

Webi
ADESCU

NOVIEMBRE 24

De 18:30h a 20h

PATOLOGÍA: CORONAVIRUS Y CONTROL DE MIXOMATOSIS Y ENFERMEDAD HEMORRÁGICA VÍRICA

Comunicaciones libres

(Publicación provisional hasta que se publique el libro de actas)

Agentes patógenos asociados a patología digestiva en granjas cunícolas

Solans L, Arnal JL, Sanz C, Benito AA, Muñoz A, Alzuguren O, Fernández A

¿Es obligatoria la vacunación de conejos como animales de compañía en Andalucía?

Jaén Téllez JA

Caracterización de la inmunidad maternal de anticuerpos frente a RHDV-2 producida por una vacuna inactivada

Baratelli M, Molist-Badiola J, Puigredon-Fontanet A, Pascual M, Boix O, Mora-Igual FX, Woodward M, Lavazza A, Capucci L

Efecto de la vacunación en la carga viral y la protección frente a EHC-2

Sánchez-Matamoros A, Woodward M, Navas E, Boix O, Valls L

Estudio comparativo del casete cromosómico mec (SSCmec) en cepas de Staphylococcus aureus aisladas de conejos

Moreno-Grúa E, Pérez-Fuentes S, Selva L, Arnau A, Penadés JR, Corpa JM, Viana D



Agentes patógenos asociados a patología digestiva en granjas cunícolas

Pathogens associated to digestive disorders in commercial rabbitries

Solans L, Arnal JL, Sanz C, Benito AA, Muñoz A, Alzuguren O, Fernández A*

EXOPOL, Pol. Río Gállego, 50840 San Mateo de Gállego, Zaragoza, España. *afernandez@exopol.es

Abstract: Digestive disorders are the main cause of economic losses in rabbit farms. This article provides a global and updated overview since 757 recent clinical cases were studied (95 from suckling rabbits, 117 from preweaning rabbits and 545 from fattening rabbits). Etiological diagnosis was carried out by bacteriological culture and a set of qPCR tests for detection of EPEC, *Clostridium spiroforme*, *C. perfringens*, rotavirus A, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Eimeria spp.* EPEC is the most prevalent agent in suckling rabbits. *C. spiroforme* and EPEC are the more frequently detected pathogens in preweaning rabbits, but enterotoxigenic *B. fragilis* appears as a new possible emergent pathogen. In fattening rabbits, diverse co-infections between *C. spiroforme*, *Eimeria spp.*, EPEC and rotavirus A are much more frequent than those infections due to only one of them. Other pathogens detected in very few cases have been *Salmonella sp.* and *Enterococcus hirae*.

Introducción

Las afecciones digestivas en granjas de conejos afectan principalmente a los animales jóvenes, lactantes y de cebo (Marlier et al., 2003; Boucher y Leplat, 2005). Los principales agentes etiológicos bacterianos incluyen *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) (Pohl et al., 1993; Licois, 2009), *Clostridium spiroforme* (Carman y Borriello, 1984) y *Salmonella spp.* (Agnoletti et al, 1999). Respecto a agentes parasitarios, los coccidios (*Eimeria spp.*) son los más importantes afectando a los cebos (Licois, 2009). Otros agentes considerados patógenos bajo determinadas condiciones son rotavirus A (Cerioli y Lavazza, 2006), *Clostridium perfringens* (García et al., 2014), *Enterococcus hirae* (Vela et al., 2010) y *Bacteroides fragilis* enterotoxigénico (Malo, 2019). En este trabajo se muestra la frecuencia de detección de un panel de agentes patógenos, así como los niveles de coinfección detectados entre ellos, en muestras clínicas procedentes de la península Ibérica, aportando una visión global y actualizada de la patología digestiva en granjas cunícolas.

Material y métodos

Se estudiaron un total de 757 casos que se recibieron en Exopol entre enero de 2018 y junio de 2019 procedentes de granjas de España y Portugal afectadas clínicamente por un proceso digestivo. Se recibieron entre 3 y 5 paquetes intestinales o hisopos cecales en cada caso. Del total de casos, 95 correspondieron a gazapos lactantes de menos de 15 días (<15d), 117 a casos de gazapos en pre-destete (entre 15 y 35 días de vida) y 545 a gazapos de cebo. En todos ellos se llevó a cabo el cultivo microbiológico y la detección por PCR a tiempo real (qPCR) sobre muestra de EPEC, *C. spiroforme*, *C. perfringens* y rotavirus A. En 542 casos del total (59 lactantes, 77 pre-destete y 406 cebo) se estudió por qPCR la presencia de *Eimeria spp.* y en 304 casos (35 lactantes, 64 pre-destete y 205 cebo) *B. fragilis* enterotoxigénico.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos por grupos de edad se muestran en la Figura 1. En la Figura 2 se representan en diagramas de Venn las coinfecciones encontradas entre los patógenos más prevalentes. *C. spiroforme* es el patógeno más frecuente pero generalmente se encuentra en coinfección con otros agentes. Según Peeters et al. (1995) solo bajo determinadas circunstancias sobrecrece y produce toxina dando lugar a enterotoxemia. En el 41% de los casos de pre-destete se encuentra como agente único y en <15d es minoritario. EPEC se detecta en todos los grupos de edad, siendo en <15d donde más se presenta como agente único, indicativo de colibacilosis neonatal. *Eimeria spp.* está presente en el 70% de los cebos y en el 30% de pre-destete pero casi siempre en coinfección con *C. spiroforme*, EPEC y/o rotavirus A. Rotavirus A es más prevalente en cebo, probablemente por la presencia de anticuerpos maternos hasta los 30-45 días de vida (Cerioli y Lavazza, 2006), pero generalmente en coinfección con otros agentes. *B. fragilis*

enterotoxigénico se ha detectado principalmente en predestetados, en 36% de los casos. Sorprende la baja tasa de infección por *Salmonella spp.* (<2%). El hecho de seleccionar casos con clínica digestiva de forma específica para el estudio, puede explicar esta baja tasa, ya que quedan fuera casos de salmonelosis con otra sintomatología (metritis, bajas súbitas por septicemia, etc.).

Como conclusión podemos decir que la colibacilosis por EPEC es la principal patología producida por un único agente en gazapos lactantes <15d, mientras que cuanto mayor es la edad de los gazapos, más compleja es la enfermedad digestiva. En predestetados EPEC permanece como un patógeno importante pero también son muy frecuentes *C. spiroforme* y *B. fragilis* enterotoxigénico, siendo habituales las coinfecciones entre los 3 agentes. Los gazapos de engorde son los más afectados por patógenos digestivos, a juzgar por el amplio número de muestras recibidas, aunque no se detecta ningún agente más prevalente que el resto y siendo lo más habitual encontrar una gran variedad de coinfecciones entre *C. spiroforme*, *Eimeria spp*, EPEC y Rotavirus A.

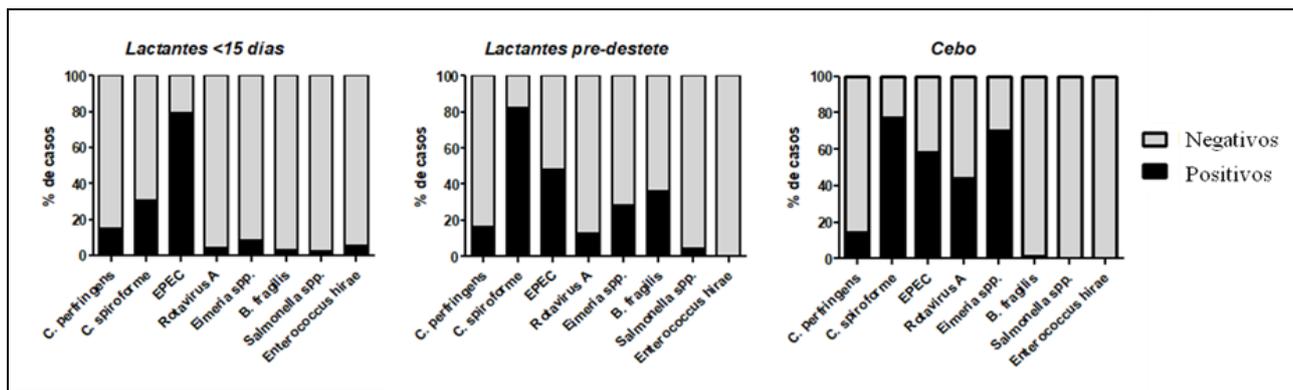


Figura 1. Tasa de detección de cada uno de los patógenos estudiados en los distintos grupos.

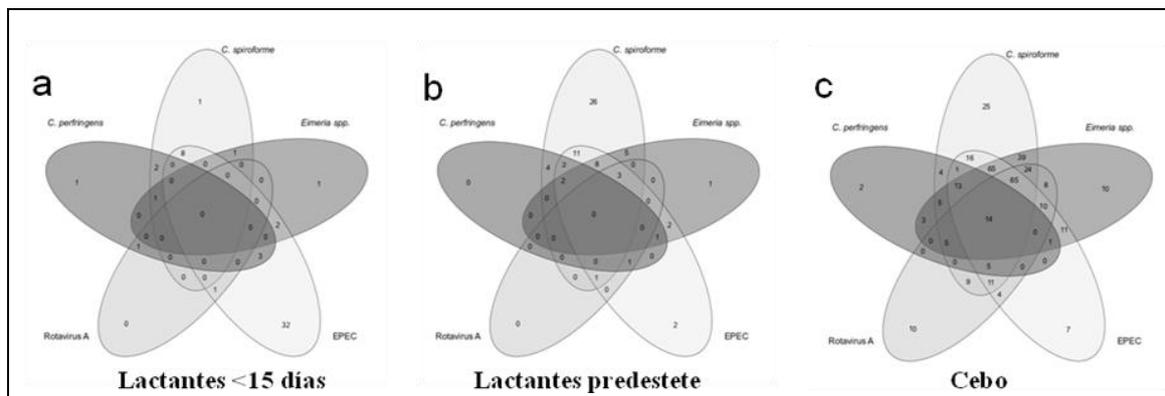


Figura 2. Representación de las coinfecciones encontradas en los distintos grupos de edad.

Bibliografía: Agnoletti F, Lenarduzzi M, Ricci A, Marotta A. 1999. Isolation of *Salmonella spp.* from Italian commercial rabbitries. En: Baselga M, Testik A (Eds). 2. International Conference on Rabbit Production in Hot Climates. CIHEAM, Zaragoza, pp. 189-193 ■ Boucher S, Leplat A. 2005. De quoi meurent les lapins d'engraissement. En: Table Ronde, 11emes Journées de la Recherche Cunicole, 29-30 nov, Paris, France. ■ Carman, RJ, Borriello SP. 1984. Infectious nature of *Clostridium spiroforme*-mediated rabbit enterotoxaemia. *Vet Microbiol* 9:497-502. ■ Cerioli M, Lavazza A. 2006. Viral enteritis of rabbits. En: Recent advances in rabbit sciences. Maertens L, Couder P, (Eds) Melle. Belgium. pp:181-186. ■ Garcia JP, Li J, Shrestha A, Freedman JC, Beingesser J, McClane B, Uzal FA. 2014. *Clostridium perfringens* Type A Enterotoxin Damages the Rabbit Colon. *Infect Immun* 82(6):2211. ■ Licois D. 2009. Pathologie d'origine bactérienne et parasitaire chez le lapin: Aports de la dernière decennia. 13èmes Journées de la Recherche cunicole, 17-18 nov., Le Mans, France. ■ Malo M. 2019. *Bacteroides fragilis* enteropatógeno: ¿Enfermedad emergente o hallazgo clínico? En: XLIV 44th Symposium ASESCU. Aranda de Duero, España. pp 83-86. ■ Marlier D, Dewree R, Delleur V, Licois D, Lassence C, Poulipoulis A, Vindevogel H. 2003. Description des principales étiologies des maladies digestives chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*). *Ann Méd Vét* 147:385-392 ■ Peeters JE, Maertens L, Orsenigo R, Colin M. 1995. Influence of dietary beet pulp on caecal VFA, experimental colibacillosis and iota-enterotoxaemia in rabbits. *Anim Feed Sci Tech* 51:123-139. ■ Pohl PH, Peeters JE, Jacquemin ER, Lintermans PF, Mainil JG. 1993. Identification of *eae* Sequences in Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains from Rabbits. *Infect and Immunity* 61(5):2203-2206. ■ Vela AI, Fernández A, Moreno B, Casamayor A, Chacón G, Villa A, Comenge J, Fernández-Garayzábal JF. 2010. Isolation of *Enterococcus hirae* from suckling rabbits with diarrhoea. *Vet Rec* 167(9):345-346.

¿Es obligatoria la vacunación de conejos como animales de compañía en Andalucía?

Is the vaccination of rabbits as companion animals mandatory in Andalusia?

Jaén Téllez JA

Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible. Junta de Andalucía. 41013 Sevilla, España. *jantonio.jaen@juntadeandalucia.es

Abstract: The rabbit has increased in recent years as a companion animal. Diseases such as myxomatosis and viral hemorrhagic disease are of great importance in wild rabbit populations, in livestock farms and in companion animals, due to special relevance from the point of view of animal welfare, health, economics and the environment. A review of all current regulations at European, Spanish and regional level that may be applicable is carried out. In the Autonomous Region of Andalusia (Spain), companion animals that do not belong to livestock farms have to meet the same identification, health and animal welfare requirements as animals of the same species used as rental animals. Rabbits as pets have to comply with a vaccination program established and applied by a licensed veterinarian against myxomatosis and viral hemorrhagic disease.

Introducción

La variedad de animales de compañía ha aumentado en los últimos años, entre ellos, después de perros y gatos se encuentra el conejo doméstico por la facilidad de manejo y su sociabilidad (Chapel et al., 2015).

Entre las enfermedades víricas de mayor importancia en conejos se encuentran las mixomatosis y la enfermedad hemorrágica vírica. La vacunación más extendida es frente a estas enfermedades, además con una alta efectividad (Fernández, 2006).

La salud y el bienestar de los animales están relacionados: una mejora de la salud animal fomenta la mejora del bienestar animal y viceversa. Las medidas de prevención y control de enfermedades, fundamentalmente mediante la vacunación tiene un efecto significativo sobre el bienestar, evitando a los animales dolor, inquietud y sufrimiento (DOUE, 2016).

El objetivo de este trabajo es valorar la normativa vigente para determinar si es obligatoria en Andalucía la vacunación de conejos como animales de compañía frente a distintas enfermedades.

Material y métodos

Se ha realizado una revisión de la normativa que afecta a la especie cunícola a nivel tanto europeo, nacional como autonómico, por tanto, se efectúa la búsqueda en el Diario Oficial de la Unión Europea, Boletín Oficial del Estado y en el Boletín Oficial de la Junta de Andalucía.

Resultados y discusión

La normativa vigente de aplicación en la Comunidad Autónoma de Andalucía para tratamientos obligatorios de animales de compañía, solo los establece para perros, gatos, hurones, psitácidas y cerdos vietnamitas (BOJA, 2009 y 2010), no reflejándose nada con respecto a otras especies. Al no haber normativa concreta que regule los tratamientos obligatorios para conejos como animales de compañía, se analiza la legislación sectorial de explotaciones ganaderas de esta especie.

La regulación sobre ordenación de explotaciones cunícolas indica que debe existir un programa de control frente a mixomatosis y enfermedad hemorrágica vírica, aunque se exceptúa a los animales de compañía, sin perjuicio de las disposiciones que, en el ámbito de sus competencias establezca la autoridad competente (BOE, 2004), que en el caso de Andalucía es la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible. Así mismo, se establece que la vacunación para conejos de mixomatosis y enfermedad hemorrágica vírica se efectuará en función de la

calificación sanitaria de la explotación. Las categorías de estas explotaciones según el nivel sanitario son las siguientes (BOE, 2004):

a) Explotaciones sin calificación: aquellas en las que en el último año se hayan presentado evidencias clínicas de cualquiera de las dos enfermedades o no estén sometidas a un programa de control vacunal. Aquellas explotaciones que se encuentren dentro de esta calificación solo podrán trasladar animales con destino al sacrificio.

b) Explotaciones indemnes: aquellas en las que en el último año no se hayan presentado evidencias clínicas de cualquiera de las dos enfermedades y se lleve a cabo el programa de control vacunal aprobado por la autoridad competente para el mantenimiento de aquellas.

c) Explotaciones oficialmente indemnes: aquellas en las que en el último año no se hayan presentado evidencias clínicas de cualquiera de las dos enfermedades y no se haya vacunado a ninguno de sus animales contra estas durante los últimos 12 meses. Asimismo, se habrán realizado sobre la población de reproductores pruebas de control para detectar la enfermedad con una prevalencia del dos por ciento y un nivel de confianza del 98 por ciento.”.

En Andalucía la normativa sobre bienestar y sanidad animal establece que cuando los animales de compañía que no formen parte de explotaciones ganaderas deberán cumplir todos aquellos requisitos de identificación, sanitarios y de bienestar animal para los animales de su misma especie usados como animales de renta (BOJA, 2012), con lo que, en esta Comunidad Autónoma, no le afecta la excepción de no aplicar la normativa sectorial de explotaciones cunícolas a los animales de compañía de esta especie en el ámbito concreto mencionado de identificación, sanidad y bienestar animal.

Analizando lo reflejado en los párrafos anteriores, se tienen que cumplir los requisitos establecidos en el apartado b) de la normativa de ordenación de explotaciones cunícolas, es decir, se debe llevar un programa de control vacunal frente a estas enfermedades realizado por un veterinario autorizado de acuerdo a lo regulado en BOJA (2009). Se descarta el apartado a) porque el destino de los animales de compañía no es el sacrificio, al tratarse de animales que no son aptos para el consumo humano, siendo considerados material de la categoría I de subproductos animales no destinados a consumo humano (DOUE, 2009) y no tienen limitación al libre movimiento. Asimismo, se descarta el apartado c) porque sería de aplicación en el caso de explotaciones de cría de animales de compañía, es decir, con reproductores. En estas explotaciones con reproductores se debe establecer un programa de control frente a las enfermedades infecto-contagiosas descritas (BOE, 2004). En los centros para la venta de conejos (tiendas) se tiene que establecer un programa definido de higiene y profilaxis de los animales albergados (BOJA, 2012).

En conclusión, en Andalucía, los conejos como animales de compañía tienen que tener un programa de control basado en un plan vacunal obligatorio frente a mixomatosis y enfermedad hemorrágica vírica, establecido y aplicado por un veterinario autorizado.

Bibliografía: BOE. 2004. Real Decreto 1547/2004, de 25 de junio, por el que se establecen normas de ordenación de las explotaciones cunícolas. *Boletín Oficial del Estado* 154: 23472-23479 ■ BOJA, 2009. Orden de 16 de diciembre de 2009, por la que se aprueba el Programa Andaluz para la lucha, control y erradicación de la enfermedad de Aujeszky en Andalucía. *Boletín Oficial de la Junta de Andalucía* 252: 67-71 ■ BOJA, 2010. Orden de 19 de abril de 2010, por la que se establecen los tratamientos obligatorios de los animales de compañía, los datos para su identificación en la venta y los métodos de sacrificio de los mismos en la Comunidad Autónoma de Andalucía. *Boletín Oficial de la Junta de Andalucía* 81: 41-55 ■ BOJA. 2012. Decreto 65/2012, de 13 de marzo, por el que se regulan las condiciones de sanidad y zootécnicas de los animales. *Boletín Oficial de la Junta de Andalucía* 60:41-55 ■ Chapel JM, Benedito JL, Hernández J, Pereira V, Domínguez R, Castillo C. 2015. Técnicas de manejo y sujeción del conejo doméstico. *Consulta de Difusión Veterinaria* 23: 47-54 ■ DOUE. 2009. Reglamento (CE) 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano. *Diario Oficial de la Unión Europea* 14.11.2009. 33 pp. ■ DOUE. 2016. Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento y del Consejo de 9 de marzo de 2016 relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal. *Diario Oficial de la Unión Europea* 31.03.2016. 208 pp. ■ Fernández G. 2006. Enfermedades víricas de los conejos: mixomatosis y enfermedad vírica hemorrágica. *Boletín de Cunicultura* Lagomorpha 148: 6-18.

Caracterización de la inmunidad maternal de anticuerpos frente a RHDV-2 producida por una vacuna inactivada

Characterization of the maternally derived antibody immunity against RHDV-2 after administration of an inactivated vaccine

Baratelli M^{1*}, Molist-Badiola J¹, Puigredon-Fontanet A¹, Pascual M², Boix O¹, Mora-Igual FX³, Woodward M¹, Lavazza A⁴, Capucci L⁴

¹HIPRA, 17170 Amer, España. ²Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaria (IRTA), 08140 Barcelona, España. ³Asvet Veterinaris, 08410 Barcelona, España. ⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER), 25124 Brescia, Italia. *massimiliano.baratelli@hipra.com

Abstract: The present study investigates whether the antibody immunity against RHDV-2 produced by vaccination of breeding does with an inactivated vaccine is transmitted to their rabbit kits and its dynamic once inherited. For this purpose, 80 New Zealand female rabbits of 8-9 weeks of age were equally allocated into 2 groups and bred during 6 reproductive cycles. The first experimental group was vaccinated with a commercially available inactivated vaccine against RHDV-2 whereas the second group was inoculated with PBS. Moreover, the present study was also meant to identify the mechanisms of transmission of that maternal immunity. For this reason, rabbit kits of vaccinated and non-vaccinated breeding does were cross-fostered before milk uptake. The RHDV-2 antibody response was monitored in the blood serum of breeding does and of their kits by competition ELISA (cELISA). Since it has been clearly demonstrated that cELISA positive rabbits are protected from RHD, we avoided the resorting of the challenge of the kits with RHDV-2. Results showed that RHDV-2 antibodies were inherited by kits mainly during gestation and up to the sixth reproduction cycle. Once inherited, these lasted in kits blood at least until 28 days of life.

Introducción

La aparición de un nuevo virus relacionado con el RHDV (RHDV-2) en 2010 cambió parcialmente la epidemiología de esta enfermedad. La falta de una inmunidad protectora previa permitió que la enfermedad se extendiera por Europa provocando una alta mortalidad en las poblaciones de conejos domésticos y silvestres. Se desarrollaron vacunas homólogas inactivadas y se utilizaron con éxito para controlar la enfermedad. Casi diez años después, se desconocen los mecanismos mediante los cuales las vacunas administradas en las reproductoras pueden ayudar a proteger la población de gazapos (Le Gall et al., 2011). La respuesta humoral, ya sea activa o pasiva, es esencial en la protección contra RHD (OIE et al., 2012). Los conejos tienen una placentación hemocorial y por ello se sabe que los anticuerpos maternos se transmiten de la madre a la descendencia a través de la placenta; por el contrario, no se sabe demasiado sobre la transmisión a través de la lactancia (DeSesso et al., 2012). El objetivo de este estudio fue determinar si una vacuna inactivada puede producir una inmunidad pasiva en gazapos mediante la inmunización activa de las madres, cuánto dura esta inmunidad en los gazapos y describir los mecanismos de transmisión.

Material y métodos

Se adquirieron conejas de raza New Zealand White de 8-9 semanas de vida (sdv) y se distribuyeron en dos grupos de 40 animales cada uno. A las 9-10 sdv, el grupo A se inmunizó con una vacuna inactivada frente al RHDV-2 (ERAVAC[®], Laboratorios HIPRA S.A.) mediante administración subcutánea y siguiendo las instrucciones del fabricante; mientras que el grupo B se inoculó con PBS estéril. Se comprobó el estado de inmunización de todas las conejas 25 días después de la vacunación (dpv). El programa de reproducción comenzó a los 17-18 sdv y continuó hasta 6 ciclos de reproducción (intervalo entre partos: 49-56 días). Se evaluó la respuesta de anticuerpos activa y pasiva frente a RHDV-2 en la sangre de 10 madres y de uno de los gazapos de cada una de las madres a los 2 días después del parto y a lo largo de los 6 ciclos reproductivos. Por otro lado, se evaluó la duración de la inmunidad pasiva presente en los gazapos hasta los 58 días de vida (ddv). Para este propósito se seleccionaron al azar 40 gazapos por grupo (grupos A y B), se destetaron a 30-35 ddv y se evaluaron hasta los 60 ddv. Se recogieron periódicamente muestras de sangre de 15 gazapos por grupo. Finalmente, se adoptaron los gazapos nacidos del grupo A y B de manera cruzada para determinar los mecanismos de transmisión de los anticuerpos maternos. Los gazapos nacidos de 6 madres del grupo A fueron adoptados, justo después de su nacimiento, por las madres del grupo B y viceversa (grupo AB y BA); el procedimiento se realizó antes del inicio de la ingesta de leche materna. La adopción cruzada se realizó también entre gazapos nacidos de conejas del mismo grupo para evaluar la presencia de posibles sesgos asociados al procedimiento; para ello se realizó el mismo procedimiento entre 4 madres del grupo A (grupo AA) y 4 madres del grupo B

(grupo BB). Se evaluaron los anticuerpos maternos frente a RHDV-2 en sangre entre 4-12 gazapos por grupo periódicamente hasta los 29 ddv. Los anticuerpos frente a RHDV-2 fueron cuantificados mediante ELISA de competición (cELISA) por el laboratorio de referencia de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

Resultados y discusión

La vacunación produjo una respuesta de anticuerpos frente a RHDV-2 que duró hasta el final del estudio, es decir, 351 días post-vacunación (datos no mostrados); de la misma manera, los gazapos nacidos de estas conejas mostraron anticuerpos frente a RHDV-2 (Fig. 1A). Estos resultados sugirieron que la vacuna produjo una respuesta de anticuerpos frente a RHDV-2 en las madres y esta se transmitió a sus gazapos. Además, los anticuerpos maternos se detectaron en gazapos nacidos hasta el sexto ciclo reproductivo (Fig. 1A). Por lo tanto, las madres vacunadas con una única dosis fueron capaces de transferir los MDA a los gazapos hasta un año después de su administración, y sin necesidad de revacunar. En los gazapos, la inmunidad pasiva frente a RHDV-2 producida por la vacuna duró al menos 28 ddv, pero no llegó a 58 ddv (Fig. 1B). Los primeros gazapos sin anticuerpos maternos frente a RHDV-2 se observaron a los 40 ddv (33,33%). A los 58 ddv todos los gazapos fueron seronegativos.

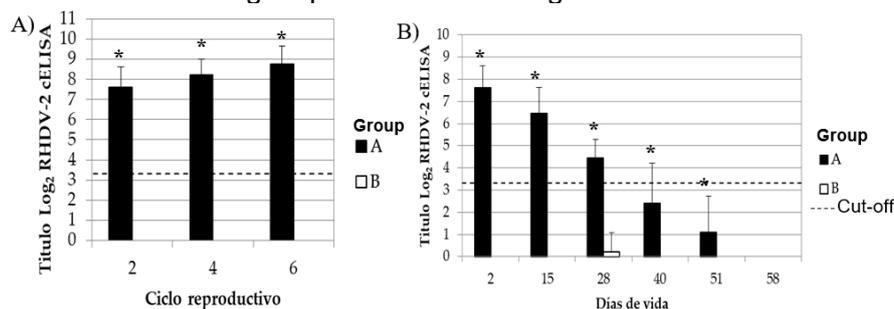


Figura 1. Anticuerpos maternos frente a RHDV-2 en A) gazapos de 2 días de vida a lo largo de los ciclos reproductivos de las madres y B) a lo largo del crecimiento de los gazapos. Diferencias significativas (*) (Mann-Whitney U, $p < 0.05$).

La adopción cruzada (Fig. 2) mostró que la gestación es el periodo donde existe una mayor transferencia de anticuerpos maternos, probablemente por mecanismos transplacentarios. Los gazapos nacidos de madres vacunadas pero amamantados por madres no vacunadas (Grupo AB) no tuvieron alteraciones significativas de los niveles de anticuerpos maternos frente a RHDV-2. Al contrario, los otros gazapos (Grupo BA) no tuvieron niveles significativos de anticuerpos maternos frente a RHDV-2. Por lo tanto, los resultados sugieren que la lactancia tiene poca o ninguna contribución detectable en la transferencia de anticuerpos maternos frente a RHDV-2.

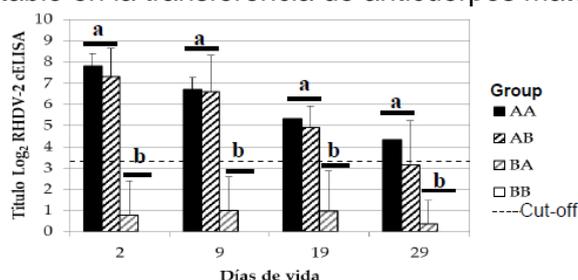


Figura 2. Anticuerpos maternos frente a RHDV-2 en gazapos de adopción cruzada. Diferencias significativas (a-b) (Mann-Whitney U, $p < 0.05$).

En conclusión, ERAVAC® demostró que con una sola dosis administrada en la coneja, puede producir una inmunidad maternal frente a RHDV-2 en gazapos, como mínimo durante todo el estudio (351 días post-vacunación). Dichos anticuerpos maternos tienen una duración de mínimo hasta los 28 días de vida del gazapo. Además, esta inmunidad se transmite mayoritariamente por vía transplacentar.

Agradecimientos: SMU (DIAGNOS lab., HIPRA), Silvia Brodini y Alessandra Previdi (IZSLER).

Bibliografía: DeSesso JM, Williams AL, Ahuja A, Bowman CJ, Hurtt ME. 2012. The placenta, transfer of immunoglobulins, and safety assessment of biopharmaceuticals in pregnancy. *Crit Rev Toxicol* 42(3):185-210. ■ Le Gall-Recule G, Zwingelstein F, Boucher S, Le Normand B, Plassiart G, Portejoie Y, Decors A, Bertagnoli S, Guerin JL, Marchandeau S. 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet Rec* 168:137-138. ■ OIE. 2012. Rabbit Haemorrhagic Disease Chapter 2.6.2 OIE *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris, France: OIE, pp 941-955 (version May 2016).

Efecto de la vacunación en la carga viral y la protección frente a EHC-2

Effect of vaccination on viral load and protection against RHDV2

Sánchez-Matamoros A^{1*}, Woodward M¹, Navas E¹, Boix O¹, Valls L¹

¹HIPRA, 17007 Amer (Girona), España. *almudena.sanchez@hipra.com

Abstract: Vaccination against Rabbit haemorrhagic disease (RHD) is the principal measure available for protection against this lethal virus, although limited scientific information is available. The aim of this study was to assess the clinical course, viral load and survival rate of animals vaccinated with ERAVAC[®] after experimental RHDV2 infection at 6 months post-vaccination (mpv). To this end, 38 rabbits were randomly distributed between two groups; one was vaccinated with ERAVAC[®] and the second one received PBS (control). Control and vaccinated rabbits were challenged with a heterologous virulent RHDV2 strain at 6 mpv and clinically monitored for 7 days. Animals were necropsied and organs and faeces were sampled for detection of the viral load. The results showed that vaccination with ERAVAC[®] provides full protection against mortality after experimental challenge and prevents the spread of RHDV in faeces, as well as the persistence of the virus in major target organs, in RHDV2 infected adult rabbits at 6 mpv. This study contributed to describing the effect of the vaccine on RHDV2 transmission, being the main alternative for RHDV2 control on farms.

Introducción

La enfermedad hemorrágica del conejo (EHC) es uno de los principales problemas económicos de la cunicultura, especialmente tras la aparición de la cepa variante tipo 2 (EHC-2 o GI.2) en 2010. La principal vía de transmisión de la enfermedad es la vía fecal (Dalton et al., 2018), mientras que la vacunación es la principal herramienta de prevención y control de misma (Le Minor et al., 2019). Sin embargo, se desconoce el efecto de la vacunación en la replicación y propagación de EHC-2 a largo plazo. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de una vacuna inactivada en la prevención de la enfermedad, en la excreción viral y replicación del virus en el organismo de conejos adultos infectados experimentalmente a los 6 meses de la vacunación (mpv).

Material y métodos

Treinta y ocho conejos SPF de 35 días de vida, seronegativos a EHC-2, fueron aleatorizados en el grupo vacunados (GV; n = 19) y el grupo control (GC; n = 19). El GV se inmunizó con la vacuna ERAVAC[®] (Laboratorios HIPRA S.A.), siguiendo las recomendaciones del fabricante, mientras que GC se inmunizó con PBS estéril. La eficacia de la vacuna a largo plazo se evaluó mediante la realización de un desafío heterólogo (cepa virulenta aislada de un brote clínico en España) a los 6 mpv. Tras el desafío, los signos clínicos y la mortalidad fueron registrados diariamente durante 7 días post-infección (dpi). La excreción viral se evaluó en las heces de 10 conejos por grupo, mientras que la replicación del virus en los órganos diana (hígado y bazo) tras la necropsia de los animales por muerte natural o sacrificio a los 7 dpi. La cuantificación de la carga viral del virus de la EHC-2 en las diferentes muestras se realizaron mediante RT-qPCR (Duarte et al., 2015).

Resultados y discusión

Todos los conejos vacunados sobrevivieron a la infección sin mostrar ningún síntoma clínico de la enfermedad, a excepción de 1 animal. Por el contrario, los resultados obtenidos en el GC tras la infección con una cepa heteróloga virulenta fueron síntomas clínicos en un 42,10% de los conejos y una mortalidad acumulada del 47,4%. Estos resultados demuestran la severidad de la infección del inóculo utilizado (Le Gall-Reculé et al., 2013) y permiten extrapolar los resultados de protección de la vacuna frente a otros virus de campo.

La evaluación de la replicación vírica en los órganos diana permitió observar que el porcentaje de conejos con presencia de ARN del virus de la EHC-2 en el GV fue significativamente inferior que en el GC para ambos tipos de muestras (test de Fisher, $p < 0,05$). Concretamente, en los animales vacunados no se detectó ARN del virus de la EHC-2 en las muestras de hígado y bazo, a excepción de 1 y 2 animales, respectivamente. Por el contrario, el 95% y 100% de los conejos del GC presentaron carga viral de EHC-2 en muestras de hígado y bazo, respectivamente (Figura 1).

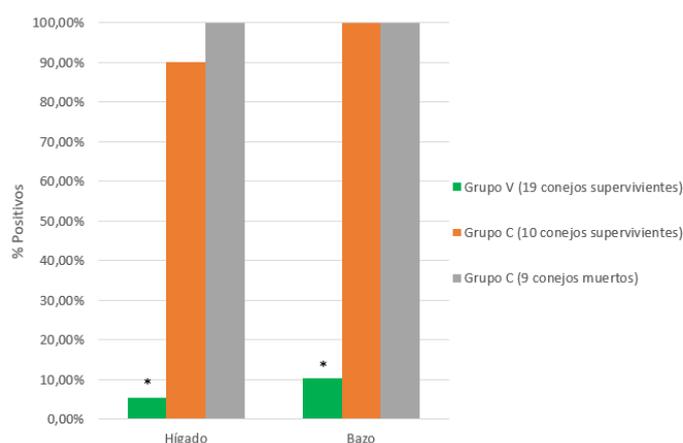


Figura 1. Porcentaje de conejos con presencia de ARN del virus de la EHC-2 en el grupo vacunado hígado y bazo tras la infección heteróloga de EHC-2 a 6 mpv.

Respecto a la carga viral detectada, se observó hasta 261 y 246 veces más carga viral en muestras de hígado y bazo de conejos muertos, respectivamente, que en los supervivientes (test de Student, $p < 0,001$) (Tabla 1). Estos hallazgos están en línea con los resultados obtenidos por autores anteriores (Le Minor et al., 2019; Dalton et al., 2018).

Tabla 1. Media geométrica de la carga viral en hígado y bazo tras la infección heteróloga de EHC-2 a 6 mpv en los animales con presencia de ARN. La carga viral se calculó como copias de ARN viral/mg de tejido y es expresado como Log^{10}

	Carga viral (copias de ARN viral/mg de tejido)	
	Hígado	Bazo
Grupo V (19 conejos supervivientes)	3,96	3,54 ± 0,52
Grupo C (10 conejos supervivientes)	4,13 ± 0,40 ^a	3,98 ± 0,28 ^a
Grupo C (9 conejos muertos)	10,76 ± 0,30 ^b	9,78 ± 0,33 ^b

^{a,b}: Diferentes letras en la misma columna significan diferencias significativas entre los datos.

Del mismo modo, el porcentaje de conejos en los que se detectó el virus de la EHC-2 en las heces fue diferente entre ambos grupos. En los conejos no vacunados, el virus se detectó en 60% de los conejos a 2 dpi, 50% de los conejos a 4 dpi y en 44% de los conejos a 7 dpi, mientras que en los conejos vacunados no se detectó el virus en ninguno de los tiempos de estudio. Si analizamos la excreción del virus en las heces, los niveles más altos de ARN viral fueron detectados a los 4 dpi, aunque no mostraron diferencias significativas con la excreción ni a 2 ni a 7 dpi (test de Student, $p > 0,05$). Los hallazgos en los hisopos rectales del GC son similares a los descritos por Dalton et al. (2018). Además, este estudio aporta nueva información sobre la ausencia de diseminación de ARN viral en las heces de conejos vacunados, mostrando que la vacunación previene la propagación del virus de la EHC-2 en granjas, principal vía de transmisión de la enfermedad.

En conclusión, este estudio ha demostrado que la vacunación con ERAVAC[®] proporcionó una protección completa contra la mortalidad tras la infección experimental y evitó la propagación del virus de la EHC-2 en las heces, así como su persistencia en los principales órganos diana de los animales vacunados a 6 mpv. Este estudio contribuyó a describir el efecto de la vacuna en la transmisión de EHC-2, siendo la principal alternativa para su control en granjas.

Agradecimientos: Equipo SMU-DIAGNOS, I+D Soporte y CEYC.

Bibliografía: Dalton KP, Balseiro A, Juste RA, Podadera A, Nicieza I, Del Llano D, González R, Martín Alonso JM, Prieto M, Parra F, Casais R. 2018. Clinical course and pathogenicity of variant rabbit haemorrhagic disease virus in experimentally infected adult and kit rabbits: Significance towards control and spread. *Vet Microb* 220:24-32. ■ Duarte MD, Carvalho CL, Barros SC, Henriques AM, Ramos F, Fagulha T, Luís T, Duarte EL, Fevereiro M. 2015. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *J Virol Methods* 219:90-95. ■ Le Gall-Reculé G, Lavazza A, Marchandeu S, Bertagnoli S, Zwingelstein F, Cavadini P, Martinelli N, Lombardi G, Guérin JL, Lemaitre E, Decors A, Boucher S, Le Normand B, Capucci L. 2013. Emergence of a new lagovirus related to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus. *Vet Res* 44:81. ■ Le Minor, O, Boucher S, Joudou L, Mellet R, Sourice M, Le Moullec T, Nicolier A, Beilvert F, Sigognault-Flochlay A. 2019. Rabbit haemorrhagic disease: experimental study of a recent highly pathogenic GI. 2/RHDV2/b strain and evaluation of vaccine efficacy. *World Rabbit Sci* 27:143-156.

Estudio comparativo del casete cromosómico *mec* (SSC*mec*) en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de conejos

Comparative study of the cassette chromosome *mec* (SSC*mec*) in *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbits

Moreno-Grúa E^{1*}, Pérez-Fuentes S¹, Selva L¹, Arnau A¹, Penadés JR², Corpa JM¹, Viana D¹

¹ Dept. de Producción y Sanidad Animal (PASAPTA), Universidad Cardenal Herrera CEU, 46115 Alfara del Patriarca (Valencia), España. ² MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Imperial College London, SW7 2AZ, UK. *elena.moreno3@uchceu.es

Abstract: The increase of bacteria resistant to antibiotics is a problem, and specifically in *Staphylococcus aureus* one of the most important resistances is to methicillin. This resistance is produced by the acquisition of the mobile genetic element SCC*mec* (staphylococcal chromosomal cassette containing the *mec* gene). In this study, a selection of isolated strains of rabbits was carried out in order to sequence them and to know in depth the SCC*mec* element. Five different types of *mec* cassette (III, IVc, Vc, XI, new type) specific to each ST genotype were obtained. The types of cassettes IVc, Vc and XI found were similar to those described above. However, we found a new type of cassette in a strain type ST2855, and another type of cassette composed of this new SCC*mec* and part of the SCC*mec* type III element. In addition, within this element other resistance genes such as *bla_Z* and genes for resistance to bleomycin and cadmium were found.

Introducción

Staphylococcus aureus es una bacteria que afecta a numerosas especies animales entre las que destaca el conejo. En los conejos comerciales *S. aureus* es una de las principales causas de eliminación de las granjas (Rosell y de la Fuente, 2009). Uno de los problemas más importantes a la hora de combatir este patógeno es la gran capacidad que tiene para adquirir múltiples resistencias a los agentes antimicrobianos (Foster, 2017); una de las más importantes es la resistencia a la meticilina. Recientemente se han descrito cepas resistentes a meticilina en granjas de conejos (Moreno *et al.*, 2018). Esta resistencia está mediada por la adquisición del elemento genético móvil SCC*mec* (Ito *et al.*, 1999), el cual, constituye un grupo heterogéneo de elementos genéticos móviles caracterizados por la presencia del complejo *mec*, el complejo *ccr*, y la presencia de repeticiones directas e invertidas en los extremos del SCC*mec*. Los elementos SCC*mec* se clasifican según la combinación de los complejos *mec* y *ccr* (IWG-SCC, 2009). Debido a que el elemento SCC*mec* juega un papel central en las características de resistencia antimicrobiana, epidemiología molecular y evolución de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), el análisis de las secuencias de SCC*mec* pueden contribuir a conocer el origen y difusión de estas resistencias y mejorar enfoques preventivos y terapéuticos. Por todos estos motivos el objetivo de este trabajo fue el estudio y descripción de SCC*mec* en aislados de *S. aureus* procedentes de conejos.

Material y métodos

En este trabajo se secuenciaron 20 cepas de *S. aureus* procedentes de conejos. Esta selección se realizó en base al genotipo y a la presencia del gen *mec*, confirmado por PCR. La secuenciación se llevó a cabo en Edinburg Genomics (Edimburgo, Reino Unido) y posteriormente fueron anotadas y comparadas con otros genomas disponibles mediante RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology, Versión 2.0, <http://rast.nmpdr.org>) (Glass *et al.*, 2010). La comparativa de elementos genéticos móviles se completó mediante los programas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, versión 2.0) del servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul *et al.*, 1997) y el programa SnapGene (GSL Biotech LLC, versión 3.2.1, www.snapgene.com), en base al listado y clasificación llevada a cabo por el Grupo de trabajo internacional sobre elementos cromosómicos en casetes estafilocócicos (<http://www.SCCmec.org>).

Resultados y discusión

Mediante el estudio de las secuencias completas del elemento SCC*mec* en cada una de las cepas seleccionadas, se encontraron 5 tipos diferentes de este elemento genético móvil: tipo III, IVc, V, XI y un tipo no descrito hasta la fecha (Tabla 1).

Tabla 1. Características de SCCmec en las cepas analizadas.

MLST	CC	Nº muestras	mecA/mecC	Tipo SCCmec	Longitud (kb)	Genes de resistencia
146	5	2	<i>mecA</i>	IVc	28,66	Bleomicina
398	398	5	<i>mecA</i>	Vc	34,11	-
1945	130	2	<i>mecC</i>	XI	32,56	<i>blaZ</i>
2855	96	1	<i>mecC</i>	Nuevo	21,89	<i>blaZ</i>
2855	96	5	<i>mecA</i> y <i>mecC</i> *	III y Nuevo	43,72	<i>blaZ</i> y Cd
4774	130	2	<i>mecC</i>	XI	32,56	<i>blaZ</i>
4998	96	1	<i>mecA</i> y <i>mecC</i> *	III y Nuevo	43,72	<i>blaZ</i> y Cd
5001	96	2	<i>mecA</i> y <i>mecC</i> *	III y Nuevo	43,72	<i>blaZ</i> y Cd

CC: complejo clonal; Cd: Cadmio; *blaZ*: gen que confiere resistencia a betalactámicos.

Los genotipos ST2855, ST4998 y ST5001, todos ellos del complejo clonal CC96, presentaron un fragmento que se corresponde con la secuencia de SCCmec tipo III descrita en la bibliografía, con *mecA*, pero además presentaron un segundo segmento de SCCmec no descrito hasta la fecha, que contiene *mecC*, lo que hace que estas cepas contengan simultáneamente el gen *mecA* y *mecC* dentro de el mismo SCCmec. Por lo tanto, este tipo de casete encontrado parece ser la combinación de dos casetes diferentes por inserción del SCCmec tipo III incompleto en otro SCCmec desconocido que contiene el gen *mecC*. Esta hipótesis se justifica también porque otro aislado ST2855 analizado presentó como único elemento SCCmec ese segundo segmento no descrito hasta la fecha. El elemento SCCmec tipo IVc se identificó en el genotipo ST146 y el elemento SCCmec tipo V se identificó en el genotipo ST398, ambos portando *mecA*. Por último, se encontraron SCCmec tipo XI con el gen *mecC* en todas las muestras tipo ST1945 y ST4774 (CC130). El SCCmec de las cepas ST4774 aisladas de conejos en granjas resultó ser igual en un 99,9% al de las cepas ST1945 aisladas de conejos silvestres. Esto hace pensar que dicho elemento genético móvil tiene un origen común. Además, se detectó el gen de resistencia *blaZ* dentro del SCCmec en las cepas que presentaron este tipo de casete. Esto se había descrito anteriormente para las cepas pertenecientes al complejo clonal CC130 (Shore *et al.*, 2011), pero no para cepas ST 1945 pertenecientes al complejo clonal CC96 como se ha hallado en este estudio. El gen *blaZ* codifica una betalactamasa y generalmente se encuentra como parte del operón *bla*, que está muy extendido entre bacterias Gram-positivas. La presencia de este gen en una secuencia SCCmec podría indicar un complejo de genes *mec* ancestral en MRSA, como se ha descrito previamente (Baba *et al.*, 2009).

Agradecimientos: Ministerio Economía y Competitividad (AGL2014-53405-C2-2-P), Generalitat Valenciana y al Ministerio de Educación y Formación Profesional (contratos predoctorales ACIF/2016/085 y FPU17/02708) y a la Universidad CEU Cardenal Herrera (INDI 18/08).

Bibliografía: Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17):3389-3402. ■ Baba T, Kuwahara-Arai K, Uchiyama I, Takeuchi F, Ito T, Hiramatsu K. 2009. Complete genome sequence of *Micrococcus caseolyticus* strain JCSCS5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. *J Bacteriol* 191:1180-1190. ■ Foster TJ. 2017. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev* 41:430-449. ■ Glass EM, Wilkening J, Wilke A, Antonopoulos D, Meyer F. 2010. Using the metagenomics RAST server (MG-RAST) for analyzing shotgun metagenomes. *Cold Spring Harb Protoc* 1:pdb prot5368. ■ Ito, T, Katayama, Y, Hiramatsu, K. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1449-1458. ■ IWG-SCC; International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec). 2009. Guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4961-4967. ■ Moreno-Grúa E, Pérez-Fuentes S, Muñoz-Silvestre A, Viana D, Fernández-Ros AB, Sanz-Tejero C, Corpa JM, Selva L. 2018. Characterization of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained from commercial rabbitries located in the Iberian Peninsula. *Front Microbiol* 9: 1812. ■ Rosell JM, de la Fuente LF 2009. Culling and mortality in breeding rabbits. *Prev Vet Med* 88(2):120-127. ■ Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, Ehricht R, Coleman DC. 2011. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 55(8):3765-3773.