viana D.,  
Fernández-Ros A.B., Sanz-Tejero C., Corpa J.M., Selva L.*

***Estudios de eficacia post-vacunación para la prevención de la nueva variante de la EHC***

*Sánchez-Matamoros A., Boix O., Ruiz M.C., Woodward M., Maldonado J.*

***The stressful life of Staphylococcus aureus***

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

# ALTERNATIVA NATURAL FRENTE A ALTERACIONES PATOLÓGICAS EN EL TRACTO DIGESTIVO EN CONEJO DE CEBO

## *Natural alternative to pathologic alterations on digestive tract in fattening rabbit*

Domingo P.\*, Martínez C., Olave M., Martín B.

Somvital, Calle Manfredonia 10, naves 1-2, 50197 Zaragoza, España

\*Dirección de contacto: info@somvital.com

### RESUMEN

Dos de los mayores problemas de salud pública y sanidad animal son el desarrollo de resistencias a los antimicrobianos y la escasez de tratamientos alternativos. Esta situación ha llevado al desarrollo de un Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) que tiene por objeto reducir el uso de antibióticos. Por ello, nos vemos en la necesidad de estudiar alternativas eficaces como son los aceites esenciales. El objetivo de este estudio fue la evaluación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales y ácidos orgánicos como posible alternativa natural frente a alteraciones digestivas en conejo de cebo. El producto empleado fue ARVITAL SE®, formulado a base de extracto de *Allium sativum*, de *Origanum vulgare* y de *Yuca schidigera* y ácidos orgánicos (ácido butírico, láurico, caprílico, fórmico, propiónico y acético). Primero se realizó un estudio *in vitro* para valorar el efecto antibacteriano de ARVITAL SE® y posteriormente se diseñaron dos experimentales *in vivo* con diferentes protocolos de aplicación. El estudio *in vitro* corroboró el efecto antibacteriano de ARVITAL SE®. Se diseñaron dos protocolos diferentes de administración de ARVITAL SE® durante el período de cebo para poder determinar la dosis adecuada. En ambos casos se consiguió criar el grupo experimental sin la administración de antibióticos en agua de bebida. En cambio, el grupo control (no tomó ARVITAL SE®) tuvo que ser tratado en ambos experimentales con antibiótico en agua de bebida. Para concluir, la administración de ARVITAL SE® ayuda a controlar las alteraciones patológicas producidas en el tracto digestivo en conejo de cebo sin la necesidad de realizar tratamientos con antibiótico en agua de bebida. Adicionalmente, cuando se administra a bajas dosis durante todo el cebo mejora la ganancia media diaria, obteniendo animales con mayor peso final.

**Palabras clave:** Aceites esenciales, Ácidos orgánicos, Enteropatía, Antibiótico.

### ABSTRACT

Two of the main public and animal health problems are the development of antimicrobial resistances and the scarcity of alternative therapies. This situation leads to develop a National Plan against Antibiotic Resistance (PRAN) which its objective is to reduce the use of antibiotics. Therefore, the necessity to study effective alternatives as essential oils is increasing. The aim of this study was to assess the antimicrobial effect of essential oils and organic acids as a possible natural alternative opposite pathologic alteration in fattening rabbits. The product used was ARVITAL SE®, compound form *Allium sativum*, *Origanum vulgare* and *Yuca schidigera* essence and organic acids (butyric, lauric, caprylic, formic, propionic and acetic acids). Firstly, an *in vitro* research was performed to evaluate the antibacterial effect of ARVITAL SE® and subsequently two *in vivo* trials were designed. *In vitro* study corroborated the antibacterial effect of ARVITAL SE®. Two trails were designed to decide the most suitable dosage and protocol to administer ARVITAL SE® throughout the fattening period. In

both *in vivo* studies, the experimental group was not needed to add antibiotics in drinking water. Additionally, control group (no ARVITAL SE® was added in water) had to be treated in both experiments with antibiotic in drinking water. Summarizing, ARVITAL SE® helps to control pathologic alterations in digestive tract of fattening rabbits without the need to administrate antibiotic in drinking water. Moreover when ARVITAL SE® is administrated at low dosage along all fattening period, average daily gain is improved.

**Keywords:** Essential oils, Organic acids, Enteropathy, Antibiotic.

## INTRODUCCIÓN

El uso excesivo e inadecuado de antibióticos durante las últimas décadas ha provocado el desarrollo de bacterias multirresistentes, las cuales constituyen una de las amenazas más serias para la salud pública. Esta situación ha llevado a la elaboración de un Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) propuesto por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS). La primera fase del PRAN en cunicultura se puso en marcha el pasado 1 julio de 2017 con el objetivo de reducir un 30% el consumo de antibióticos a lo largo de los 2 años siguientes (<http://www.resistenciaantibioticos.es/es>).

Una alternativa natural a los antibióticos podría ser el uso de aceites esenciales debido al gran poder antimicrobiano que poseen. Está demostrado que tanto los extractos de ajo como de orégano presentan efectos antimicrobianos frente a bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Arthrobacter protophormiae*) y Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fragi*) (Nadoushan et al., 2011; Mozaffari Nejad et al., 2014; Puškárová et al., 2017) así como efectos antiparasitarios frente a coccidios (*Eimeria spp.*) (Abu-Akkada et al., 2010; Kowalska et al., 2012). Por otra parte, también se les atribuyen beneficios como la mejora de la respuesta inmunitaria (Alagawany et al., 2016) y de los índices productivos (mayor ganancia de peso y mejora de la calidad de la canal) (Rotolo et al., 2013; Cardinali et al., 2015).

Además los ácidos orgánicos, como el ácido butírico, láurico, caprílico, fórmico y propiónico, se utilizan en la alimentación animal para reducir el pH del pienso, mejorar la digestibilidad de los nutrientes y, debido a su marcado efecto antimicrobiano, para controlar el crecimiento y proliferación de bacterias, hongos y levaduras (Marzo et al., 2001).

Por lo tanto, debido a que dos de los mayores problemas de salud pública y sanidad animal son el desarrollo de resistencias a los antimicrobianos y la escasez de tratamientos alternativos, el objetivo de este estudio fue plantear una alternativa natural frente a patologías digestivas en conejo de cebo. Para ello, se evaluaron los efectos antimicrobianos de un preparado a base de aceites esenciales y ácidos orgánicos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.- Composición de ARVITAL SE®

ARVITAL SE® está compuesto por extracto de *Allium sativum* (ajo), extracto de *Origanum vulgare* (orégano), extracto líquido de *Yuca schidigera* (yuca), ácidos orgánicos (ácido butírico, láurico, caprílico, fórmico, propiónico y acético) y emulsionantes (glicerol).

### 2.- Estudio *in vitro* del efecto antibacteriano de ARVITAL SE®

Para determinar la inhibición del crecimiento de la cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y de *Salmonella spp.* se realizó la prueba de sensibilidad antibacteriana por difusión en agar. Para ello la concentración bacteriana se ajustó al estándar 0.5 de la escala Mc Farland y posteriormente ambas cepas se cultivaron respectivamente en placas Petri con agar Mueller Hinton. A los 5 minutos se colocaron 3 discos en cada placa: un disco con

ARVITAL SE® y dos discos control, uno con colistina 10µg y otro con doxiciclina 30µg. Transcurridas 24 horas de incubación en estufa a 37°C, se midió el diámetro del halo de inhibición formado. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

### **3.- Estudio in vivo del efecto de ARVITAL SE®**

El estudio se realizó en un núcleo de selección genética con conejos F1 (línea maternal). Todos los animales tuvieron disponibilidad de agua *ad libitum* y pienso comercial premedicado con 400 mg/kg de oxitetraciclina 20% y 35 mg/kg de valnemulina 10% desde los 21 días de edad hasta 7 días antes del sacrificio. Los últimos 7 días de cebo consumieron pienso de retirada.

En los casos de aparición de brote infeccioso, el Grupo Control (GC) se trató con medicamento vía oral y el Grupo Experimental (GE) con ARVITAL SE®.

#### **3.1.- Experimental 1: ARVITAL SE® administrado durante todo el cebo**

El estudio constó de dos grupos: GC de 324 animales, no recibieron ARVITAL SE®; GE de 324 animales, se les administró 400 ppm de ARVITAL SE® diarios desde el destete hasta la salida a matadero.

#### **3.2.- Experimental 2: ARVITAL SE® administrado durante 10 días tras el destete**

El estudio constó de dos grupos: GC de 378 animales, no recibieron ARVITAL SE®; GE de 378 animales, se les administró 600 ppm de ARVITAL SE® diarios durante los 10 primeros días.

#### **3.3.- Evaluación de los resultados**

**3.3.1.-** Evaluación del uso de medicamentos: Se evaluó y comparó entre los dos grupos del estudio la necesidad de realizar un tratamiento con antibióticos en agua de bebida.

**3.3.2.-** Evaluación de la mortalidad y el agente causal: Diariamente se revisaron los animales y contabilizaron las bajas. Se realizaron necropsias de todas las bajas y se tomaron muestras de intestino delgado, ciego, intestino grueso y heces para determinar la causa de la muerte. Las muestras se sembraron en Agar MacConkey, Agar XLD y Agar Mueller Hinton para el aislamiento de bacterias y la presencia de *Clostridium perfringens* y/o *Clostridium spiroforme* se diagnosticó mediante tinción de Gram. Se realizó un análisis coprológico para determinar la presencia o ausencia de *Eimeria spp.* y *Passalurus ambiguus*.

**3.3.3.-** Evaluación del incremento de peso: El 20% de los animales del experimental 1 fueron pesados a los 38 y a los 64 días de vida. El 20% de los animales del experimental 2 fueron pesados a los 36, 46, 56 y 65 días de vida.

### **4.- Análisis estadístico**

El análisis estadístico fue realizado con el programa IBM SPSS Statistics 16. El estudio estadístico de las diferencias del diámetro del halo de inhibición se analizó con la prueba t de Student, el incremento de peso con el análisis de varianza unifactorial (ANOVA) y la prueba Chi-cuadrado fue utilizada para analizar la mortalidad. El nivel de significancia fue establecido en  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1.- Evaluación de los resultados in vitro del efecto antibacteriano de ARVITAL SE®**

Como se puede observar en la tabla 1 ARVITAL SE® presenta efecto antibacteriano *in vitro*, siendo significativo ( $p < 0,01$ ) el halo de inhibición de ARVITAL SE® con respecto al de los antibióticos control. Dichos resultados son similares a los obtenidos por Nadoushan et al. (2011) y Puškárová et al. (2017), los cuales demostraron el efecto antibacteriano del extracto de ajo y orégano en enterobacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

**Tabla 1.** Halos de inhibición de colistina, doxiciclina y ARVITAL SE®.

	CT10 (mm)	D30 (mm)	ARVITAL SE® (mm)
<i>Escherichia coli</i>	11*	19*	16
<i>Salmonella spp.</i>	14*	8*	11

CT10: colistina 10µg. D30: doxiciclina 30µg. Los datos están presentados con una DE±1. \*indica diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,01$ ) de cada grupo control comparado con el grupo ARVITAL SE®.

### 2.- Evaluación de los resultados in vivo del efecto de ARVITAL SE® administrado durante todo el cebo (experimental 1)

A los 43 días de vida se empezó a observar animales con diarrea en el GC por lo que se decidió iniciar un tratamiento en agua de bebida con enrofloxacina 10% durante 5 días. Tras el tratamiento los animales se recuperaron sin necesidad de volver a medicar. Por otro lado, en el grupo al que se le administró ARVITAL SE® no se observaron signos de enteropatía y no hubo necesidad de tratar con antibiótico.

La mortalidad fue similar en ambos grupos del estudio (GC=4,63%; GE=4,32%). Únicamente se reportó una baja más en GC siendo este resultado no significativo ( $p=0,849$ ).

Finalmente, en la evaluación del peso se observó mayor ganancia media diaria e incremento total de peso en el GE (Tabla 2).

**Tabla 2.** Evaluación del incremento de peso.

	Grupo Control	Grupo Experimental	p
<b>Peso vivo 38 días (g)</b>	1.010±14	1.090±14	**
<b>Peso vivo 64 días (g)</b>	1.870±18	1.990±22	**
<b>Ganancia media diaria (g/día)</b>	33,2±0,3	35,0±0,6	**
<b>Incremento total peso (g)</b>	862,2±6,5	909,6±15,2	**

Los datos están presentados como media±EEM. \*\*indica diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,01$ ) entre los grupos.

### 3.- Evaluación de los resultados in vivo del efecto de ARVITAL SE® administrado durante 10 días tras el destete (experimental 2)

En este segundo estudio en ambos grupos se observó un brote infeccioso a los 50 días de vida. El GC tuvo que ser tratado con enrofloxacina 10% durante 5 días mientras que al GE se le administró 600 ppm diarios de ARVITAL SE® durante 7 días. No fue necesario administrar antibiótico en el GE.

Cumpliendo los objetivos de criar animales sin antibióticos, cabe destacar que únicamente hubo un 1,5% más de bajas en el GE siendo este resultado no significativo ( $p=0,305$ ). Como se muestra en la tabla 3 se observó presencia de *Escherichia coli*, *Eimeria spp.* y tanto de *Clostridium perfringens* como de *Clostridium spiroforme* en el GC, mientras que en el GE solo se observó presencia de *Escherichia coli* y un porcentaje muy pequeño de muestras con *Clostridium perfringens* y/o *Eimeria spp.* Estos resultados demuestran que ARVITAL SE® tiene eficacia frente a bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas y también frente a coccidios.

Por otro lado, se observó una mayor ganancia media diaria (GC=31,5±0,8g; GE=30,0±0,4g) e incremento total de peso (GC=913,2±22,4g; GE=869,4±11,7g) en el GC al final del cebo, siendo resultados no significativos (p=0,111).

**Tabla 3.** Porcentaje de patógenos presentes en las muestras.

	Grupo control (%)	Grupo experimental (%)	p
<i>Escherichia coli</i>	100,0	100,0	n.s.
<i>Clostridium perfringens</i>	57,4	20,0	**
<i>Clostridium spiroforme</i>	42,9	<1,0	**
<i>Salmonella spp.</i>	<1,0	<1,0	n.s.
<i>Eimeria spp.</i>	28,6	10	**
<i>Passalurus ambiguus</i>	<1,0	<1,0	n.s.

\*\*indica diferencias estadísticamente significativas (p<0,01) entre los grupos. n.s.: no significativo (p>0,05).

## CONCLUSIONES

La administración de ARVITAL SE® ayuda a controlar las alteraciones patológicas producidas en el tracto digestivo en conejo de cebo sin la necesidad de realizar tratamientos con antibiótico en agua de bebida. Además, cuando se administra a bajas dosis durante todo el cebo mejora la ganancia media diaria obteniendo animales con mayor peso final.

## BIBLIOGRAFÍA

**Abu-Akkada S.S., Oda S.S., Ashmawy K.I.** 2010. Garlic and hepatic coccidiosis: prophylaxis or treatment?. *Tropical Animal Health and Production*, 42(7):1337-1343.

**Alagawany M., Ashour E., Reda, F.** 2016. Effect of dietary supplementation of garlic (*Allium sativum*) and turmeric (*Curcuma longa*) on growth performance, carcass traits, blood profile and oxidative status in growing rabbits. *Annals of Animal Science*, 16(2):489-505.

**Cardinali R., Cullere M., Dal Bosco A., Mugnai C., Ruggeri S., Mattioli S., Castellini C., Trabalza M., Dalle Zotte A.** 2015. Oregano, rosemary and vitamin E dietary supplementation in growing rabbits: Effect on growth performance, carcass traits, bone development and meat chemical composition. *Livestock Science*, 175:83-89.

**Kowalska D., Bielański P., Nosal P., Kowal J.** 2012. Natural alternatives to Coccidiostats in rabbit nutrition. *Annals of Animal Science*, 12(4):561-574.

**Marzo I., Urdí L., Costa-Baltlori P.** 2001. Nuevas estrategias en la alimentación del conejo: aditivos y alternativas al uso de antibióticos. *Nuestra Cabaña*, 312:78-91.

**Mozaffari Nejad A.S., Shabani S., Bayat M., Hosseini S.E.** 2014. Antibacterial effect of garlic aqueous extract on *Staphylococcus aureus* in hamburger. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(11):134.

**Nadoushan M.J., Nadoushan S.A., Owlia P.** 2011. Evaluation of in-vivo antibacterial effects of garlic aqueous extract on *Salmonella typhimurium*-infected Rabbits. *International Journal of Infectious Diseases*, 15.

**Pušárová A., Bučková M., Kraková L., Pangallo D., Kozics K.** 2017. The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. *Scientific Reports*, 15;7(1):8211.

**Rotolo L., Gai F., Nicola S., Ivo Z., Brugiapaglia A., Gasco L.** 2013. Dietary supplementation of oregano and sage dried leaves on performances and meat quality of rabbits. *Journal of Integrative Agriculture*, 12:1937-1945.

# INFLUENCIA DEL ALOJAMIENTO SOBRE LA SALUD DE LAS CONEJAS

## *Impact of housing on the rabbit does health*

---

Pérez-Fuentes S.<sup>1\*</sup>, Muñoz-Silvestre A.<sup>1</sup>, Moreno-Grúa E.<sup>1</sup>, Pascual J.J.<sup>2</sup>,

Cervera C.<sup>2</sup>, Selva L.<sup>1</sup>, Corpa J.M.<sup>1</sup>, Viana D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto CEU de Ciencias Biomédicas (Grupo de Patología y Sanidad Animal),  
Facultad de Veterinaria, PASAPTA, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities,  
C/ Tirant lo Blanc 7, 46115 Alfara del Patriarca, Valencia, España

<sup>2</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universitat Politècnica de València,  
Camino de Vera 14, 46071 Valencia, España

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

---

### RESUMEN

El bienestar de los animales de producción está muy relacionado con su rendimiento y, cada vez más, preocupa a la sociedad. Un factor muy importante que afecta al bienestar son los alojamientos, pero en cunicultura no hay suficientes evidencias científicas sobre el efecto del alojamiento de las reproductoras sobre su estado sanitario. Por ello, en este trabajo se estudia el estado inmunitario y las causas de baja de conejas reproductoras en 5 tipos diferentes de jaulas: polivalente; más alta y profunda; con plataforma; clásica (más pequeña y baja) y colectiva para 6 conejas. Se observó que los animales ubicados en alojamientos colectivos mostraban un aumento en los niveles sanguíneos de haptoglobina, al final del experimento, y un mayor número de bajas (debidas a eliminaciones), en comparación con el resto de grupos. **Palabras clave:** salud, cunicultura, alojamiento.

### ABSTRACT

The welfare in animal production is increasingly concerning society and is closely related to the good performance of these animals. The housing is a very important factor for well-being, but there is not enough scientific evidence about the best type in rabbit breeding. Therefore, in this work the immune status and doe morbidity and mortality are studied in 5 different types of cages: polyvalent cage; highest and deepest cage; cage with platform; classic cage (smaller and lower); collective for 6 females. It was recorded that the collective housing produced an increase in haptoglobine levels at the end of the experiment and a greater number of eliminations in comparison with the rest of housings.

**Keywords:** health, rabbit breeding, housing.

### INTRODUCCIÓN

Debido a la creciente preocupación social sobre el bienestar y la sostenibilidad en la producción animal, es necesario buscar sistemas de producción que no sólo optimicen los niveles productivos, sino que también mejoren la salud, la higiene y el bienestar de los animales, y que tengan en cuenta las repercusiones socioeconómicas sobre los trabajadores del sector.

En el caso de la cunicultura, un sector gravemente castigado por la crisis, los alojamientos y el manejo de los animales son los pilares básicos sobre los que se sustenta el rendimiento económico de las explota-



ciones. Sin embargo, la ley no regula las características que deben cumplir los alojamientos en cunicultura, tan solo se establecen unas normas mínimas para la protección de los conejos de cría (2016/2077(INI)). Tampoco hay evidencias científicas sobre qué tipo de alojamiento es preferible bajo el punto de vista del bienestar y la salud de los animales, ya que no hay resultados concluyentes sobre las características de las jaulas y las consecuencias que pueden tener sobre el estado sanitario.

Para evaluar los diferentes tipos de alojamientos es necesario un enfoque multidisciplinar que abarque aspectos productivos, comportamentales y sanitarios (mortalidad, morbilidad e indicadores inmunológicos), dada la relación que tienen todos ellos con el bienestar animal (Hoy y Verga, 2006). Además, los animales estresados o enfermos muestran mayores tasas de infertilidad, más abortos o pérdida de peso (Marai et al., 2002; Rosell y de la Fuente, 2008). Por tanto, el estudio de la salud y de la enfermedad, así como de la higiene de los animales y de las instalaciones donde viven, proporcionaría una interesante información a la hora de interpretar el grado de bienestar de las conejas en las granjas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar cinco tipos de alojamiento para conejas reproductoras bajo un punto de vista sanitario, estudiando el estado inmunológico y las causas de baja (muerte y eliminación) de los animales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se utilizaron 150 conejas reproductoras a las 19 semanas de vida (primera inseminación), repartidas en 5 tipos diferentes de alojamientos (30 animales en cada tipo): polivalente (POL; dimensiones 40 cm ancho x 98cm profundo x 38 alto; 3920 cm<sup>2</sup> de superficie total disponible incluido nido); más alta y profunda (ALPRO; 50x85x50; 5250cm<sup>2</sup>); con plataforma (PLAT; 40x98x57; 4960 cm<sup>2</sup>); clásica (CLAS; 50x70x38; 4270 cm<sup>2</sup>); colectiva (COL; para 6 hembras; 246x100x50; 4980cm<sup>2</sup>/hembra). El estudio se llevó a cabo en la granja de investigación de la Universidad Politécnica de Valencia a lo largo de los años 2016 y 2017.

Las conejas se ubicaron en cada tipo de alojamiento una semana antes de la primera inseminación. En este momento, se tomaron muestras de sangre en tubos de EDTA (9 mL) de, al menos, 16 animales por grupo y, posteriormente, cuando las conejas llegaron a 5º parto. Con esta sangre se realizaron las siguientes determinaciones:

*Recuentos celulares sanguíneos:* se analizó 1 mL de sangre con EDTA mediante un contador hematológico y frotis sanguíneo.

*Bioquímica sanguínea:* se determinaron los niveles de haptoglobina, a partir del plasma sanguíneo, que se envió a un laboratorio externo para su determinación.

*Pruebas de funcionalidad celular in vitro:* Los heterófilos juegan un papel importante en la inmunidad innata. Por ello, se evaluó la capacidad fagocítica de estas células. Para ello, se purificaron los heterófilos y se enfrentaron a la bacteria *Staphylococcus aureus* marcada con fluoresceína. El índice de fagocitosis se llevó a cabo mediante recuento con microscopio de fluorescencia (Leica, Solms, Alemania).

*Necropsias:* Se realizó la necropsia sistemática, ordenada y completa de todas las conejas muertas o eliminadas durante todo el estudio. Se tomaron muestras para estudios histopatológicos y microbiológicos de los órganos que mostraron lesiones.

Para el análisis estadístico, los parámetros leucocitarios y de haptoglobina fueron normalizados aplicando logaritmos cuando fue necesario. Para su análisis se utilizó un procedimiento MIXED con el programa SAS®, en un modelo que incluyó como efectos fijos el tipo de jaula y el momento de muestreo. El análisis de las causas de bajas se realizó mediante un test para variables no paramétricas por chi-cuadrado.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Al comparar los datos de ambos muestreos (1ª inseminación y 5º parto) de todas las hembras estudiadas (Tabla 1), se observó que el número total de eritrocitos y la hemoglobina se redujeron entre la primera inseminación (1IA) y el quinto parto (5P) (-12 y -17%, respectivamente;  $P < 0.001$ ), mientras el número de plaquetas aumentó (+20%;  $P < 0.001$ ). En cuanto al número de leucocitos, estos aumentaron en el 5P (+31%;  $P < 0.001$ ), debido sobre todo a un aumento del número de heterófilos totales (+30%;  $P = 0.004$ ). La haptoglobina aumentó también al 5P (+22%;  $P = 0.018$ ), mientras que la capacidad fagocítica disminuyó (8 puntos porcentuales;  $P = 0.001$ ). La disminución de eritrocitos y hemoglobina y el aumento de heterófilos a lo largo de los 5 partos podrían estar relacionados con un desgaste productivo, como ha sido señalado en estudios previos (Archetti et al., 2008). La haptoglobina es una proteína de fase aguda que se modifica notablemente cuando los animales son sometidos a importantes retos inmunológicos o por estrés y, por ello, se utiliza como biomarcador (Dishlyanova et al., 2011; El-Deeb, 2013). Por tanto, puede aumentar a lo largo de la vida productiva de las conejas (Argente et al., 2014).

**Tabla 1.** Parámetros sanguíneos en primera inseminación (1IA) y quinto parto (5P).

	1IA	5P	SEM	P-valor
<b>Leucocitos (<math>\log_{10}</math> 106 cél/mL)</b>	0.881 <sup>a</sup>	0.999 <sup>b</sup>	0,017	<.0001
<b>Eritrocitos (<math>\times 10^9</math> cél/mL)</b>	6.190 <sup>b</sup>	5.428 <sup>a</sup>	0,046	<.0001
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	133.4 <sup>b</sup>	110.7 <sup>a</sup>	1,179	<.0001
<b>Plaquetas (<math>\times 10^6</math> cél/mL)</b>	266.9 <sup>a</sup>	319.9 <sup>b</sup>	9,171	0.0003
<b>Linfocitos (<math>\log_{10}</math> 103 cél/mL)</b>	3.560	3.611	0,026	0.1987
<b>Heterófilos (<math>\log_{10}</math> 103 cél/mL)</b>	3.511 <sup>a</sup>	3.623 <sup>b</sup>	0,024	0.0037
<b>Monocitos (<math>\log_{10}</math> 103 cél/mL)</b>	2.698	2.602	0,056	0.2658
<b>Eosinófilos (<math>\log_{10}</math> 103 cél/mL)</b>	1.253	1.615	0,121	0.0537
<b>Heterófilos/Linfocitos</b>	0.952	1.661	0.241	0.0573
<b>Haptoglobina (<math>\log_{10}</math> mg/L)</b>	2.542 <sup>a</sup>	2.628 <sup>b</sup>	0,024	0.0176
<b>Fagocitosis (%)</b>	24.38 <sup>b</sup>	16.75 <sup>a</sup>	1,378	0.0011

a, b: valores medios en el mismo grupo de datos significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). / SEM: error estándar.

Para evaluar el efecto de estos alojamientos sobre la salud de las conejas a lo largo de su vida productiva, se compararon los parámetros evaluados en el momento del 5P (Tabla 2). Se observa que las conejas de los alojamientos PLAT tienen valores de hemoglobina más altos que las ALPRO y CLAS (+7%;  $P < 0.05$ ), y las conejas COL presentaron más plaquetas que las de los ALPRO y PLAT (+34%;  $P < 0.05$ ). Por último, en cuanto a la haptoglobina, el COL presentó valores más altos que los ALPRO, PLAT y CLAS (+8%;  $P < 0.05$ ). A pesar de que hay diferencias significativas, todos estos parámetros se mantienen dentro de los valores normales para estos animales. Además, otros indicadores inmunológicos, como el ratio heterófilos/linfocitos (Davis et al., 2008) y la capacidad fagocítica (Saffarzadeh et al., 2012), no se vieron significativamente afectados.

**Tabla 2.** Análisis estadístico de los valores sanguíneos de cada tipo de alojamiento en el quinto parto.

	POL	ALPRO	PLAT	CLAS	COL
<b>Leucocitos</b>					
(log <sub>10</sub> 10 <sup>6</sup> cél/mL)	1.041 ±0.049	0.959 ±0.040	0.967 ±0.039	0.993 ±0.039	1.036 ±0.047
<b>Eritrocitos</b>					
(x10 <sup>9</sup> cél/mL)	5.546 ±0.133	5.345 ±0.108	5.517 ±0.107	5.416 ±0.106	5.314 ±0.129
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	115.5 ±3.383 <sup>ab</sup>	107.5 ±2.743 <sup>a</sup>	115.4 ±2.707 <sup>b</sup>	107.7 ±2.699 <sup>a</sup>	107.3 ±3.271 <sup>ab</sup>
<b>Plaquetas</b>					
(x10 <sup>6</sup> cél/mL)	312.3 ±26.29 <sup>ab</sup>	280.7 ±21.32 <sup>a</sup>	271.5 ±21.04 <sup>a</sup>	334.8 ±20.65 <sup>ab</sup>	369.3 ±25.42 <sup>b</sup>
<b>Linfocitos</b>					
(log <sub>10</sub> 10 <sup>3</sup> cél/mL)	3.629 ±0.075	3.629 ±0.059	3.618 ±0.059	3.527 ±0.058	3.651 ±0.071
<b>Heterófilos</b>					
(log <sub>10</sub> 10 <sup>3</sup> cél/mL)	3.645 ±0.071	3.585 ±0.056	3.596 ±0.056	3.663 ±0.055	3.627 ±0.067
<b>Monocitos</b>					
(log <sub>10</sub> 10 <sup>3</sup> cél/mL)	2.617 ±0.163	2.510 ±0.129	2.644 ±0.127	2.672 ±0.127	2.568 ±0.154
<b>Eosinófilos</b>					
(log <sub>10</sub> 10 <sup>3</sup> cél/mL)	1.675 ±0.354 <sup>ab</sup>	1.117 ±0.280 <sup>a</sup>	1.568 ±0.276 <sup>ab</sup>	1.998 ±0.275 <sup>b</sup>	1.717 ±0.333 <sup>ab</sup>
<b>Heterófilos/ Linfocitos</b>					
	1.379 ±0.280	1.125 ±0.556	1.254 ±0.548	2.679 ±0.547	1.868 ±0.663
<b>Haptoglobina</b>					
(log <sub>10</sub> mg/L)	2.621 ±0.060 <sup>ab</sup>	2.572 ±0.056 <sup>a</sup>	2.592 ±0.055 <sup>a</sup>	2.572 ±0.055 <sup>a</sup>	2.783 ±0.067 <sup>b</sup>
<b>Fagocitosis (%)</b>	13.39 ±3.373	16.23 ±2.913	16.46 ±3.039	18.73 ±2.661	18.95 ±3.237

a, b: valores medios en el mismo grupo de datos significativamente diferentes (P<0,05).

POL: polivalente; ALPRO: alta y profunda; PLAT: con plataforma; CLAS: clásica; COL: colectiva.

A lo largo del experimento, de las 150 conejas estudiadas, 62 causaron baja, de las cuales 35 fueron eliminadas por diferentes motivos y 27 murieron en la explotación. Se realizó la necropsia a 55 animales, de los cuales, 52 presentaron alguna lesión. En el grupo COL hubo un mayor número de bajas debido a un mayor número de eliminaciones que el resto de grupos (Tabla 3). Las causas de eliminación más frecuentes fueron problemas reproductivos (n=21), y presencia de abscesos (n=10), siendo en el grupo COL el que presentó mayor porcentaje de estos problemas.

Por otro lado, las causas principales de muerte fueron de tipo infeccioso (n=19), sobre todo metritis (n=7), neumonías (n=6) y peritonitis (n=4), pero no se encontraron diferencias entre grupos. De estas lesiones se aislaron principalmente *Pasteurella multocida* (55% de los animales) y *Staphylococcus aureus* (22% de los animales), sin diferencias entre los grupos. Estos resultados difieren con estudios anteriores, en los que la bacteria más comúnmente aislada de procesos supurativos, como los observados en este trabajo, fue *S. aureus* (Segura et al., 2007).

**Tabla 3.** Análisis estadístico de las causas de baja de cada tipo de alojamiento.

	POL	ALPRO	PLAT	CLAS	COL
<b>Bajas</b>	40.0 <sup>ab</sup>	33.3 <sup>a</sup>	30.0 <sup>a</sup>	43.3 <sup>ab</sup>	60.0 <sup>b</sup>
<b>Muertas</b>	16.7	23.3	10.0	23.3	16.7
<b>Eliminadas</b>	23.3 <sup>ab</sup>	10.0 <sup>a</sup>	20.0 <sup>ab</sup>	20.0 <sup>ab</sup>	43.3 <sup>b</sup>
<b>Problemas reproductivos</b>	16.7 <sup>ab</sup>	3.3 <sup>a</sup>	16.7 <sup>a</sup>	10.0 <sup>ab</sup>	23.3 <sup>b</sup>
<b>Abscesos</b>	0.0 <sup>a</sup>	6.7 <sup>ab</sup>	3.3 <sup>ab</sup>	10.0 <sup>ab</sup>	13.3 <sup>b</sup>

Valores en porcentajes sobre el total de animales de cada grupo.

a, b: valores medios en el mismo grupo de datos significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

POL: polivalente; ALPRO: alta y profunda; PLAT: con plataforma; CLAS: clásica; COL: colectiva.

Como conclusión, el grupo de conejas ubicadas en alojamiento colectivo presentaron mayores niveles de haptoglobina al 5º parto y un mayor número de bajas respecto al resto de alojamientos, lo que podría estar relacionado con un mayor estrés e indicar un peor estado sanitario. Sin embargo, es necesario sumar estos resultados a otros parámetros (indicadores de estrés, test de conducta e indicadores productivos) para determinar qué tipo de alojamiento podría ser el más adecuado tanto para los animales como para los cunicultores.

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto ha sido financiado conjuntamente por el INIA e INTERCUN (CUN2014-00001-00-00), la Generalitat Valenciana (contrato predoctoral Sara Pérez) y la Universidad CEU Cardenal Herrera (INDI16/07, contratos predoctorales de Asunción Muñoz y Elena Moreno). Han participado también el Centro de Tecnología Animal (CITA) del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y la Universidad de Zaragoza (UNIZAR).

## BIBLIOGRAFÍA

Archetti I., Tittarelli C., Cerioli M., Brivio R., Grilli G., Lavazza A. 2008. Serum chemistry and hematology values in commercial rabbits: preliminary data from industrial farms in northern Italy. In Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, pp. 1147-1152.

Argente M.J., de la Luz García M., Birlanga V., Muelas R. 2014. Relationship between cortisol and acute phase protein concentrations in female rabbits. *The Veterinary Journal*, 202(1): 172-175.

Davis A.K., Maney D.L., Maerz J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22: 760-772.

Dishlyanova E., Georgieva T.M., Petrov V., Zapryanova D., Marutsov P., Dinev I., Nikiforov I., Georgiev I.P. 2011. Blood haptoglobin response in rabbits with experimentally induced *Staphylococcus aureus* infection. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 162(11): 514-518.

El-Deeb W.M. 2013. Clinicobiochemical investigations of gangrenous mastitis in does: immunological responses and oxidative stress biomarkers. *Journal of Zhejiang University Science B*, 14(1): 33-39.

**Hoy S., Verga M.** 2006. Welfare indicators. En “Recent advances in rabbits sciences”, Ed. L. Maertens y P. Coudert. Institute for Agricultural and Fisheries Research (ILVO), Melle (Belgium), pp. 71-74.

**Marai I.F.M., Habeeb A.A.M., Gad A.E.** 2002. Rabbits’ productive, reproductive and physiological performance traits as affected by heat stress: a review. *Livestock Production Science*, 78(2): 71-90.

**Rosell J.M., De La Fuente L.F.** 2008. Health and body condition of rabbit does on commercial farms. In Proceedings of the *9th World Rabbit Congress*, Verona, Italy, Accessed January (Vol. 2012, pp. 1065-1069).

**Saffarzadeh M., Juenemann C., Queisser M.A, Lochnit G., Barreto G., Galuska S.P, Lohmeyer J., Preissner K.T.** 2012. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PloS one*, 7(2): e32366.

**Segura P., Martinez J., Peris B., Selva L., Viana D., Penadés J.R., Corpa J.M.** 2007. Staphylococcal infections in rabbit does on two industrial farms. *Veterinary Record*, 160: 869-873.

# EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UNA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON DIFERENTES CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN CONEJOS COMERCIALES: RESULTADOS PRELIMINARES

## *Evaluation of the effect of an experimental infection in commercial rabbits with different strains of Staphylococcus aureus: preliminary results*

---

Muñoz-Silvestre A.\*, Pérez-Fuentes S., Moreno-Grúa E., Selva L.,

Arnau-Bonachera A., Viana D., Corpa J.M.

Instituto CEU de Ciencias Biomédicas (Grupo de Patología y Sanidad Animal), PASAPTA,

Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities,

Av. Seminario s/n, 46113 Moncada, Valencia, España

\*Dirección de contacto: [asuncion.munoz@uchceu.es](mailto:asuncion.munoz@uchceu.es)

---

### RESUMEN

*Staphylococcus aureus* es una bacteria capaz de sobrevivir en una gran variedad de ambientes y de producir diferentes tipos de lesiones tanto en humanos como en animales. Esta bacteria puede afectar a conejos de diferentes edades y desarrollar lesiones supurativas. En el presente trabajo se plantea comparar las lesiones y la respuesta inmunitaria desarrolladas en los animales tras la inoculación intradérmica de diferentes cepas de *S. aureus*. La cepa ST121 aislada de conejo es capaz de producir lesión y de desencadenar una potente respuesta inmunitaria en todos los animales inoculados. Esta misma cepa produce lesiones más leves cuando se restablece el gen *rot* y con la mutación de un nucleótido en el gen *dltB*, dando lugar a un menor número de granulocitos y monocitos circulantes en sangre. Estos hallazgos preliminares confirman que las características genéticas de las bacterias son fundamentales para el desarrollo de las lesiones, y que concretamente los genes *rot* y *dltB* participan en la patogenicidad de *S. aureus* cuando infecta al conejo.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, cepa, lesión, inmunidad.

### ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is a bacterium able to survive in a variety of environments and produce different types of lesions in both humans and animals. It can affect rabbits of different ages and develop suppurative lesions. An experimental infection was designed in order to compare lesions and immune response developed by the animal after intradermal inoculation using several *S. aureus* strains. One hundred per cent of the animals infected with the strain ST121 isolated from rabbit farms developed lesions and established a potent immune response. When this strain contains the *rot* gene or with the mutation of a nucleotide in the *dltB* gene, it produces mild lesions and lower levels of granulocytes and monocytes in blood. These preliminary findings confirm the genetic characteristics of the bacterium are essential for

the development of lesions, and as well *rot* and *dltB* take part of the staphylococcal disease in rabbits.

**Keywords:** Staphylococcus aureus, strain, injury, immunity.

## INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus aureus* es una bacteria que durante mucho tiempo fue considerada como un patógeno comensal y oportunista en humanos, pero tras ser aislada a partir de diferentes especies de animales vertebrados, se hizo evidente su capacidad de sobrevivir en diferentes hospedadores. Así pues, las cepas de *S. aureus* que conviven durante muchos años con una determinada especie pueden desarrollar mecanismos específicos para contrarrestar el sistema inmune del huésped (Fitzgerald, 2012).

Las repercusiones sanitarias, y por ende económicas, que *S. aureus* representa para la ganadería comercial son bien conocidas por el sector cunícola, donde se pueden encontrar individuos en diferentes estados fisiológicos y productivos afectados por esta bacteria (Segura et al., 2007; Corpa et al., 2009). Las cepas de *S. aureus* pertenecientes al clon ST121 son las que se aíslan con mayor frecuencia en las explotaciones cunícolas (Viana et al., 2007; Viana et al., 2011). Este genotipo (ST121) también se encuentra relacionado con dermatitis en humanos (Vancraeynest et al., 2006), y se ha descrito la implicación de una mutación en el gen *dltB* para conferir virulencia frente a los conejos a una cepa humana ST121 (Viana et al., 2015).

Las infecciones producidas por *S. aureus* son causa frecuente de lesiones supurativas en la piel, que se caracterizan por una abundante afluencia de células inflamatorias (neutrófilos), y su posterior organización en el lugar de la infección (Kobayashi et al., 2015; Malachowa et al., 2015). Estudios previos de nuestro grupo de investigación ponen de manifiesto que las características genéticas de cepas de *S. aureus* condicionan el desarrollo y la evolución de las lesiones, determinando así su grado de virulencia (Guerreo et al., 2015). Por todo ello, con el objetivo de ampliar el conocimiento acerca de la interacción entre el agente patógeno y el hospedador, en este trabajo se pretende estudiar la capacidad para producir lesión de cepas modificadas genéticamente, en un modelo de infección experimental en piel de conejo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Cepas y animales empleados*

Para realizar las infecciones experimentales se establecieron cuatro grupos, utilizándose así cuatro cepas ST121 de *S. aureus*, una de ellas aislada de conejo (Jwt) y las tres restantes eran cepas modificadas genéticamente (Jwt-rot<sup>+</sup>, FdltB<sup>r</sup>, Jwt-dltB<sup>h</sup>), y se emplearon 180 conejos (*Oryctolagus cuniculus*) de dos meses de edad (Tabla 1).

### *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). El inóculo bacteriano estuvo constituido por 300 unidades formadoras de colonias contenidas en 100 µL de PBS (“Phosphate Buffer Saline”). En cada conejo se dispusieron dos puntos de inoculación intradérmica situados en la región lumbar (a ambos lados del raquis) con una aguja hipodérmica (25G). La zona de inoculación fue previamente rasurada.

### *Examen macroscópico y toma de muestras*

Durante el período experimental se llevó a cabo un seguimiento diario de la evolución de las lesiones en la piel, anotando sus medidas (tamaño del nódulo) y sus características macroscópicas (presencia de eritema, inflamación, dermonecrosis, etc.), así como el estado general de los animales (temperatura rectal).

Diez animales fueron sacrificados en cada tiempo de muestreo, y de cada animal se tomó una muestra de sangre para caracterizar la respuesta inmunitaria periférica (citometría de flujo), así como muestras de tejido lesionado para realizar estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos, y recuentos bacterianos. Por otra parte, también se llevaron a cabo estudios bacteriológicos a partir de muestras de sangre y riñón para descartar septicemia. Tras el estudio detallado de la cepa Jwt se establecieron los tiempos de muestreo para las cepas restantes (Tabla 1).

**Tabla 1.** Cepas, número de animales y tiempos de muestreo empleados en este estudio.

Cepa de <i>S. aureus</i>	Descripción de la cepa bacteriana	Número de animales inoculados	Tiempos de muestreo (días p.i.)
Jwt	Cepa aislada de conejo. Utilizada como control.	90	0, 1/2, 1, 2, 3, 7, 14, 21 y 28
Jwt-rot <sup>+</sup>	Cepa de origen cunícola a la que se le introduce el gen regulador <i>rot</i> (Saïd-Salim et al., 2003).	30	1, 3 y 7
FdltBr <sup>+</sup>	Cepa de origen humano. Modificada en <i>dltB</i> para imitar a la Jwt (Viana et al., 2015).	30	1, 3 y 7
Jwt-dltB <sup>h</sup>	Cepa de origen cunícola a la que se le revierte la mutación descrita en <i>dltB</i> para imitar a la cepa humana (Viana et al., 2015).	30	1, 3 y 7

### Análisis por citometría de flujo

La respuesta inmunitaria periférica se caracterizó mediante citometría de flujo. El análisis se realizó sobre 1 mL de sangre periférica extraída de la arteria auricular central de cada conejo y recogida en tubos con EDTA. Previo al marcaje celular con anticuerpos, el conteo y porcentaje de los leucocitos fue determinado con un analizador hematológico (MEK-6410, Nihon Kohden, Japan). La sangre se procesó según el protocolo descrito por Guerrero et al. (2011), con algunas modificaciones. Las poblaciones celulares que se analizaron fueron los linfocitos B, T (y las subpoblaciones CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup>), monocitos y granulocitos. La densidad de la suspensión celular se ajustó por el conteo en cámara de Neubauer a 10<sup>6</sup> leucocitos/mL. Para realizar el estudio de la respuesta inmunitaria celular a nivel periférico mediante la técnica de citometría de flujo se emplearon los anticuerpos recogidos en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Anticuerpos monoclonales usados en la técnica de citometría de flujo.

Anticuerpos monoclonales	Células diana	Compañía
Mouse anti-rabbit T lymphocytes: FITC	Linfocitos T	AbD Serotec
Mouse anti-rabbit IgM (B cell marker)	Linfocitos B	AbD Serotec
Mouse anti-rabbit CD4	Linfocitos T CD4 <sup>+</sup>	AbD Serotec
Mouse anti-rabbit CD8	Linfocitos T CD8 <sup>+</sup>	Kingfisher Biotech
Mouse anti-rabbit CD25	Linfocitos T CD25 <sup>+</sup>	AbD Serotec
Mouse anti-human CD14: FITC	Granulocitos y monocitos	AbD Serotec
Mouse anti-rabbit α-CD45	Leucocitos	VMRD Inc.



### **Estudios histopatológicos**

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.

### **Análisis estadístico**

Todas las variables se evaluaron estadísticamente utilizando como efectos fijos la cepa, el tiempo y la interacción entre ambos. Para las distintas poblaciones leucocitarias, se utilizó un modelo lineal (Proc GLM; SAS, 2002). Para la evaluación de las lesiones macroscópicas se utilizó un modelo mixto (Proc MIXED; SAS, 2002), en el que se incluyeron como efectos aleatorios el efecto del individuo y el error.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La inoculación con la cepa ST121 de origen cunícola (Jwt) dio lugar a la formación de pápulas eritematosas en la piel de todos los animales a las 24 hpi, y estas lesiones se correspondieron con un incremento del número de células inflamatorias (PMNs) a nivel microscópico, coincidiendo además con un aumento significativo ( $P<0,001$ ) del número de granulocitos sanguíneos. A las 72 hpi las lesiones (nódulos) incrementaron su tamaño de manera notable debido a la gran afluencia de heterófilos y la presencia de fenómenos vasculares. Además, los abscesos estaban rodeados de una banda eosinófila y mostraban fenómenos de Splendore-Hoeppli en su interior. Asimismo, en este mismo momento destacó también el aumento ( $P=0,007$ ) del número total de linfocitos sanguíneos. Al 7° dpi las lesiones se caracterizaron por mostrar dermonecrosis y abrirse, drenando el contenido purulento, apareciendo fenómenos de reparación como presencia de tejido de granulación, disminución progresiva del número de células inflamatorias, y reepitelización de la zona. Durante esta fase de recuperación tuvieron lugar además sendos aumentos significativos ( $P<0,001$ ) de las poblaciones sanguíneas de granulocitos y monocitos a los 7 y 14 dpi.

En cuanto a los resultados obtenidos tras la inoculación de las cepas Jwt-*rot*<sup>+</sup>, *FdltB*<sup>r</sup> y Jwt-*dltB*<sup>h</sup> destacaron las diferencias en la gravedad y tamaño de las lesiones, siendo más leves para las tres cepas modificadas genéticamente, y que se caracterizaron mayoritariamente por signos de inflamación (eritema). El área de la lesión eritematosa guardó relación con la cepa inoculada y con el tiempo post-inoculación ( $P=0,018$ ), de manera que mientras la Jwt registró las mayores medidas al 1<sup>er</sup> dpi, las cepas restantes dieron lugar a lesiones eritematosas de menor tamaño. Cuando se desarrollaron nódulos, éstos fueron más pequeños ( $P=0,008$ ) en las cepas mutantes y mostraban características microscópicas distintas a la cepa Jwt.

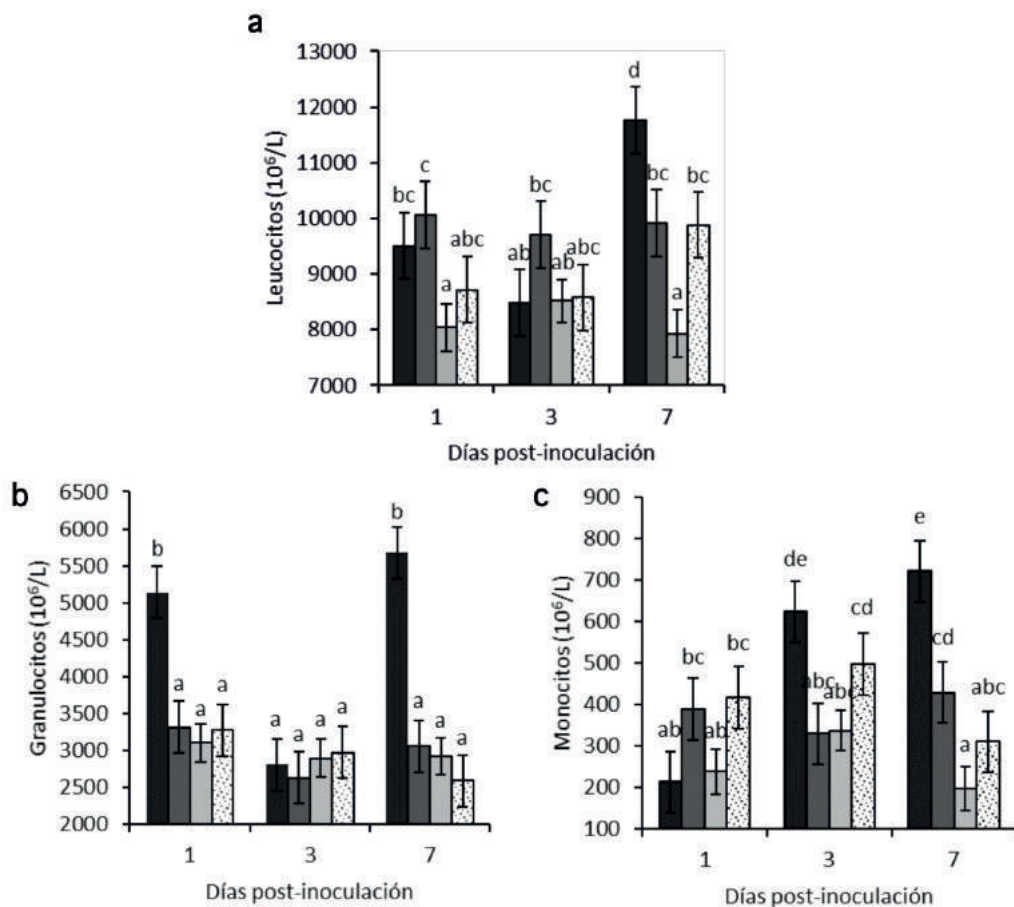
Por otra parte, fueron también destacables las diferencias encontradas en la respuesta inmune periférica inducida por las cepas Jwt-*rot*<sup>+</sup>, *FdltB*<sup>r</sup> y Jwt-*dltB*<sup>h</sup>, con respecto a la cepa Jwt (Tabla 3). De este modo, los recuentos de leucocitos sanguíneos fueron menores significativamente en los animales inoculados con la cepa *FdltB*<sup>r</sup> ( $P<0,001$ ), coincidiendo además que este grupo de animales también registró el menor número de linfocitos totales y monocitos ( $P<0,001$ ). Además, la variación en el número de leucocitos también dependió del tiempo de muestreo ( $P=0,018$ ), de forma que el grupo inoculado con la Jwt manifestó un incremento a las 24 hpi y un valor máximo ( $11760 \pm 598 \times 10^6$  leucocitos/L) al 7° dpi, mientras que el comportamiento de los leucocitos en los otros grupos fue menos variable (Figura 1<sup>a</sup>). Asimismo, cabe decir que el recuento de monocitos también fue inferior en los animales inoculados con las cepas Jwt-*rot*<sup>+</sup> y Jwt-*dltB*<sup>h</sup> con respecto a la Jwt, y los valores sanguíneos de esta población celular también difirieron a lo largo del período experimental ( $P=0,003$ ), manteniendo una tendencia constante para las cepas Jwt-*rot*<sup>+</sup> y Jwt-*dltB*<sup>h</sup>, mientras que en el grupo control (Jwt) aumentaron su número a partir del 3° dpi, hasta alcanzar su máximo valor ( $721 \pm 74 \times 10^6$  monocitos/L) a los 7 dpi (Figura 1c).

**Tabla 3.** Efecto de la cepa de *S. aureus* sobre las poblaciones de leucocitos sanguíneos (106/L) tras la inoculación intradérmica.

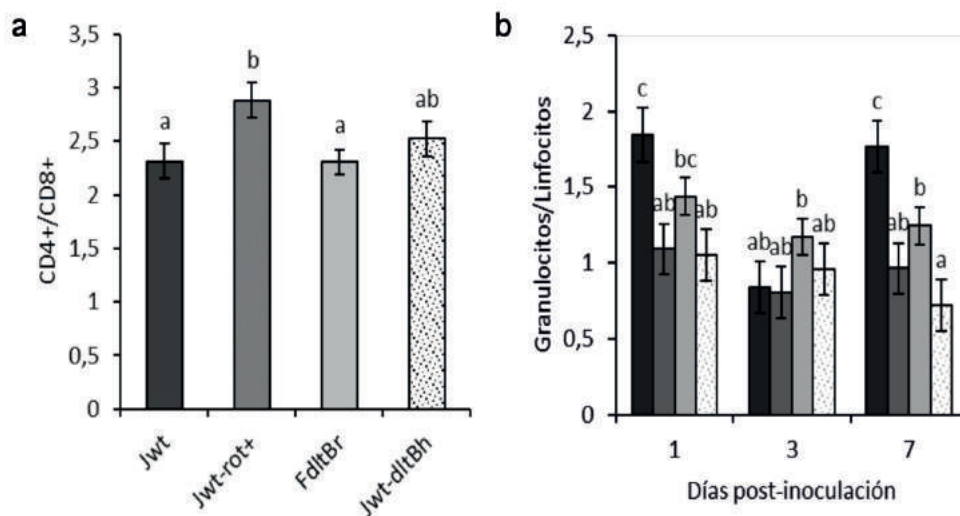
	Cepa de <i>S. aureus</i>				EEM	P-valor		
	Jwt	Jwt-rot <sup>+</sup>	FdltB <sup>r</sup>	Jwt-dltB <sup>h</sup>		Cepa	Tiempo	CxT
<b>Leucocitos</b>	9917 <sup>b</sup>	9897 <sup>b</sup>	8163 <sup>a</sup>	9060 <sup>b</sup>	322	<0,001	0,024	0,018
<b>Granulocitos</b>	4539 <sup>b</sup>	2999 <sup>a</sup>	2972 <sup>a</sup>	2944 <sup>a</sup>	188	<0,001	0,004	0,001
<b>Linf. totales</b>	3211 <sup>b</sup>	3374 <sup>b</sup>	2474 <sup>a</sup>	3517 <sup>b</sup>	134	<0,001	0,033	0,472
<b>Linfocitos B</b>	15,33 <sup>b</sup>	0,52 <sup>a</sup>	12,31 <sup>b</sup>	1,35 <sup>a</sup>	2,77	0,002	0,295	0,389
<b>Linfocitos T</b>	1486 <sup>a</sup>	2267 <sup>b</sup>	1730 <sup>a</sup>	2190 <sup>b</sup>	103	<0,001	0,773	0,482
<b>T CD4<sup>+</sup></b>	836 <sup>a</sup>	1449 <sup>b</sup>	983 <sup>a</sup>	1360 <sup>b</sup>	66	<0,001	0,566	0,325
<b>T CD8<sup>+</sup></b>	392,0 <sup>a</sup>	558,2 <sup>b</sup>	416,0 <sup>a</sup>	593,7 <sup>b</sup>	34,6	<0,001	0,674	0,744
<b>T CD25<sup>+</sup></b>	8,16 <sup>a</sup>	22,04 <sup>b</sup>	19,90 <sup>b</sup>	23,28 <sup>b</sup>	2,55	0,004	0,667	0,810
<b>Monocitos</b>	519,4 <sup>c</sup>	382,4 <sup>b</sup>	257,3 <sup>a</sup>	408,1 <sup>b</sup>	39,8	<0,001	0,020	0,003

a, b, c: Las medias que en una misma línea comparten letra no son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) para la cepa. EEM: error estándar de la media. C: cepa. T: tiempo.

En cuanto al número de granulocitos en sangre, los tres grupos mutantes (Jwt-rot<sup>+</sup>, FdltB<sup>r</sup> y Jwt-dltB<sup>h</sup>) presentaron recuentos inferiores a los animales inoculados con la Jwt ( $P < 0,001$ ) (Tabla 3), y su evolución en el tiempo permaneció constante mientras que los animales infectados con Jwt mostraron un pico en el número de granulocitos a las 24 hpi, disminuyó de manera significativa a los 3 dpi, volviendo a manifestar un incremento a los 7 dpi ( $P = 0,001$ ) (Figura 1b). Respecto a las poblaciones de linfocitos, los animales inoculados con las cepas Jwt-rot<sup>+</sup> y Jwt-dltB<sup>h</sup> manifestaron un menor número de linfocitos B ( $P = 0,002$ ), pero mayor recuento de linfocitos T, y de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> ( $P < 0,001$ ), mientras que el número de linfocitos T CD25<sup>+</sup> fue superior en los tres grupos al ser comparados con la Jwt ( $P = 0,004$ ) (Tabla 3). Además, la ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> fue superior en el grupo inoculado con la cepa Jwt-rot<sup>+</sup> ( $P = 0,026$ ) (Figura 2a). Por otra parte, la ratio granulocitos/linfocitos se vio afectada por la cepa empleada, de tal manera que presentó un valor inferior en los animales inoculados con las cepas Jwt-rot<sup>+</sup> y Jwt-dltB<sup>h</sup> con respecto a la Jwt ( $P = 0,002$ ), pero este ratio también presentó diferencias significativas dependiendo del tiempo post-inoculación ( $P = 0,025$ ), manteniendo una tendencia constante para las cepas Jwt-rot<sup>+</sup> y Jwt-dltB<sup>h</sup>, mientras que en el grupo control (Jwt) este valor aumentó al 1 y 3<sup>er</sup> dpi (Figura 2b).



**Figura 1.** Variación del número de (a) leucocitos, (b) granulocitos y (c) monocitos sanguíneos en función de la cepa de *S. aureus* (■ *Jwt*, ■ *Jwt-rot*<sup>+</sup>, ■ *FdltB*<sup>r</sup> y ■ *Jwt-dltB*<sup>h</sup>) y del tiempo post-inoculación (1, 3 y 7 dpi). <sup>a-e</sup>: Las medias para cada tiempo post-inoculación que comparten letra no son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) para la cepa



**Figura 2.** (a) Variación de la ratio  $CD4^+/CD8^+$  en función de la cepa de *S. aureus*. (b) Variación de la ratio granulocitos/linfocitos en función de la cepa de *S. aureus* (■ *Jwt*, ■ *Jwt-rot*<sup>+</sup>, ■ *FdltB*<sup>r</sup> y ■ *Jwt-dltB*<sup>h</sup>) y del tiempo post-inoculación (1, 3 y 7 dpi). <sup>a-c</sup>: Las medias para cada tiempo post-inoculación que comparten letra no son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) para la cepa.

En este trabajo se ha estudiado de manera experimental la capacidad de producir lesión de diferentes cepas de *S. aureus* en la piel del conejo. Los resultados obtenidos muestran que una cepa virulenta para el conejo puede desarrollar lesiones más leves en esta especie cuando se le restaura el gen *rot* o se revierte la mutación descrita para el gen *dltB*, y además esta mutación específica en el gen *dltB* no le confiere a una cepa de origen humano la misma virulencia que a la cepa salvaje cunícola (Jwt). Todo ello confirma que las variaciones genéticas estudiadas están implicadas en la patogenia de las infecciones en piel de conejo producidas por *S. aureus*.

## AGRADECIMIENTOS

El presente estudio ha sido financiado gracias a proyectos de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2014-53405-C2-2-P), la Generalitat Valenciana (Grupos de Investigación Emergentes GV/2015/090) y la Universidad CEU Cardenal Herrera (INDI-17/07). Asimismo, S. Pérez, A. Muñoz y E. Moreno han disfrutado de contratos predoctorales de la Generalitat Valenciana (S. Pérez) y la Universidad CEU Cardenal Herrera (A. Muñoz y E. Moreno).

## 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.

**Fitzgerald J.R.** 2012. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. *Trends in Microbiology*, 20(4):192-198.

**Guerrero I., Ferrian S., Blas E., Pascual J.J., Cano J.L., Corpa J.M.** 2011. Evolution of the peripheral blood lymphocyte populations in multiparous rabbit does with two reproductive managements rhythms. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 140: 75-81.

**Guerrero I., Ferrian 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.

**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.

**Saïd-Salim B., Dunman P.M., McAleese F.M., Macapagal D., Murphy E., McNamara P.J., Arvidson S., Foster T.J., Projan S.J., Kreiswirth B.N.** 2003. Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *The Journal of Bacteriology*, 185(2): 610-619.

**Segura P., Martinez 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 D., Denis O., Godard C., Wildemaue C., Hermans K.**, 2006. International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone. *Journal Veterinary Medicine B* 53, 418-422.

**Viana D., Comos M., McAdam P.R., Ward M.J., Selva L., Guinane C.M., González-Muñoz B.M., Tristan A., Foster S.J., Fitzgerald J.R., Penadés J.R.** 2015. A single natural nucleotide mutation alters bacterial pathogen host tropism. *Nature Genetics*, 47(4):361-366.

**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*, 190:403-407.

**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.

# CARACTERIZACIÓN DE CEPAS MRSA Y MSSA AISLADAS EN CONEJOS COMERCIALES. ESTUDIO PRELIMINAR

## *Characterization of MRSA and MSSA strains isolated in commercial rabbits. Preliminary study*

Moreno-Grua E.<sup>1\*</sup>, Pérez-Fuentes S.<sup>1</sup>, Muñoz-Silvestre A.<sup>1</sup>, Viana D.<sup>1</sup>, Fernández-Ros A.B.<sup>2</sup>,  
Sanz-Tejero C.<sup>2</sup>, Corpa J.M.<sup>1</sup>, Selva L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto CEU de Ciencias Biomédicas (Grupo de Patología y Sanidad Animal), PASAPTA,  
Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities,  
Av. Seminario s/n, 46113 Moncada, Valencia, España

<sup>2</sup> EXOPOL Autovacunas y Diagnóstico,  
Pol. Río Gállego D-8, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza, España

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

### RESUMEN

Los *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) son bacterias causantes de enfermedades graves e incluso mortales en humanos. Estas bacterias, tradicionalmente relacionadas con infecciones en humanos, también se han aislado en el ganado (LA-MRSA). El clon de MRSA asociado a la ganadería es el ST398, que inicialmente se identificó en cerdos, pero en los últimos años también se ha aislado en otros animales. Únicamente hay un caso descrito de LA-MRSA en una granja cunícola italiana, en la cual se aisló el clon ST398 determinado por la técnica MLST (Multilocus sequence typing). El objetivo de este trabajo es estudiar la presencia de genes de resistencia y virulencia de diferentes cepas aisladas de conejos en granjas comerciales y caracterizar el fenotipo de resistencias frente a antibióticos de estas cepas. Para ello, se analizaron diferentes aislados de *S. aureus* obtenidos de diferentes tipos de lesiones recogidas en granjas comerciales de España y Portugal, detectando el gen de resistencia a meticilina *mecA*.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, MRSA, LA-MRSA, Conejo.

### ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a bacterium that cause serious and even deadly diseases in humans. This bacterium are traditionally associated with human origin, but have now been found associated with affecting livestock (LA-MRSA). The clone of MRSA associated with livestock is the ST398 that was initially associated with the pig, but later was isolated in other production animals. Previously only one case of LA-MRSA had been reported in a rabbit production farm in Italy, the clone that was isolated in this farm was ST398 determined by MLST (Multilocus sequence typing). The objective of this work is to study the presence of resistance and virulence genes of different strains isolated from rabbits in commercial farms and to characterize the phenotype of resistance to antibiotics of these strains. For this purpose, we analyze different *S. aureus* isolates obtained from different lesion types collected from Spanish and Portuguese rabbit commercial farms, detecting the methicillin-resistant gene *mecA*.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, MRSA, LA-MRSA, Rabbit.

## INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus aureus* es una bacteria que afecta a numerosas especies animales y a humanos. Es un microorganismo ubicuo, difícil de eliminar ya que colonizan ambientes muy dispares, formando parte de la microbiota habitual de la piel, garganta y las fosas nasales de sus hospedadores y pudiendo provocar diversos procesos patógenos. Posee numerosos factores de virulencia (Simpson et al., 2003; Vancraeynest et al., 2004) que hacen que *S. aureus* sea la causa de numerosas infecciones en mamíferos, que van desde afecciones superficiales de la piel a patologías severas como neumonías, meningitis, intoxicaciones alimentarias y shock séptico. En cunicultura la estafilococia ocasiona graves pérdidas económicas, ya que afecta a todos los niveles de la producción, provocando principalmente mastitis y pododermatitis en hembras reproductoras y piodermas en gazapos, aunque también son comunes las otitis y las rinitis (Corpa et al., 2009).

Uno de los problemas más importantes que surgen a la hora de combatir este patógeno son las resistencias a los antibióticos. El aumento de estas resistencias en los últimos años se ha convertido en un problema grave de salud pública. Una de las resistencias que más importancia adquiere, en especial en esta bacteria, es la resistencia a la meticilina. El complejo clonal de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), ampliamente relacionado con la ganadería (LA-MRSA), es el CC398. Este complejo clonal se describió por vez primera en 2005, habitualmente coloniza al cerdo (Armand-Lefevre et al., 2005, Conceição et al., 2017), pero también se ha aislado en infecciones estafilocócicas en caballos, vacas y pollos (Graveland et al., 2011). Este clon juega un importante papel como reservorio de transmisión al hombre (Frana et al., 2013); actualmente se asocia principalmente con la exposición profesional, pero puede ser de alta patogenicidad. Recientemente se ha detectado un homólogo de *mecA*, designado *mecC*, con una amplia distribución geográfica en Europa, e incluyendo una gran diversidad de hospedadores (Aires-de-Sousa, 2017). En cunicultura industrial solo hay descrito un caso de MRSA, en 2014 en una granja de Italia, producido por el complejo clonal asociado a la ganadería CC398 (Agnoletti et al. 2014). Sin embargo, el clon más prevalente de *S. aureus* en conejos determinado por MLST es el ST121, seguido del ST96 (Viana, 2009; Pérez-Fuentes et al., 2016).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron diferentes cepas de *S. aureus* aisladas de lesiones de conejos comerciales en diferentes granjas de la Península Ibérica. Las muestras se tomaron mediante una torunda estéril, 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 almacenaron 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.

Se realizó PCR del gen *mecA* de todos los aislados como se ha descrito previamente (Geha et al., 1994) y se empleó el gen ribosomal *rib1* presente en todas las cepas como control individual de cada muestra.

Se realizó PCR para detección de los genes *lukF/S-PV* que codifican para la toxina PVL y del gen *tst* que codifica para la toxina TSST-1 de los aislados MRSA. Por último, se evaluó mediante PCR la presencia del gen *van A* que confiere resistencia a vancomicina (Khairalla et al., 2017).

Se realizó antibiograma por la técnica de disco difusión en Mueller-Hinton agar de los aislados MRSA para evaluar el perfil de susceptibilidad a antibióticos. La técnica se realizó según las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). La técnica de disco difusión se realizó para 16 antibióticos: bacitracina (10U), enrofloxacin (5µg), vancomicina (30 µg) (OXOID); estreptomycin (10 µg), espiramicina (100 µg), sulfadiazina (25 µg), cloramfenicol (30 µg) (BD); amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg, respectivamente), doxiciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (30 µg), pe-

nicilina (10U), tetraciclina (30 µg), cefoxitina (30 µg) y trimetoprim/sulfametoxazol (1.25 µg / 23.75 µg, respectivamente) (BIO-RAD). Como cepa control se empleó la cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se evaluaron diferentes cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes lesiones de conejos comerciales. Las lesiones más frecuentes fueron mastitis, abscesos y pododermatitis. Otras lesiones provocadas por *S. aureus* en menor número fueron dermatitis, otitis, metritis, conjuntivitis, neumonía, rinitis, hepatitis, peritonitis, pericarditis y osteomielitis. También se analizaron cepas de *S. aureus* aisladas de conejos portadores nasales.

Para determinar la presencia del gen *mecA*, que confiere resistencia a la meticilina, se realizó PCR de este gen. De todas las muestras analizadas, se determinó la presencia del gen en 26 cepas.

Considerando el tipo de lesión, la mayor prevalencia de MRSA se detectó en muestras de hepatitis, seguido por neumonía, metritis y rinitis, otitis, conjuntivitis, mastitis, dermatitis y pododermatitis. Teniendo en cuenta las lesiones que *S. aureus* produce con mayor frecuencia en el conejo (mastitis, abscesos y pododermatitis), la mayoría fueron sensibles a meticilina.

La determinación rápida y precisa del fenotipo de resistencia a los antimicrobianos y de los mecanismos de resistencia tiene gran importancia, no sólo por las opciones de tratamiento, sino también por los riesgos para la salud pública (Woodford y Sundsfjord, 2005). La mayoría de los MRSA caracterizados en este estudio resultaron multirresistentes (resistentes a tres o más clases de antibióticos). Ninguna de las muestras MRSA presentaron los genes *vanA*, *tst* y *lukF/S-PV*. La vancomicina es un importante antibiótico empleado en humanos para tratar las infecciones por MRSA, por lo que la aparición de cepas resistentes a vancomicina (VRSA) es un problema global que afecta la salud pública (Wirtz et al., 2013). Ninguno de los aislados MRSA presentó el gen *vanA*, sin embargo uno de los aislados resultó resistente a vancomicina por la técnica de disco difusión en agar.

## CONCLUSIÓN

La detección de cepas de *S. aureus* aisladas de lesiones en conejos resistentes a meticilina es un hecho relevante, dado el preocupante incremento de resistencias a antibióticos y el riesgo de transmisión al hombre.

## AGRADECIMIENTOS

El presente estudio ha sido financiado gracias a sendos proyectos de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2014-53405-C2-2-P), la Generalitat Valenciana (Grupos de Investigación Emergentes GV/2015/090) y la Universidad CEU Cardenal Herrera (INDI 17/07 y contratos predoctorales de Elena Moreno Grua, Sara Pérez Fuentes y Asunción Muñoz Silvestre). Así mismo, quisiéramos dar las gracias a todos los veterinarios y ganaderos que han colaborado en la toma y remisión de las muestras.

## BIBLIOGRAFÍA

**Agnoletti F., Mazzolini E., Bacchin C., Bano L., Berto G., Rigoli R., Muffato G., Coato P., Tonon E., Drigo I.** 2014. First Reporting of Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) ST398 in an Industrial Rabbit Holding and in Farm-related People. *Veterinary Microbiology*, 170(1-2): 172-177.

**Aires-de-Sousa M.** 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(6):373-380.



- Armand-Lefevre L., Ruimy R., Andreumont A.** 2005. Clonal Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Healthy Pig Farmers, Human Controls, and Pigs. *Emerging Infectious Diseases*, 11(5): 711-714.
- Conceição T., de Lencastre H., Aires-de-Sousa M.** 2017. Frequent isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 among healthy pigs in Portugal. *PLoS one*, 12, e0175340.
- Corpa J. M., Hermans K., Haesebrouck F.** 2009. Main pathologies associated with *Staphylococcus aureus* infections in rabbits: a review. *World Rabbit Science*, 17: 115-125.
- Frana T.S., Beahm A.R., Hanson B.M., Kinyon J.M., Layman L.L., Karriker L.A., Ramirez A., Smith T.C.** 2013. Isolation and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Pork Farms and Visiting Veterinary Students. *PLoS One*, 8, e53738.
- Geha D.J., Uhl J.R., Gustafarro C.A. y Persing D.H.** 1994. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(7): 1768-1772.
- Graveland H., Duim B., van Duijkeren E., Heederik D., Wagenaar J.A.** 2011. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(8):630-4.
- Khairalla A., Wasfi R., Ashour H.M.** 2017. Carriage frequency, phenotypic, and genotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dental health-care personnel, patients, and environment. *Scientific Reports*, 7: 7390.
- 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.
- Simpson K.H., Bowden, G., Höök M., Anvari B.** 2003. Measurement of adhesive forces between individual *Staphylococcus aureus* MSCRAMMs and proteincoated surfaces by use of optical tweezers. *Journal of Bacteriology*, 185:2031-2035.
- Vancraeynest D., Hermans K., Haesebrouck F.** 2004. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Veterinary Microbiology*, 103:241-247.
- Viana D.** 2009. Estafilococia en conejos: relación entre genotipos, virulencia y lesiones (Tesis Doctoral). Moncada, Valencia: Universidad CEU Cardenal Herrera. Facultad de Veterinaria.
- Wirtz V.J., Taryn Vian T., Kaplan W.A., Simon J.L.** 2013. First Case of Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Europe Health Professionals in Syria. *The Lancet*, 382, 205.
- Woodford N., Sundsfjord A.** 2005. Molecular detection of antibiotic resistance: when and where?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(2): 259-261.

# ESTUDIOS DE EFICACIA POST-VACUNACIÓN PARA LA PREVENCIÓN DE LA NUEVA VARIANTE DE LA EHC

## *Design of a RHDV-2 prevention program based on efficacy of a European commercial vaccine*

Sánchez-Matamoros A.\*, Boix O., Ruiz M.C., Woodward M., Maldonado J.

HIPRA, Avda. De la Selva, 17170 Amer (Girona), España

\***Dirección de contacto:** almudena.sanchez@hipra.com

### RESUMEN

Tras la emergencia en 2010 de la nueva variante del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (EHC-2) en la península Ibérica, surgió la necesidad de aprobar en condiciones de emergencia una vacuna específica frente a EHC-2 como principal herramienta de control de la enfermedad. Esta premura limitó la información disponible de la vacuna en el momento de su registro, como podría ser la duración de la inmunidad generada por la vacuna. Por ello, este estudio tiene como objetivo evaluar la eficacia de la vacunación con ERAVAC® (HIPRA) en conejos hasta los 12 meses post-vacunación mediante desafíos heterólogos seriados y la monitorización de la respuesta serológica. Los resultados obtenidos demuestran que ERAVAC® induce una respuesta humoral robusta de los 7 días a los 12 meses post-vacunación, la cual es protectora frente a desafíos heterólogos virulentos. Por lo tanto, es factible pensar que la revacunación anual frente a EHC-2 en conejos vacunados bajo las condiciones descritas, sería suficiente para el control de la enfermedad en condiciones de campo.

**Palabras clave:** Enfermedad hemorrágica del conejo, EHC-2, eficacia vacunal, monitorización serológica, programa vacunal, prevención.

### ABSTRACT

After the emergence in 2010 of the new variant of the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV-2) in the Iberian Peninsula, the urgent need to develop a specific vaccine against RHDV-2 as the main tool to control the disease arose. The available information about the vaccine at the time of the outbreak, such as the duration of the immunity generated by the vaccine, was limited. Therefore, this study aimed to evaluate the efficacy of the ERAVAC® (HIPRA) vaccination in rabbits up to 12 months post-vaccination through serial heterologous challenges and serological response monitoring. The results obtained show that ERAVAC® induces a robust humoral response from 7 days to 12 months post-vaccination, which is protective against virulent heterologous challenges. Therefore, it is feasible to conclude that the annual revaccination against RHDV-2 in rabbits vaccinated under the described conditions would be adequate for the control of the disease in field conditions.

**Keywords:** Rabbit haemorrhagic disease, RHDV-2, vaccine efficacy, serological monitoring, vaccination program, prevention.

### INTRODUCCIÓN

La enfermedad hemorrágica del conejo (EHC) es una de las enfermedades con una mayor letalidad que afectan a los conejos, siendo la vacunación la principal herramienta para prevenir y controlar sus consecuencias

en las explotaciones cunícolas (OIE, 2016). Ante la aparición de una nueva variante de la enfermedad (EHC-2) con características clínicas y virológicas divergentes de la presentación clásica, las autoridades europeas llevaron a cabo la autorización en condiciones de emergencia de diferentes vacunas comerciales. La razón principal de esta autorización de emergencia fue la ausencia de protección cruzada entre las vacunas clásicas y la EHC-2 (Bárcena et al., 2015). Esta premura se plasmó en una escasez de información acerca del comportamiento de la vacuna y la ausencia de planes de vacunación para prevenir la enfermedad, entre otras cosas por la presencia de enfermedad clínica en animales de diversa edad y estado fisiológico.

Por ello, el objetivo de este estudio es evaluar la eficacia de ERAVAC®, vacuna comercial frente EHC-2 registrada por la Agencia Europea del Medicamento, en conejos hasta los 12 meses post-inmunización. Estos resultados proporcionarán nueva información para determinar cuáles podrían ser las pautas de los programas de prevención frente a EHC-2 mediante vacunación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron dos estudios experimentales ciegos y controlados con conejos SPF de 35 días de vida, seronegativos a EHC-2. El primer estudio se realizó en 120 conejos aleatorizados en el grupo vacunado (GV) o en el grupo control (GC). El GV se inmunizó por vía subcutánea con ERAVAC® (HIPRA, España), mientras que el GC recibió PBS como placebo. La eficacia de la vacuna se evaluó mediante la realización de desafíos heterólogos (cepa virulenta aislada de un brote clínico en España) seriados a los 7 días post-vacunación (dpv), 3 y 6 meses post-vacunación (mpv) (Figura 1).



Figura 1. Diseño experimental del primer estudio.

De manera similar, se realizó un segundo estudio cuyo objetivo era ampliar el periodo de evaluación de la protección mediante la monitorización de la respuesta serológica desde los 7 dpv hasta 12 mpv junto con la realización de desafíos vacunales a los 9 y 12 mpv (Figura 2). Para ello se utilizaron un total de 69 conejos distribuidos aleatoriamente en el grupo vacunado (GV) o en el grupo control (GC). Los animales fueron inmunizados de manera similar al primer estudio.

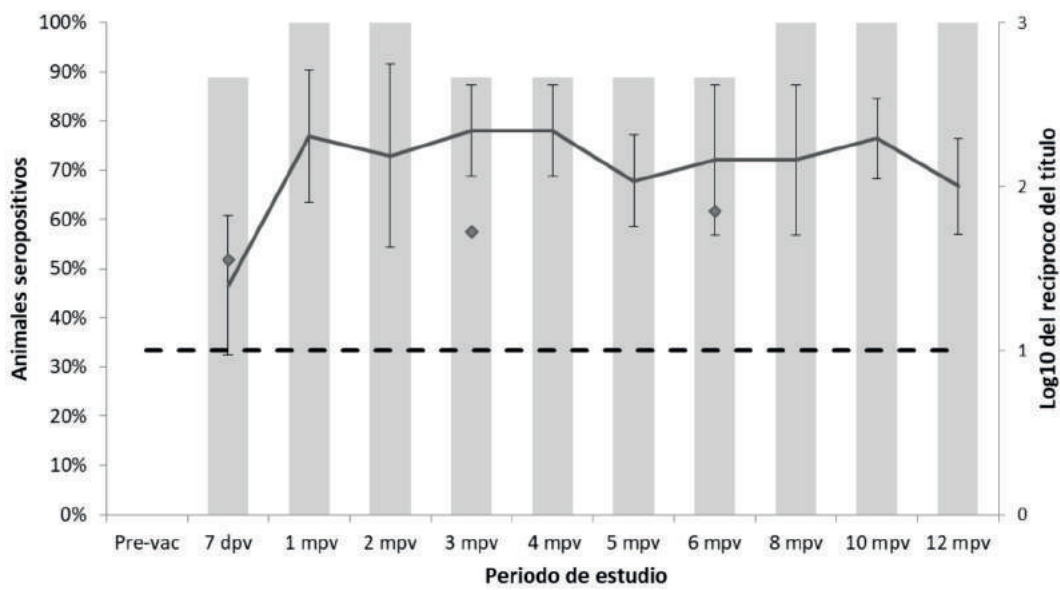


Figura 2. Diseño experimental del segundo estudio.

En ambos estudios, la respuesta serológica se evaluó usando un ELISA de competición (OIE, 2016), mientras que la evaluación de la protección se basó en la observación diaria durante los 7 días post-infección (dpi) de signos clínicos y mortalidad.

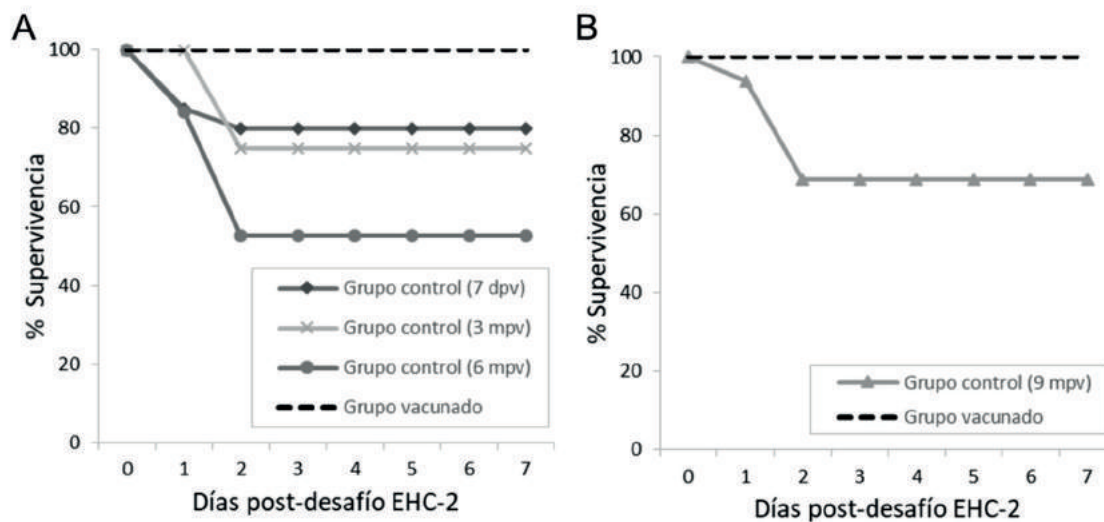
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En ambos estudios la vacunación indujo seroconversión en el 100% de los animales en el GV hasta el final del periodo de observación (6 y 12 mpv en el primer y segundo estudio, respectivamente) (Figura 3). Así mismo, los animales en el GC permanecieron seronegativos en todos los estudios.



**Figura 3.** Porcentaje de animales seropositivos (barras) y cinética de la respuesta serológica (línea) en conejos tras la vacunación con ERAVAC® en el segundo estudio, así mismo en la figura se encuentra los títulos de anticuerpos a los diferentes tiempos de desafío del primer estudio (rombos). Los títulos de anticuerpos se expresan como la media geométrica del título de anticuerpos recíproco, expresado como log10. Los sueros con títulos superiores a 1/10 (log10, 1) se consideraron positivos (línea punteada negra).

Los resultados obtenidos tras el desafío de los animales vacunados con una cepa heteróloga virulenta permiten extrapolar la eficacia de la vacuna empleada frente a otros virus de campo. Esta observación se sustenta en que aunque GC y GV fueron sometidos al mismo desafío en los dos estudios, la inoculación del virus de la EHC-2 en los animales del GC provocó una tasa de mortalidad acumulada que variaba entre el 20 y el 47% (Figura 4). Por el contrario, tras el desafío de los animales del GV se determinó una tasa de supervivencia del 100% (Figura 4). Por último destacar que la vacunación confirió una protección clínica completa o casi completa (95-100%) en todos los desafíos realizados.



**Figura 4.** Tasa de supervivencia tras el desafío de los animales en los grupos de control y los grupos vacunados desafiados con un virus heterólogo de EHC-2 en el 1er estudio (A) y 2º estudio (B). Las tasas de supervivencia se observaron diariamente hasta 7 días. Los grupos vacunados están representados por la línea negra discontinua. Los grupos de control están representados por rombos (7 dpv), cruces (3 mpv), círculos (6 mpv) y triángulos (9 mpv).

Por razones éticas y de bienestar en el segundo estudio no se pudo realizar el desafío a los 12 mpv. Sin embargo se pudieron obtener las muestras para evaluar la respuesta serológica. Este análisis serológico mostró que el 100% de los animales en GV eran seropositivos con niveles de anticuerpos similares a los cuantificados a 1 y 10 mpv ( $p < 0,05$ ). Así mismo, el título de anticuerpos era significativamente mayor a los 12 mpv que los niveles de anticuerpos que se detectaban a los 7 dpv ( $p > 0,05$ ). Dada la gran importancia de la respuesta humoral en la protección frente a la EHC (OIE, 2016), el título de anticuerpos específicos detectado a los 12 mpv permitiría predecir protección ante un eventual desafío natural en campo, como así lo demuestran los desafíos previos en los dos estudios.

Los resultados obtenidos en este estudio de la eficacia de la vacuna, tanto en los desafíos realizados como en la evaluación de la respuesta serológica, permiten especular que la vacunación anual sería suficiente para proteger a los conejos adultos empleados como reproductores de la enfermedad. Además, en el peor escenario de infección temprana la eficacia de la vacuna a los 7 dpv permitiría utilizar la inmunización de gazapos como tratamiento efectivo tras la infección de la explotación, como ha sido previamente descrito (OIE, 2016). Por último destacar que estos resultados están en consonancia con la eficacia de la vacuna reportada en el campo desde su introducción durante la epidemia. La vacunación frente a la EHC ha sido implementada por los veterinarios y ha permitido prevenir y controlar la enfermedad en los últimos años (Carvalho et al., 2017).

En resumen, este estudio demuestra que la vacunación con ERAVAC® estimula la respuesta humoral desde los 7 días hasta los 12 meses post-vacunación, la cual ha sido capaz de generar protección frente a desafíos heterólogos virulentos hasta los 9 mpv. Sin embargo la relación entre los niveles de anticuerpos y la protección observada permitiría predecir la protección de los animales hasta los 12 mpv. Por lo tanto, se podrían emplear programas de revacunación anual frente a EHC-2.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al personal de CEYC (HIPRA), especialmente X. Madeo y R. Pujol por su apoyo técnico y de laboratorio.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**Bárcena J., Guerra B., Angulo I., González J., Valcárcel F., Mata C.P., Castón J.R., Blanco E., Alejo A.** 2015. Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and new RHDV2 virus antigenicity, using specific virus-like particles. *Veterinary Research*, 46:106.

**Carvalho C.L., Leclerc Duarte E., Monteiro J.M., Afonso C., Pacheco J., Carvalho P., Mendonça P., Botelho A., Albuquerque T., Themudo P., Fevereiro M., Henriques A.M., Santos Barros S., Dias Duarte M.** 2017. Progression of rabbit haemorrhagic disease virus 2 upon vaccination in an industrial rabbitry: a laboratorial approach. *World Rabbit Science*, 25:73-85.

**OIE.** 2016. Capítulo 2.6.2 Enfermedad hemorrágica del conejo. *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2017*.

# THE STRESSFUL LIFE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS

## *La estresante vida de Staphylococcus aureus*

---

Gazzard N.<sup>1\*</sup>, Pérez- Fuentes S.<sup>2</sup>, Moreno-Grúa E.<sup>2</sup>, Muñoz-Silvestre A.<sup>2</sup>,

Selva L.<sup>2</sup>, Corpa J.M.<sup>2</sup>, Viana D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Veterinary Bio-Science UG, ERASMUS student at Universidad CEU Cardenal Herrera

<sup>2</sup> Instituto CEU de Ciencias Biomédicas (Grupo de Patología y Sanidad Animal),  
PASAPTA, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities,  
Av. Seminario s/n, 46113 Moncada, Valencia, España

\*Contact email: ng00174@surrey.ac.uk

---

### RESUMEN

*Staphylococcus aureus* causa abscesos subcutáneos, los cuales son difíciles de tratar con las terapias actuales e implican frecuentemente decomisos. Este trabajo describe la relación entre la respuesta al estrés de *S. aureus* y la patogenia del absceso. La respuesta al estrés se activa cuando las bacterias que se encuentran dentro del absceso se encuentran bajo estrés debido a la limitación de nutrientes y oxígeno y al estrés oxidativo desencadenado por los fagocitos. La respuesta al estrés está regulada principalmente por las enzimas RSH, por lo que este trabajo también describe la obtención de una cepa de *S. aureus* mutante en el gen RSH sintasa para poder caracterizar su interacción con la respuesta inmunitaria y el desarrollo de abscesos estafilocócicos en conejos.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, Respuesta al estrés, Mutante RSH sintasa, Absceso.

### ABSTRACT

A major health obstacle found in rabbits were subcutaneous abscesses caused by *Staphylococcus aureus* and were found to be the determinant of meat condemnation. *S. aureus* is one of the prevalent agents that causes subcutaneous abscess infections, which are difficult to treat with current therapies. This research examines the relationship between the stringent stress response of *S. aureus* and the intercellular mechanisms that can cause the pathology of the abscess, such as from the bacteria and how different factors can affect the pathology of the abscess. This stringent stress response is activated when the bacteria found within the abscesses are under significant stress, due to limited nutrients and oxygen as well as phagocyte-generated oxidative stress. The stringent stress response is regulated mainly by RSH enzymes, therefore this research also describes the deletion mutant in RSH synthase in order to characterize its interaction with the immune response and the development of rabbit staphylococcal abscess.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, Stringent stress response, RSH synthase mutant, Abscess.

### INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* is a Gram-positive bacteria with over thirty virulence factors (Viana et al., 2015), for being an opportunistic pathogen and versatile to many micro-environments (Corpa et al., 2009). It also needs to be highlighted that it is also contained in the normal flora within the skin, respiratory tract and the nasal passage (Selva et al., 2015).

The one health concept is a worldwide strategy that communicates healthcare between humans, animals and the environment. *S. aureus* is now come to the attention of the one health concept, as it is currently affecting all three topics. The most well-known strain of this bacteria is MRSA, a strain that is methicillin resistant and can be particularly destructive in the hospital setting. It is also a problem for livestock, affecting rabbits, pigs, cows and horses. A major health obstacle found in rabbitries were subcutaneous abscesses (most commonly found to be caused by *S. aureus*) and were found to be the cause of meat condemnation. *S. aureus* is found to be difficult to isolate and treat as it depends on the pathology and strain (Ferreira et al., 2014). As a result, this infection that occurs in the rabbit population potentially decreases the meat quality, consequently ending in big economic losses in the industry (Ferreira et al., 2014).

The stringent stress response of *S. aureus* is activated when the bacteria located within the cutaneous abscess are under significant stress, due to limited nutrients and oxygen as well as phagocyte-generated oxidative stress. The stringent stress response is regulated mainly by RSH enzymes.

The hypothesis of this work is that the RSH synthase gene is essential for the formation of staphylococcal abscesses, similar to that described in mouse models. Therefore, the aim of the present work was to generate a deletion mutant in RSH synthase in order to characterize its interaction with the immune response and the development of rabbit staphylococcal abscess.

## MATERIAL AND METHOD

In order to characterize the role of the stringent stress response that is mentioned above, the deletion mutant in RSH synthase in the rabbit strain Jwt (J wild-type) will be obtained using pMAD plasmid. The pMAD plasmid contains a replication origin for Gram-negative bacteria and a thermosensitive replication origin for Gram-positives. It also contains a gene that confers resistance to erythromycin in *S. aureus* and a gene that codifies for the enzyme  $\beta$ -galactosidase, which produces a blue-coloured metabolite when the substance X-gal is metabolized. This way, all bacteria containing the plasmid will be erythromycin-resistant and the produced colonies in presence of X-gal will be blue.

Firstly, the protocol preparation of competent *E. coli* through the method of  $\text{CaCl}_2$  is used. To be able to transform the pMAD inside the *E. coli*. Following with digestion and sequencing, to verify the plasmid is successfully within the vector.

After this the protocol preparation of competent *S. aureus* through the method of sucrose is used. To transform the pMAD to RN4220, this is a modified strain of *S. aureus* which makes the migration of the plasmid more accessible. Repeatedly the techniques of digestion and sequencing are used to authenticate the plasmid within the RN4220. The final step is repeatedly using the protocol of the competent *S. aureus* through the method of sucrose. To transform the plasmid from RN4220 into the Jwt, the wild-type strain found in rabbits. When the pMAD is within the *S. aureus* strains, other tests are conducted for authentication of the strains (blood agar and TSA+Erythromycin+x-gal plates are used).

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Function of RSH enzymes*

The main function of RSH enzymes is that it is the main mediator of the stringent stress response. However, there are other tasks that these enzymes carry out such as to synthesise (p)ppGpp which is an important alarmone, with a role that entails regulation of the cellular metabolism and resistance against phagocytosis (Geiger et al., 2012). When there is a change in the environment, the RSH enzymes respond by preserving and maintaining cellular resources (Geiger et al., 2012). This is achieved by increased levels of an alarmone called (p)ppGpp which regulates up to a third of all genes in the cell (Geiger et al.,



2012). The alarmone then redirects the bacteria's resources from growth towards amino acid synthesis, in favour of survival of the bacteria. This mechanism can also be seen to increase the mutation rate which increases the plasticity of the species using mobile genetic elements (MGEs), which transfer genetic material within species (Malachowa et al., 2010). MGEs are known to encode virulence factors and genes that confer resistance to antibiotics which are seen in MRSA (Malachowa et al., 2010).

### ***RSH enzymes and pathology of abscess***

The results from Mansour et al. (2016) suggests that RSH genes are needed to develop abscesses in a *S. aureus* cutaneous abscess mouse model. When analysing if the CFU of the abscess was affected by removing the RSH genes, the outcome was negative since *S. aureus* mutant was still capable to proliferate profoundly. The RSH genes should be regulating the proliferation of the bacteria to promote survival. Theoretically the bacteria population should have been concededly lower, as the RSH gene has not alerted the bacteria that they are under attack from the immune system. This result is also not related to the results of our team, where a correlation has been observed between the number of bacteria and the size of the lesions. More research needs to be conducted here ensure a explanation of why this occurs.

### ***RSH synthase mutant in rabbits Staphylococcus aureus***

*S. aureus* strain from a rabbit isolate mutant in the gene RSH synthase could be generated, by using the pMAD plasmid. The growth and survival ability of the mutant strain in a non-restrictive medium with homogenous conditions was similar to the wild strain. Therefore, one could follow up with the performance of the next trials in order to compare these strains in several experiments. In order to characterize the behaviour of rabbit *S. aureus* mutant strain in stress response, this will be evaluated by observing the capacity of survival of the mutant strain in the blood (*ex vivo*) and against antimicrobial peptide, Nisin (*in vitro*). These tests are used to evaluate the evasion capacity of the immune response. After the *in vitro* and *ex vivo* characterization, mutant strain will be tested in a experimental intradermic infection (*in vivo*). This model is characterized by reproducing natural lesions on the skin of rabbits with low doses of species-specific bacteria. The characterization of the stringent response with RSH synthase mutant could help explain the pathogenicity of rabbit strains and develop new strategies for the development of therapeutic tools.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

I would like to acknowledge Juan Manual Corpa Arenas, David Viana Martín and Laura Selva Martínez for their support in this project. Also a big thank- you to Sara Pérez Fuentes for taking me under her wing. To the girls (Asunción Muñoz Silvestre and Elena Moreno Grúa) in the laboratory for making myself feel extremely welcome during my stay.

## **BIBLIOGRAPHY**

**Corpa J.M., Hermans K., Haesebrouck F.** 2009. Main pathologies associated with *Staphylococcus aureus* infections in rabbits: a review. *World Rabbit Science*, 17(3): 115-125.

**Ferreira A., Monteiro J.M., Vieira-Pinto M.** 2014. The importance of subcutaneous abscess infection by *Pasteurella spp.* and *Staphylococcus aureus* as a cause of meat condemnation in slaughtered commercial rabbits. *World Rabbit Science*, 22(4): 311-317.

**Geiger T., Francois P., Liebeke M., Fraunholz M., Goerke C., Krismer B., Schrenzel J., Lalk M., Wolz C.** 2012. The Stringent Response of *Staphylococcus aureus* and Its Impact on Survival after Phagocytosis through the Induction of Intracellular PSMs Expression. *PLoS Pathogens*, 8(11): p.e1003016.

**Malachowa N., DeLeo F.** 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(18): 3057-3071.

**Mansour S., Pletzer D., de la Fuente-Núñez C., Kim P., Cheung G., Joo H., Otto M., Hancock R.** 2016. Bacterial Abscess Formation Is Controlled by the Stringent Stress Response and Can Be Targeted Therapeutically. *EBioMedicine*, 12: 219-226.

**Selva Martínez L., Viana D., Corpa Arena, J.** 2015. *Staphylococcus aureus* nasal carriage could be a risk for development of clinical infections in rabbits. *World Rabbit Science*, 23(3): 181-184.

**Viana D., Comos M., McAdam P., Ward M., Selva L., Guinane C., González-Muñoz B., Tristan A., Foster S., Fitzgerald J., Penadés J.** 2015. A single natural nucleotide mutation alters bacterial pathogen host tropism. *Nature Genetics*, 47(4): 361-366.