



**LIBRO DE  
RESÚMENES  
AVEDILA 2024**

# ÍNDICE

Comités	3
Programa del Simposio	4
Comunicaciones orales	9
Presentaciones tipo póster	40
Patrocinadores y colaboradores	89

## COMITÉ ORGANIZADOR

Dr. Gorka Aduriz (NEIKER)

Dr. Joseba Garrido (NEIKER)

Dra. Ana Hurtado (NEIKER)

Yolanda Barredo (NEIKER)

## COMITÉ CIENTÍFICO

Dr. Gorka Aduriz (NEIKER)

Dr. José Luis Blanco (Universidad Complutense de Madrid)

Dr. Joseba Garrido (NEIKER)

Dra. Ana Hurtado (NEIKER)

Dr. Ramón Juste (NEIKER)

Dra. Iratxe Leginagoikoa (NEIKER)

Dr. Tomás Mayoral (Instituto de Salud Carlos III)

# PROGRAMA

## AVEDILA 2024

### Miércoles 13/11/2024

08:30-09:00 **Entrega de documentación**

09:00-09:30 **Inauguración y bienvenida**

- Presidente del Comité Organizador. Dr. Joseba Garrido (NEIKER)
- Presidente de AVEDILA. Dr. José Luís Blanco Cancelo
- Director de Salud Pública y Adicciones. Guillermo Ignacio Herrero
- Consejera de Alimentación, Desarrollo Rural, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco. Amaia Barredo

09:30-10:30 **Ponencia invitada**

#### **Los neutrófilos en la salud y en la enfermedad**

**Natalia Elguezabal**

NEIKER, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario

10:30-11:30 **Sesión 1 comunicaciones orales**

**Modera: Tomás Mayoral. Instituto de Salud Carlos III**

1. **Encefalopatías espongiiformes transmisibles animales en España: 24 años de evolución. Alba Marín Moreno.** LCV-MAPA
2. **Actividades del Laboratorio Central de Veterinaria en el marco del programa de Vigilancia de la Fiebre del Nilo Occidental en animales durante el periodo 2021-octubre 2024. María Belén Gómez.** LCV-MAPA
3. **Toxoplasmosis ovina: hallazgos lesionales pocos conocidos. Julio Benavides.** Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-ULE
4. **Control de plaguicidas en materias primas procedentes de importación para la elaboración de piensos. Ramón Checa Moreno.** LCSA-MAPA
5. **Evaluación de muestras y protocolos alternativos para el seguimiento serológico de la vacunación contra la influenza aviar en manadas de patos. Alejandra Castillo.** IDVET / INNOVATIE-DIAGNOSTICS

11:30-12:00 **Café y sesión de pósteres**

12:00-13:30 **Sesión 2 comunicaciones orales**

**Modera: Beatriz Romero. Dir. Lab. Europeo de Referencia *M. bovis*. VISAVET-UCM**

1. **Efecto de diferentes candidatos vacunales en el inmunodiagnóstico de la TB caprina y evaluación de antígenos como reactivos DIVA. Patricia Cuenca Lara. IRTA-CRESA**
2. **Análisis proteómico de las tuberculinas y evaluación de antígenos alternativos. Carlos Velasco. VISAVET-UCM**
3. **El estudio genómico de *Mycobacterium bovis* revela la circulación extendida de genotipos muy similares y la presencia de puntos calientes de la infección en una región de alta prevalencia de Castilla y León. Víctor Lorente-Leal. VISAVET-UCM**
4. **Identificación de casos de tuberculosis zoonótica mediante secuenciación de genoma completo. Bernat Pérez de Val. IRTA-CRESA**
5. **Evaluación de la protección y la interferencia diagnóstica de vacunas frente a la tuberculosis animal en los modelos de cobaya y de ratón. Leire Fernández-Veiga. NEIKER**
6. **Desarrollo de ensayos de identificación de paneles de variantes localizadas en regiones codificantes de genes asociados a la susceptibilidad y resistencia a la infección por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en la raza Holstein. Marta Alonso-Hearn. NEIKER**
7. **Evaluación de la resistencia/susceptibilidad genética al virus de la arteritis equina en caballos de Pura Raza Española. Paloma Gago. VISAVET-UCM**

13:30-15:00 **Lunch y sesión de pósteres**

15:00-16:00 **Comunicaciones empresas**

**Modera: Jose Luis Blanco. UCM y presidente de AVEDILA**

- BRUKER. **Matteo Vigano.**
- EUROVET VETERINARIA. **Ana Garnacho.**
- GENETIC PCR SOLUTIONS™. **Antonio Martínez-Murcia.**
- GOLD STANDARD DIAGNOSTICS. **Ana Ranz Casares.**
- IDEXX LABORATORIOS. **Vanessa Harjunen.**
- IDVET / INNOVATIVE-DIAGNOSTICS. **Alejandra Castillo.**
- NZYtech. **Ignacio Selgas.**
- THERMO FISHER. **Gabriel R. Rodríguez-Alarcón.**
- WERFEN. **Montserrat Enjuto Grijalba.**

16:00-17:00 **Sesión 3 comunicaciones orales**

**Modera: Ramón Juste. NEIKER**

1. **Caracterización de la microbiota del calostro bovino mediante *metabarcoding* del gen 16S rRNA completo usando tecnología Oxford-Nanopore de secuenciación de fragmentos largos. Leire Urrutia-Angulo. NEIKER**
2. **Optimización de un protocolo de qPCR para la identificación rápida de mosquitos invasores *Aedes albopictus* y *Aedes japonicus* en programas de vigilancia entomológica. Patirke Ibarondo. NEIKER**
3. **Caracterización mediante secuenciación de genoma completo de enterobacterias productoras beta-lactamasas de amplio espectro aisladas de erizos encontrados en la provincia de Barcelona. Laila Darwich. UAB**
4. **Desarrollo y validación sobre el terreno de ensayos serológicos y moleculares DIVA complementarios para vacunas contra la PPA, basados en la detección de los genes/proteínas codificadas p72, EP153R y eGFP. Gabriela González-García. Gold Standard Diagnostics**
5. **Presentación de la Asociación Francesa de Laboratorios Veterinarios (ADILVA). Nicolas Keck**

17:00 -18:00 **Asamblea AVEDILA (Exclusivo socios)**

21:00 **Cena del Congreso** (Incluida en la inscripción)

**Hotel Meliá Bilbao**

Lehendakari Leizaola 29 Abando

48011 Bilbao

## Jueves 14/11/2024

09:00-10:00 **Ponencia invitada**

**Particularidades del diagnóstico del síndrome reproductivo y respiratorio porcino**

**Cinta Prieto**

UCM, Universidad Complutense de Madrid

10:00-11:00 **Sesión 4 comunicaciones orales**

**Modera: Isabel Gonzalo. Dir. Adj. Lab. de Genética Molecular, Lab. Central Veterinaria, LCV**

1. **Norovirus porcino: identificación y caracterización molecular en muestras de la cabaña porcina en España. Sofía Lázaro. EXOPOL**
2. **Utilización de la técnica MLST para el estudio de la variabilidad genética de aislados de *Streptococcus suis* en España. Mario Delgado García. ULE**
3. **Caracterización de la virulencia y la resistencia a los antimicrobianos en aislados de *Staphylococcus hyicus* recuperados de granjas porcinas españolas. Ana Isabel Pastor Calonge. ULE**
4. **RealPCR PRRSV-1/PRRSV-2 Multiplex RNA Test - la última incorporación a la plataforma modular RealPCR de IDEXX. Vanessa Harjunen. IDEXX**
5. **Detección y aislamiento de Rotavirus A en brotes de diarrea de explotaciones porcinas españolas. Héctor Puente. AQUILÓN CyL, S.L.**

11:00-11:30 **Café y sesión de pósteres**

11:30-12:30 **Ponencia Invitada**

**Influenza Aviar y diagnóstico diferencial con otros procesos respiratorios**

**Mar Biarnés**

CESAC, Centro de Sanidad Avícola de Cataluña y Aragón

12:30-13:30 **Sesión 5 comunicaciones orales**

**Modera: Marta Barral. NEIKER**

1. **Diseño y validación de un ensayo duplex DIVA qPCR para diferenciar la vacuna Primun Salmonella T de cepas silvestres de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium.** Gema Bru. Genetic PCR Solutions™
2. **El rol de las aves urbanas como portadoras de bacterias y genes de resistencia antimicrobiana relevantes para la salud pública.** Mercedes Fernández. UAB
3. **Presencia de *Salmonella* en heces de buitre leonado en el Parque Natural de Valderejo (Araba).** Ane López-Morales. NEIKER.

13:30-14:15 **Acto de clausura**

- Entrega y presentación del Premio AVEDILA24 a la mejor publicación científica sobre diagnóstico laboratorial veterinario.

**“An investigation of the transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* within vertically integrated systems using whole genome sequencing”**

**Anna Vilaró Vives** - Grupo de Saneamiento Porcino (GSP)

- Entrega de los premios a la mejor comunicación oral y mejor poster
- Presentación del XXVIII Simposio AVEDILA
- Cierre del XXVII Simposio AVEDILA.

14:15-15:30 **Lunch de despedida**



# COMUNICACIONES ORALES



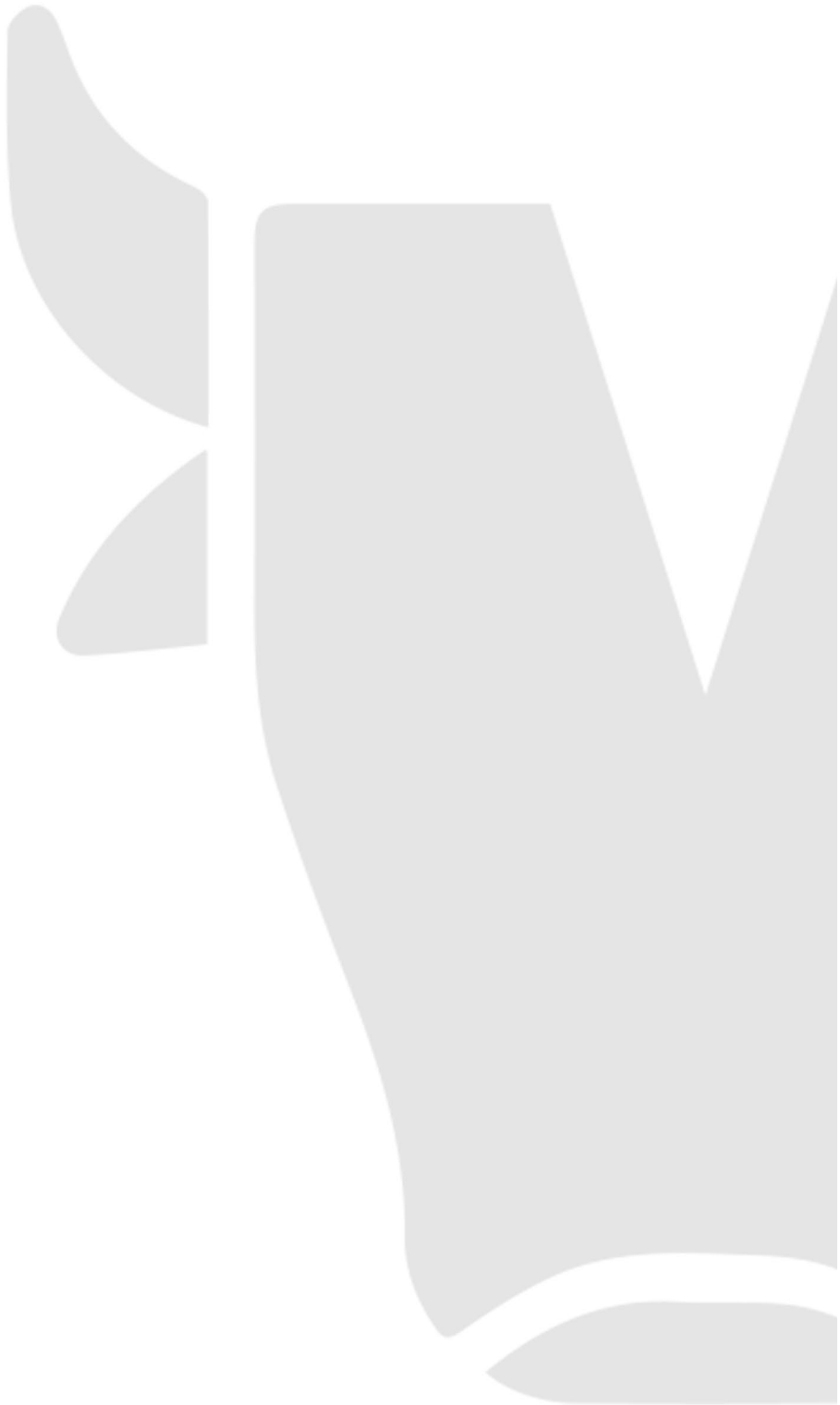
**Miércoles 13/11/2024**

**Ponencia invitada.**

**Los neutrófilos en la salud y en la enfermedad**

**Natalia Elguezabal**

NEIKER. Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario



## Sesión 1 comunicaciones orales

### Encefalopatías espongiformes transmisibles animales en España: 24 años de evolución

Alba Marín-Moreno<sup>1\*</sup>, Tomás Huélamo Peces<sup>2</sup>, María Hernández Valero<sup>2</sup>, Lucía Borreguero<sup>1</sup>, Rubén Villalba<sup>1</sup>, José Antonio Bouzada<sup>1</sup>, y Montserrat Agüero<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Central de Veterinaria, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 28110 Algete, Madrid, España

<sup>2</sup> Tecnologías y Servicios Agrarios, S.A. (TRAGSATEC), 28037 Madrid, España

\* ammoreno@mapa.es

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas y fatales que afectan a varias especies de mamíferos y están causadas por priones. El evento molecular subyacente al desarrollo de las EETs es la transformación de la proteína priónica celular en una isoforma malplegada. Las EETs más conocidas en el mundo veterinario son la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y la tembladera o “scrapie” en pequeños rumiantes. Debido a su carácter zoonótico, la EEB produjo una gran crisis de seguridad alimentaria a finales de los años 90 y principios de los años 2000 que dio lugar a un conjunto de medidas legislativas e impulsó un sistema de diagnóstico armonizado a nivel de la Unión Europea altamente eficiente para la vigilancia y control de estas enfermedades. En España supuso la creación de una red de laboratorios para el diagnóstico, integrada actualmente por 17 laboratorios oficiales de CCAA, y el Laboratorio Central de Veterinaria, como Laboratorio Nacional de referencia.

Más de veinte años después de esta crisis, pueden establecerse conclusiones sobre la evolución de ambas enfermedades en España. Respecto a la EEB, se han detectado 803 focos y 824 casos desde el año 2000 hasta 2024. El último caso de EEB clásica diagnosticado en España data de 2014. La introducción de diversas medidas de control (restricciones en la alimentación del ganado y retirada y destrucción de los tejidos bovinos más contaminados) y la combinación de vigilancia activa y pasiva han permitido eliminar la forma epidémica de la EEB de la circulación, reduciéndose progresivamente el número de focos y aumentando la edad de los animales diagnosticados. En 2016, España consiguió el estatus de riesgo insignificante para EEB. En el caso del scrapie, las variantes clásicas son de origen infeccioso, destacando la transmisión horizontal a través de fluidos biológicos y fómites contaminados. En España se han detectado 655 focos y más de 3000 casos de scrapie desde el año 2000 hasta el año 2024. La introducción de las medidas anteriormente mencionadas para EEB y un plan de selección genética de polimorfismos resistentes al scrapie han contribuido al descenso del número de focos.

La intensidad de la vigilancia llevada a cabo para EEB, propició que en 2004 se descubrieron dos variantes atípicas, denominadas H y L, que aparecen habitualmente en animales de edad avanzada, cuyo origen parece ser esporádico y que en principio, no parece que supongan un riesgo para la Salud Pública. En España actualmente se siguen detectando de forma eventual. Respecto al scrapie, en el año 1998 se descubrió una variante atípica de la enfermedad vinculada a animales de edad avanzada y cuyo origen también parece ser esporádico.

Aunque parece que lo peor respecto a las EETs ha pasado, no hay que olvidar su naturaleza peculiar y los riesgos que plantea su persistencia en el ambiente y la capacidad de que se produzcan saltos de especie.

## **Actividades del Laboratorio Central de Veterinaria en el marco del programa de Vigilancia de la Fiebre del Nilo Occidental en animales durante el periodo 2021-octubre 2024**

M. Belén Gómez<sup>1\*</sup>, Maria José Ruano<sup>1</sup>, Ana López-Herranz<sup>1</sup>, Miguel Sanjurjo<sup>1</sup>, Rubén Villalba<sup>1</sup> y Montserrat Agüero<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Central de Veterinaria (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), Algete, España

\* mgmartin@mapa.es

La Fiebre del Nilo occidental (FNO) es una enfermedad infecciosa, no contagiosa, producida por un arbovirus zoonótico, perteneciente al género *Flavivirus*. En la actualidad, este virus se encuentra distribuido por todos los continentes exceptuando la Antártida. El ciclo endémico que lo mantiene se establece entre aves y mosquitos, principalmente del género *Culex*, que también está ampliamente distribuido. Los mamíferos, principalmente el ser humano y el caballo, son hospedadores accidentales y fondo de saco epidemiológico, sin capacidad de transmitir el virus a mosquitos. Se han descrito diferentes linajes del virus de la FNO, siendo los linajes 1 y 2 los que afectan a humanos, caballos y aves. El linaje 1 está distribuido a nivel mundial mientras que el 2 se ha descrito principalmente en África y Europa.

Entre los factores que contribuyen a aumentar el riesgo de diseminación de esta enfermedad están las condiciones climáticas favorables, la abundancia de vectores en contacto con aves y humanos y la presencia de aves migratorias infectadas. Dada la estratégica situación de España en relación con el paso de aves migratorias entre Europa y África, donde este virus es endémico, y la importancia de nuestros humedales como áreas de nidificación de muchas de estas aves, nuestro país tiene un riesgo alto de aparición de brotes. Por este motivo, desde el año 2007 los servicios veterinarios oficiales realizan un Programa de Vigilancia de la Fiebre del Nilo occidental (PVFNO), que se ha ido revisando y reforzando en función de la situación epidemiológica de la enfermedad.

Después de un aumento significativo del número de brotes en el año 2020, tanto en caballos como en humanos, se realizó un refuerzo del programa de vigilancia de FNO en sanidad animal, añadiendo la detección del patógeno dentro de la vigilancia entomológica y continuando la vigilancia en aves y en équidos en los mismos términos. También se reforzaron los mecanismos de colaboración con las autoridades de Salud pública, bajo el enfoque “One Health”.

En este trabajo se recogen las actividades de diagnóstico llevadas a cabo por el Laboratorio Central de Veterinaria (LCV) como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para la Fiebre del Nilo occidental (FNO) en animales, en el marco del PVFNO, durante el periodo 2021- octubre 2024, destacando la detección del virus en mosquitos como novedad del programa desde el año 2021 que ha permitido la detección de otros *Flavivirus*, Usutu y Bagaza, además de FNO. En conjunto, estos cambios contribuyen al seguimiento y control epidemiológico de la FNO y otros *Flavivirus*, teniendo en cuenta el alarmante repunte del número de casos de FNO en 2024, tanto en humanos como en animales.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).

## Toxoplasmosis ovina: hallazgos lesionales pocos conocidos

Julio Benavides<sup>1\*</sup>, Pablo Castaño<sup>1,3</sup>, Raquel Vallejo<sup>1,3</sup>, Miguel Fuertes<sup>3</sup>, Roberto Sánchez-Sánchez<sup>2</sup>, Rafael Calero-Bernal<sup>2</sup>, M<sup>a</sup> Carmen Ferreras<sup>1,3</sup>, Luis M. Ortega-Mora<sup>2</sup>, Daniel Gutiérrez Expósito<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-ULE. Grulleros. 24346, León

<sup>2</sup> SALUVET, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040, Madrid, España

<sup>3</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana, 24071, León

\* julio.benavides@csic.es

La toxoplasmosis ovina es una enfermedad de gran relevancia en la industria ganadera debido a su impacto negativo en la reproducción, siendo una de las principales causas de fracaso reproductivo en ovejas. A pesar de los avances en su estudio, existen importantes lagunas en el conocimiento sobre la patogenia del aborto en ovejas infectadas por *Toxoplasma gondii*. Al igual que en otras enfermedades que provocan abortos en ovinos, como la clamidiosis y la enfermedad de la frontera, los efectos de la infección por *T. gondii* varían dependiendo de la etapa de gestación. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a esta variación no han sido completamente esclarecidos. Se ha propuesto que la modulación inmunológica durante la gestación desempeña un papel clave, aunque aún no se ha determinado con precisión la magnitud de esta modulación, lo que sugiere la posible participación de otros factores aún desconocidos.

Estudios recientes han descrito una presentación clínica poco conocida de la toxoplasmosis ovina, caracterizada por abortos tempranos durante la fase aguda de la infección y una alta tasa de pérdida fetal, que en ovejas susceptibles puede llegar al 100%. Además, en el momento de ocurrir los abortos, la presencia de anticuerpos en el suero de la madre, o del parásito en la placenta son difíciles de detectar. La patogenia de esta nueva forma clínica difiere de la toxoplasmosis clásica y se caracteriza por presentar lesiones vasculares en la placenta y leucomalacia en el feto. Las lesiones vasculares parecen tener una importancia considerable en la fase aguda de la toxoplasmosis ovina, no solo asociadas a los abortos tempranos, si no a su presentación clásica también. Por otro lado, la leucomalacia fetal, muy característica de los abortos tempranos en la toxoplasmosis ovina y difícil de identificar por técnicas convencionales histológicas, puede detectarse en más del 90% de casos mediante la tinción inmunohistoquímica frente a la proteína  $\beta$ APP, que permite identificar su distribución en áreas específicas del encéfalo. Además, esta asociada a la pérdida de oligodendrocitos y a un aumento en el número de astrocitos y microglía. Estas son características patológicas similares a las observadas en el síndrome perinatal humano conocido como parálisis cerebral.

A pesar de que los hallazgos no revelaron diferencias lesionales en función de la dosis infectante o del área específica del cerebro afectada, las similitudes con los modelos experimentales de leucomalacia periventricular humana sugieren que un síndrome inflamatorio fetal podría estar implicado en la patogenia de los abortos tempranos en la toxoplasmosis ovina. Sin embargo, también se ha planteado la hipótesis de que la trombosis placentaria y la hipoxia resultante podrían contribuir al desarrollo de este cuadro. En conjunto, estos factores sugieren que la interacción entre la susceptibilidad individual, la virulencia del aislado y la respuesta inmunológica durante la gestación juegan un papel crucial en la manifestación clínica de la enfermedad.

Financiación: Proyecto PID2022-138673OB-C22 financiado por MICIU/AEI /10.13039/501100011033 y por FEDER, UE

## Control de plaguicidas en materias primas procedentes de importación para la elaboración de piensos

Ramón Checa Moreno<sup>1\*</sup>, Antonio López Mariscal<sup>1</sup>, Elena Villena de Francisco<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Análisis Químico de Residuos del Laboratorio Central de Sanidad Animal, Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Camino del Jau s/n, 18320, Santa Fe, Granada

\* rcheca@mapa.es

La seguridad alimentaria y por extensión la salud humana y animal depende en gran medida del control riguroso de los residuos de contaminantes. La creciente globalización de los mercados agroalimentarios ha incrementado la importancia del control de residuos de plaguicidas. El comercio exterior está sujeto al control fitosanitario que se realiza en los puestos de control fronterizos (PCF) dispuestos a lo largo de la geografía de España. La invasión rusa de Ucrania ha supuesto un duro golpe a la importación desde terceros países de cereales y otras materias primas destinadas a la producción de alimentos para el ganado; lo que ha obligado a diversificar los mercados a los que acceder.

Debido a la importancia que tienen estos controles, la Subdirección General de Acuerdos Sanitarios y Control en Frontera (SGASCF) requirió de la colaboración del Laboratorio Central de Sanidad Animal (LCSA) de Santa Fe (Granada), perteneciente a la reciente Subdirección General de Laboratorios de Sanidad Animal y Vegetal para proporcionar resultados analíticos rápidos, fiables y así agilizar los procesos de control fronterizo evitando la paralización de las mercancías.

Con este objetivo, en el LCSA se han implantado métodos analíticos robustos y eficientes para la determinación de una amplia gama de plaguicidas (más de 200) en muestras de piensos y materias primas para piensos (cereales, legumbres, harinas de pescado, etc). Se basan en una extracción con acetonitrilo previa humectación de las muestras y empleo de una mezcla de sales que incrementan la fuerza iónica del medio facilitando la distribución de los plaguicidas en la fase orgánica; lo que se conoce como metodología QuEChERS (“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe”, por sus siglas en inglés). El extracto se analiza mediante cromatografía líquida (UPLC) y cromatografía de gases (GC) acopladas a espectrometría de masas de triple cuadrupolo, para la identificación y posterior confirmación de los plaguicidas.

Este método ha sido validado y se encuentra en fase de acreditación, habiendo sido aplicado a diferentes materiales de referencia afines como harina de trigo, cebada y soja a través de la participación en ensayos de aptitud (FAPAS) pertenecientes a circuitos internacionales, obteniéndose buenas puntuaciones (Z-scores) y reforzándose de este modo su fiabilidad. Además, a modo de control, se han analizado muestras de maíz, trigo, alpiste, cebada, veza, o pipas de girasol procedentes de los PCF's de diferentes puntos de España habiéndose obtenido resultados plenamente compatibles con los emitidos por laboratorios de control oficial (LOC).

Adicionalmente se han implementado las oportunas modificaciones en el método para ser aplicado a matrices de mayor contenido lipídico como son las harinas de pescado, soja, semillas de girasol, etc., también empleadas en la producción de alimentos destinados a consumo animal.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).

## Sesión 2 comunicaciones orales

### Efecto de diferentes candidatos vacunales en el inmunodiagnóstico de la TB caprina y evaluación de antígenos como reactivos DIVA

Patricia Cuenca-Lara<sup>1\*</sup>, Miriam Blay-Benach<sup>1</sup>, Zoraida Cervera<sup>1</sup>, Cristian Melgarejo<sup>1</sup>, Julia Moraleda<sup>1</sup>, Iker A. Sevilla<sup>2</sup>, Joseba M. Garrido<sup>2</sup>, Mahavir Singh<sup>3</sup>, Gareth Jones<sup>4</sup>, Bernat Pérez de Val<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IRTA, Programa de Sanitat Animal, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra, Barcelona

<sup>2</sup> Departamento de Sanidad Animal, NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio, Bizkaia

<sup>3</sup> Lionex Diagnostics and Therapeutics GmbH, D-38126 Braunschweig, Germany.

<sup>4</sup> Department of Bacteriology, Animal and Plant Health Agency (APHA), Surrey KT15 3NB, UK

\* patricia.cuenca@irta.cat

La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica granulomatosa causada por miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, en caprinos principalmente por *M. caprae* y *M. bovis*. A pesar del impacto de la TB caprina, en la UE no se implementan programas oficiales de erradicación, y en regiones donde se aplican medidas de control en la especie caprina se suelen adaptar los programas de erradicación en bovinos. La vacunación se propone como método adicional cuando la estrategia de prueba-sacrificio no es factible.

El diagnóstico *ante mortem* oficial de la TB consisten en la prueba de intradermotuberculinización simple (IDTBs) y comparada (IDTBc) y la prueba de detección de interferón-gamma (IGRA), todas ellas basadas en la respuesta inmune celular frente a tuberculinas. La vacunación parenteral con la micobacteria viva o atenuada interfiere con las pruebas actuales de diagnóstico, lo que hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias vacunales con reactivos de diagnóstico basados en antígenos que permitan evitar estas interferencias. En este estudio se evaluaron los efectos de diferentes candidatos vacunales frente a la TB en el inmunodiagnóstico de la TB caprina y la aptitud de determinados antígenos como reactivos diagnósticos para evitar la interferencia con la vacunación.

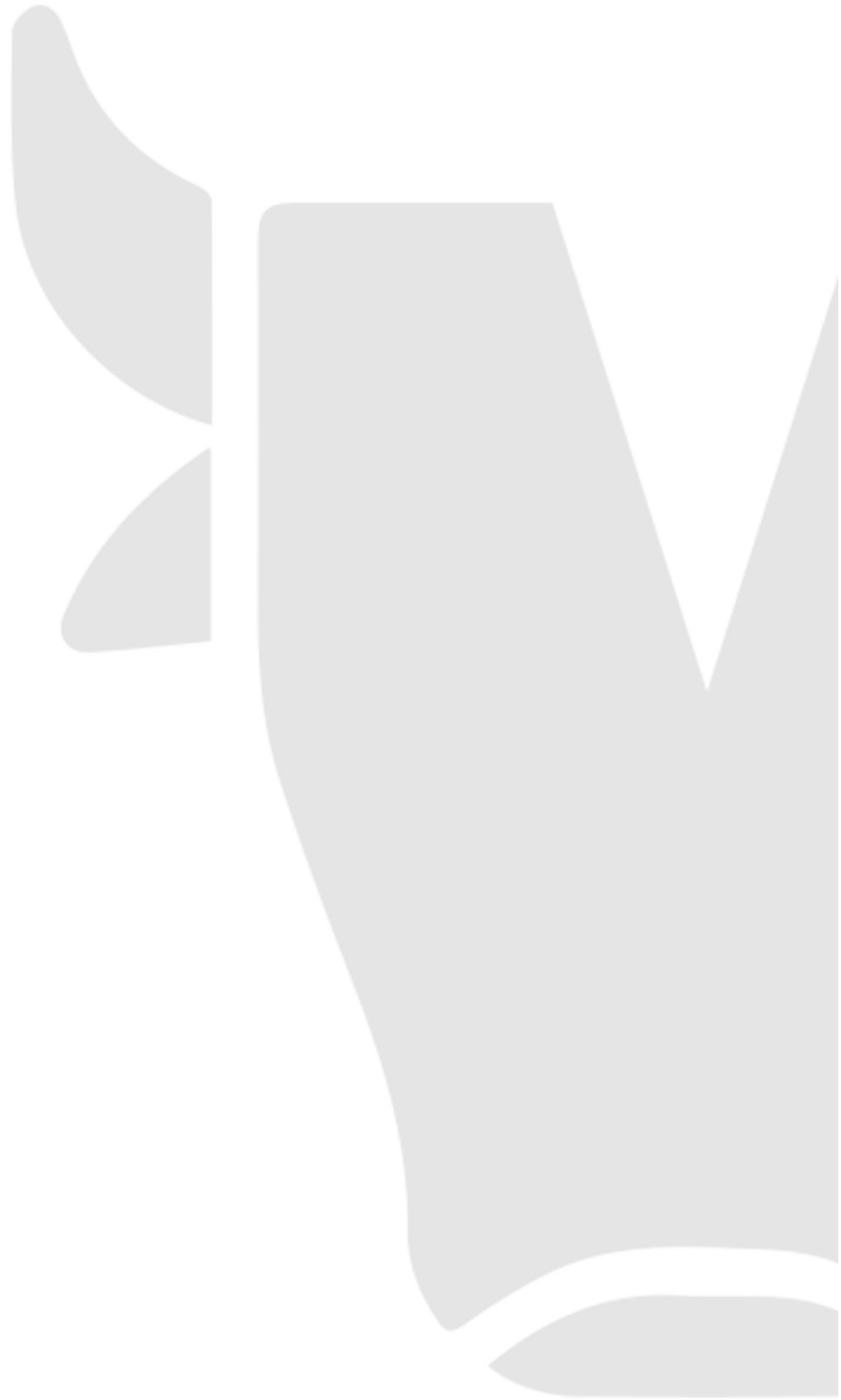
Treinta cabritos fueron divididos en cinco grupos de seis animales: 1) vacunados con *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG, intranasal, i.n.); 2) con *M. bovis* inactivado por calor (HIMB, i.n.); 3) con HIMB y un adyuvante mucosal (HIMBmuc, i.n.); 4) con HIMB (subcutáneo, s.c.) y un adyuvante parenteral (HIMBpar) y seis semanas después con HIMBmuc (i.n.); y 5) con BCG (s.c.) y seis semanas después con HIMBmuc (i.n.). Dos cabras fueron usadas como controles no vacunados.

La IDTB se realizó 14 semanas después de las vacunaciones parenterales y 8 semanas después de las intranasales, mediante la inoculación intradérmica (i.d.) de PPD bovina (PPDB), PPD aviar (PPDA) producidas por CZ Vaccines y la proteína de fusión DST-F compuesta por ESAT-6, CFP10 y EspC y producida por Lionex. El grosor del pliegue de piel se midió antes y 72 horas después de la inoculación. Paralelamente, se llevaron a cabo las pruebas IGRA estimulando sangre total con PPDB, PPDA y el cóctel antigénico DIGRA-C compuesto por los antígenos ESAT-6, CFP10 y EspC (Lionex). Se realizaron ensayos ELISA utilizando dos kits comerciales distintos (BOVIGAM™ TB e ID Screen® Ruminant IFN-g).

En los grupos vacunados con HIMB i.n. y HIMBmuc la respuesta inmune celular fue menor que en el resto de grupos, usando tanto PPDs como los antígenos específicos. Las IDTB e IGRAs mostraron respuestas significativamente mayores usando PPDB comparado con DST-F o DIGRA-C, respectivamente, en los grupos BCG i.n., HIMBpar-HIMBmuc y BCG-HIMBmuc, pero no en los grupos HIMB i.n. y HIMBmuc.

La especificidad de las pruebas basadas en tuberculinas se vio comprometida en los animales vacunados, especialmente en los grupos vacunados con BCG i.n. y en los dos grupos con la estrategia de vacunación-refuerzo. En cambio, el uso de los antígenos específicos minimizó las interferencias diagnósticas tanto en las IDTB como en los IGRAs, particularmente cuando se utilizaron las vacunas intranasales.

Financiación: Este estudio se financió por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España (Ref. PID2022-142939OR-C22).





## **Análisis proteómico de las tuberculinas y evaluación de antígenos alternativos**

Carlos Velasco<sup>1\*</sup>, Álvaro Roy<sup>1</sup>, Julio Álvarez<sup>1,2</sup>, Mercedes Domínguez<sup>3</sup>, Inmaculada Moreno<sup>3</sup>, Ana Belén Martín<sup>3</sup>, Sergio Ciordia<sup>4</sup>, Lucía de Juan<sup>1,2</sup>, Lucas Domínguez<sup>1,2</sup>, Beatriz Romero<sup>1,2</sup> y Javier Bezos<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

<sup>2</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

<sup>3</sup> Unidad de Inmunología Microbiana, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

<sup>4</sup> Servicio de Proteómica, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Madrid, España

\* carvelas@ucm.es

La tuberculosis (TB) es una zoonosis de alto impacto en la salud humana y animal. Por ello, se encuentra sometida a programas de erradicación en el ganado bovino. El diagnóstico de TB en los rumiantes domésticos se basa en pruebas que detectan la respuesta inmune de base celular como la prueba de intradermotuberculinización (IDTB) y el ensayo de liberación de interferón-gamma (IGRA). Sin embargo, estas técnicas tienen limitaciones en términos de sensibilidad y especificidad debido, entre otros factores, a la composición y calidad de las tuberculinas o derivados proteicos purificados (PPDs) empleados como reactivos. Las PPDs están, por lo general, insuficientemente caracterizadas en lo relativo a su composición y comparten antígenos con micobacterias no tuberculosas, limitando la especificidad de las técnicas diagnósticas de TB. Además, su potencia biológica puede diferir entre fabricantes. Las pruebas para determinar su potencia son complejas, requieren del empleo de animales de experimentación, y tienen una baja reproducibilidad y repetitividad. Por ello, existen líneas de investigación enfocadas en la búsqueda de métodos alternativos a las pruebas de potencia biológica y de reactivos sintéticos fácilmente estandarizables que puedan reemplazar a las PPDs.

Como posible método alternativo a las pruebas biológicas, se realizó un estudio proteómico en 11 PPDs bovinas. Con ello, pudimos establecer la correlación entre la abundancia normalizada de las proteínas más representadas en cada muestra con la potencia biológica obtenida en cobayas. Los análisis preliminares revelaron diferencias en términos de composición y abundancia proteica y sugirieron la presencia de determinadas proteínas altamente inmunogénicas (ESAT-6, MPB83, MPB63 y MTB12) que podrían servir de marcadores de la potencia. Además, observamos que la diferente composición de las PPDs tuvo efecto en los resultados del IGRA en 16 muestras de animales con TB, lo que podría afectar a los resultados diagnósticos.

Con el propósito de determinar la fiabilidad de otros antígenos más específicos como alternativas a las PPDs tradicionales, se evaluó el rendimiento del IGRA empleando la proteína de fusión DST-F y el complejo proteico P22. Para ello se seleccionaron 167 animales procedentes de 2 rebaños caprinos con infección de TB confirmada mediante cultivo microbiológico que se analizaron mediante IGRA empleando PPD bovina, DST-F y P22 y aplicando dos puntos de corte (0.1 y 0.05).

El mayor porcentaje de reactores fue observado empleando IGRA-P22 (17.9% y 29.8% cuando se aplicaron los puntos de corte de 0.1 y 0.05, respectivamente), significativamente mayor que el obtenido con IGRA-PPD (20.8%;  $p < 0.01$ ) al aplicar el punto de corte de 0.05. El porcentaje de reactores al IGRA-DST-F al aplicar el punto de corte más severo fue ligeramente superior (23.9%) al del IGRA-PPD, aunque no de forma significativa. En términos cuantitativos (densidad óptica), las lecturas usando P22 fueron significativamente mayores ( $p < 0.001$ ) con respecto a la PPD bovina y al DST-F. Estos resultados preliminares sugieren que el rendimiento de antígenos más específicos en la técnica del IGRA puede ser muy similares a los de las PPDs en términos de sensibilidad.

Financiación: Esta investigación ha sido posible gracias a la financiación de ICRAD, una red ERA-NET cofinanciada por el programa de investigación e innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea (<https://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/en>) en virtud del acuerdo de subvención n°862605, y el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España (MCIN/AEI/10.13039/501100011033) a través del proyecto "Improving the diagnosis of tuberculosis in domestic ruminants through the use of new antigens and test platforms" (referencia PCI2023-143368), y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España.

## El estudio genómico de *Mycobacterium bovis* revela la circulación extendida de genotipos muy similares y la presencia de puntos calientes de la infección en una región de alta prevalencia de Castilla y León

Víctor Lorente-Leal<sup>1\*</sup>, Pilar Pozo<sup>1</sup>, Francisco J. Lozano<sup>1</sup>, Javier Bezos<sup>1,2</sup>, Jesús Nacar-Cuesta<sup>3</sup>, Pablo Cisneros-Otero<sup>3</sup>, Soledad Collado<sup>4</sup>, Julio Álvarez<sup>1,2</sup> & Beatriz Romero<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Vigilancia Sanitaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid

<sup>2</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid

<sup>3</sup> Dirección General de producción Agrícola y Ganadera. Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural de la Junta de Castilla y León, Valladolid

<sup>4</sup> Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, Dirección General de Sanidad de la Producción Agroalimentaria y Bienestar Animal, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid

\*vicloren@ucm.es

A pesar de los avances obtenidos en la erradicación de la tuberculosis bovina, esta enfermedad infecciosa sigue siendo un problema en algunas regiones de España. Para esclarecer los determinantes de la infección en estas zonas y ayudar a los programas de erradicación en su labor, es necesario conocer el grado de parentesco entre las cepas que la producen en una población.

El objetivo de este estudio fue analizar la diversidad genética de *Mycobacterium bovis*, el principal agente causal de la tuberculosis animal, en una comarca de alta prevalencia (CAP) en Castilla y León con el fin de identificar las dinámicas de transmisión entre las unidades epidemiológicas (UE) y especies afectadas. Para ello, se analizaron mediante secuenciación masiva un total de 191 aislados (bovino = 186; jabalí = 4; y ciervo = 1) procedentes de 109 UE (mediana: 1 aislado/UE; rango intercuartílico/RIC: 1-2) en 31 municipios de la CAP (mediana: 2 UE/municipio; RIC: 1-5) entre los años 2020 y 2022. Se realizó un análisis de variantes (SNPs) para establecer la similitud genética entre aislados y una búsqueda de mecanismos genéticos de resistencia antimicrobiana *in silico* empleando el catálogo de mutaciones de la Organización Mundial de la Salud.

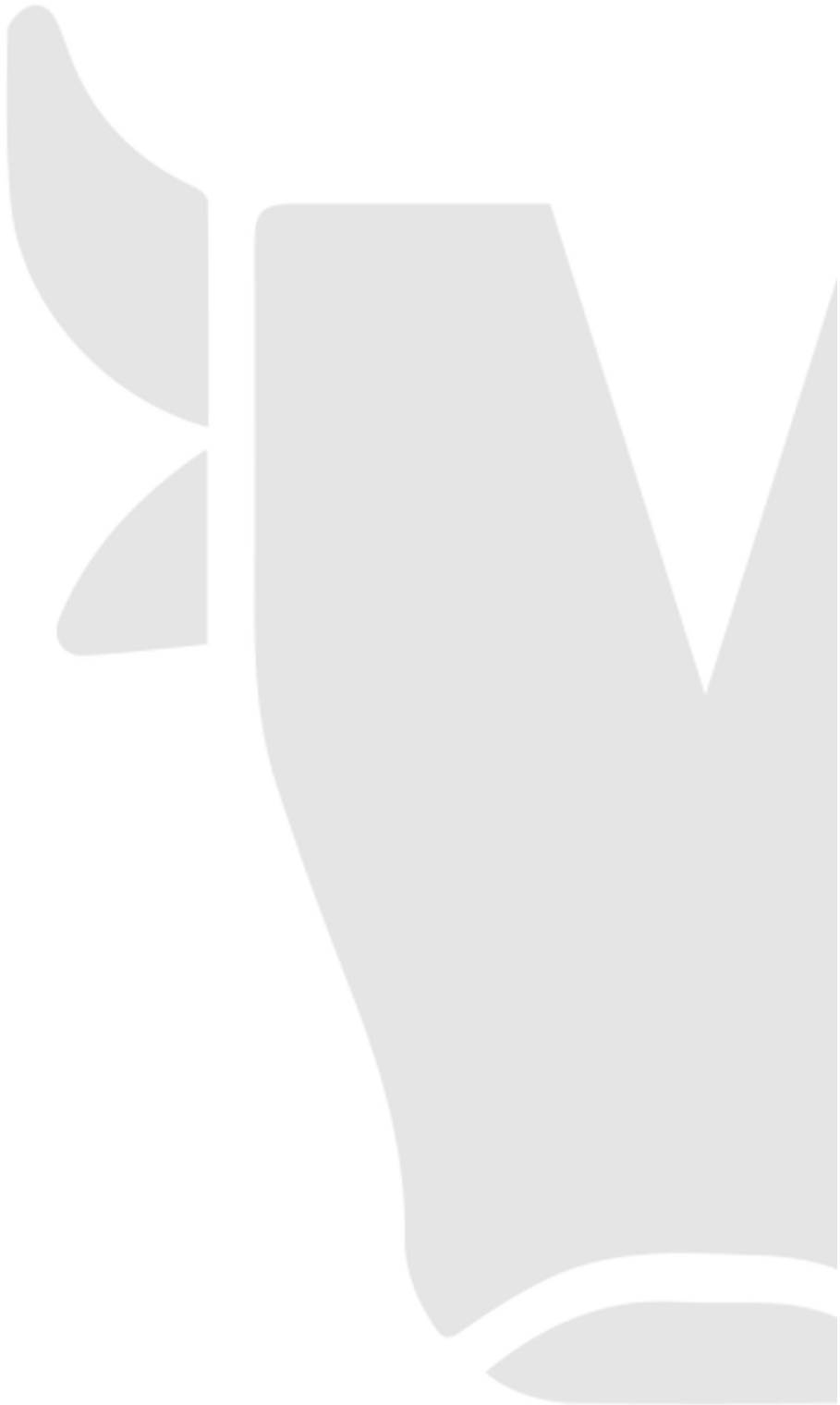
Se identificaron 8 clústeres (A-H) de aislados (mediana: 11 aislados/clúster; RIC:4-37) con posibles vínculos epidemiológicos (< 12 SNPs) que englobaron el 98.4% (n = 188) de los aislados. Tres de ellos (A, B y D) fueron detectados en la mayoría de los municipios (84%; n = 26) y UE (89%; n = 94) analizadas. La diversidad en estos clústeres fue baja, con distancias genéticas medianas de 2 SNPs (rango: 0-6) para el clúster A, 3 SNPs (rango: 0-10) para el B y 4 SNPs (rango: 0-9) para el D. Los clústeres con mayor diversidad (B y D) tuvieron una mayor dispersión geográfica, con distancias máximas de hasta 50 km en comparación con el clúster A (30 km). En la mayoría de las UE analizadas se detectó un único clúster, con excepción de 8 UE en las cuales se identificaron hasta 4 clústeres distintos. Se identificó una mutación en el gen *inhA* (Ser94Ala) asociada a susceptibilidad reducida a isoniacida y etionamida en los aislados del clúster A. En combinación con otras mutaciones, esta sustitución puede producir altos niveles de resistencia, lo cual podría tener graves implicaciones en salud pública en el futuro.

Los resultados de este estudio reflejan una situación epidemiológica compleja en la CAP en estudio, donde la gran mayoría de los aislados fueron muy similares entre sí, sugiriendo una circulación local del patógeno en los municipios afectados. La detección de UE con más de un clúster sugiere la existencia de posibles puntos calientes, donde la mayor diversidad podría reflejar múltiples focos de la infección y como consecuencia un mayor riesgo de transmisión para otras UE de esas zonas y aledañas. La detección de una mutación en el gen *inhA* en los aislados del clúster A subraya la importancia de erradicar este patógeno con el fin de salvaguardar la sanidad pública y animal.

Financiación:

- "Realización de trabajos relacionados con el Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis en Especies Domésticas y el Plan de Actuación frente a Tuberculosis en Especies Silvestres." ART. 83 Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (230-2020).

- “Apoyo científico y técnico prestado por el Laboratorio Europeo de Referencia de tuberculosis bovina para el asesoramiento y la elaboración de estudios epidemiológicos”. Dirección General de producción Agrícola y Ganadera. Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural de la Junta de Castilla y León (Expediente a2019/001188).
- “Caracterización de las vías de transmisión de la tuberculosis bovina en un área de alta prevalencia”. Ayudas para la realización de proyectos de I+D para jóvenes investigadores de la UCM; Convocatoria 2021 (PR27/21).



## Identificación de casos de tuberculosis zoonótica mediante secuenciación de genoma completo

Bernat Pérez de Val<sup>1\*</sup>, Enric Vidal<sup>1</sup>, Zoraida Cervera<sup>1</sup>, Julia Moraleda<sup>1</sup>, Carlos Escartín Huesca<sup>2</sup>, Tod Stuber<sup>3</sup>, Tyler Thacker<sup>3</sup>, Carles Riera<sup>4</sup>, Albert Sanz<sup>4</sup>, Jose Luís Sáez<sup>5</sup>, María Teresa Tórtola<sup>2</sup>

<sup>1</sup> IRTA, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA, IRTA-UAB), Bellaterra, Barcelona.

<sup>2</sup> Servei de Microbiologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Barcelona

<sup>3</sup> National Veterinary Services Laboratories, U.S. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, Ames, IA, United States

<sup>4</sup> Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació de la Generalitat de Catalunya, Barcelona

<sup>5</sup> Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid

\*bernat.perez@irta.cat

*Mycobacterium bovis* y *M. caprae* son los principales agentes etiológicos de la tuberculosis (TB) animal, pudiendo también infectar a los seres humanos. En este estudio retrospectivo se planteó utilizar la secuenciación del genoma completo (SGC) para estudiar las relaciones filogenéticas entre las cepas de *M. bovis* y *M. caprae* aisladas de animales y pacientes humanos con TB en Cataluña entre 2005-2023 e identificar posibles casos de transmisión zoonótica.

Se analizaron muestras de ADN de aislados de *M. bovis* (225 de animales y 39 de humanos) y *M. caprae* (97 de animales y 4 de humanos) mediante SGC (Illumina, MiSeq). Las secuencias se alinearon con el genoma de referencia *M. bovis* AF2122/97 (NC\_002945.4) y se identificaron polimorfismos de un solo nucleótido (PSN) utilizando la herramienta bioinformática vSNP (<https://github.com/USDA-VS/vSNP>). Las filogenias se construyeron mediante el método de Máxima Verosimilitud (programa RAxML) y se analizaron las distancias de PSN secuencias. Primeramente se clasificaron las cepas en grandes grupos filogenéticos (clados) y posteriormente se identificaron aquellas muy estrechamente relacionadas ( $\leq 6$  PSN), estrechamente relacionadas (7-12 PSN) o moderadamente relacionadas (13-18 PSN), que se analizaron junto con los metadatos asociados a los aislados para identificar patrones putativos de transmisión.

*M. bovis* mostró una amplia diversidad genética (hasta 7 clados), sin embargo, más de un tercio de los aislados en humanos (N=14) formaban parte del mismo clado, dentro del cuál se identificaron todas las posibles transmisiones entre humanos y animales: un aislado humano mostró una relación cercana con dos aislados bovinos (7 PSN con el ancestro común) sugiriendo eventos de transmisión indirecta mediados por individuos no analizados, mientras que otros dos aislados humanos mostraron una muy estrecha (PSN con el ancestro común) y moderada (17 PSN con el ancestro común) relación, respectivamente, con aislados de dos ovejas. Sorprendentemente, los dos aislados humanos pertenecían al mismo paciente y fueron aisladas el mismo año. La investigación epidemiológica reveló que ambas pertenecían a la persona titular de la explotación ovina, sugiriendo diversas transmisiones durante un largo periodo de tiempo entre los animales y el paciente humano, posiblemente en ambas direcciones.

Por otro lado, los cuatro aislados de *M. caprae* en pacientes humanos formaban parte del mismo clado. Dos de ellos mostraron relaciones estrechas y uno muy estrechas con aislados obtenidos en cabras y ovejas. En este último caso, los aislados del paciente humano y de caprinos de un rebaño próximo a su residencia (<20Km) estaban relacionados hasta tal punto que podrían considerarse la misma cepa ( $\leq 4$  PSN con el ancestro común), sugiriendo una posible transmisión directa entre el paciente y estos animales.

Los resultados refuerzan la necesidad de cooperación entre las autoridades de salud pública y sanidad animal para implementar medidas específicas de control de la TB en pequeños rumiantes y así minimizar los riesgos para los trabajadores del sector ganadero. Los hallazgos demuestran que la SGC es una herramienta muy útil en la investigación epidemiológica de brotes de TB, pudiendo ser utilizada también de forma prospectiva para rastrear los nuevos casos y romper las cadenas de transmisión.

Financiación: Proyecto INNOTUB II/EFA115/01, Programa Interreg POCTEFA 2021-27 (Comisión europea), cofinanciado por los FEDER.

## Evaluación de la protección y la interferencia diagnóstica de vacunas frente a la tuberculosis animal en los modelos de cobaya y de ratón

Leire Fernández-Veiga<sup>1\*</sup>, Miguel Fuertes<sup>1</sup>, María V. Geijo<sup>1</sup>, Natalia Elguezabal<sup>1</sup>, Rafael Prados-Rosales<sup>2</sup>, David Sánchez-Martel<sup>1</sup>, Lorraine Michelet<sup>3</sup>, Maria Laura Boschioli<sup>3</sup>, Bernat Pérez de Val<sup>4,5</sup>, Gareth J. Jones<sup>6</sup>, Ramón A. Juste<sup>1</sup>, Joseba M. Garrido<sup>1</sup>, Iker A. Sevilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 48160, Derio, Bizkaia

<sup>2</sup> Department of Preventive Medicine and Public Health and Microbiology, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, 28039, Madrid

<sup>3</sup> Université Paris-Est, Laboratoire de Santé Animale, Unité Zoonoses Bactériennes, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), 94701, Maisons-Alfort, France.

<sup>4</sup> IRTA, Programa de Sanitat Animal, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193, Bellaterra, Catalonia

<sup>5</sup> Unitat mixta d'investigació IRTA-UAB en Sanitat Animal, CReSA, Campus de la UAB, 08193, Bellaterra, Catalonia

<sup>6</sup> Department of Bacteriology, Animal and Plant Health Agency (APHA), KT15 3NB, Surrey, United Kingdom.

\*lfernandez@neiker.eus

Los programas de erradicación de la tuberculosis han logrado resultados favorables en muchas regiones. Sin embargo, la infección, causada principalmente por *Mycobacterium bovis* o *M. caprae*, sigue minando considerablemente la rentabilidad de la industria ganadera, sobre todo en regiones o países donde la infección persiste y/o esta estrategia es socioeconómicamente inviable. En este escenario, la vacunación surge como una alternativa prometedora y rentable para ayudar a reducir el impacto y la propagación de la enfermedad en diferentes especies y entornos, siempre que sea segura y eficaz, y no interfiera con el diagnóstico. En este estudio, realizamos una evaluación preliminar de la interferencia diagnóstica y la capacidad protectora de siete prototipos de vacunas preparadas a partir de *M. bovis*, *M. caprae* y *M. microti*: tres inactivadas por calor, tres inactivadas por fagos y una vacuna viva atenuada. La interferencia diagnóstica se evaluó en cobayas y la protección en ratones. Todas las vacunas ensayadas indujeron reacciones en la intradermorreacción (IDR) en respuesta a la tuberculina bovina estándar (PPD-B), pero fueron menores en los grupos de vacunas inactivadas por fagos. Además, las vacunas probadas fueron compatibles con la IDR de antígenos específicos basados en ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c. A diferencia del resto de los prototipos, la vacunación con *M. microti* inactivada por calor y por fagos no provocó la producción de anticuerpos detectables contra los antígenos MPB70/83. La carga bacteriana fue menor en todos los grupos vacunados en comparación con el control, especialmente en las muestras de pulmón de los grupos de *M. microti* inactivada por calor y *M. caprae* inactivada por calor y por fagos. Considerando de manera conjunta tanto la interferencia diagnóstica global (independientemente de que se usen los antígenos oficiales o los específicos) como el grado de protección conferido, la vacuna de *M. microti* inactivada por calor resultó la más prometedora. No obstante, otros de los prototipos, como los basados en inactivación mediante fagos o en cepas vivas atenuadas, también merecen continuar siendo optimizados y evaluados. Resulta necesario invertir más recursos en el desarrollo de nuevas vacunas dirigidas a controlar e incluso erradicar la tuberculosis animal.

Financiación: PID2019-105155RB-C33 y PID2022-142939OR-C21 subvencionado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y "FEDER Una forma de hacer Europa". EFA115/01 INNOTUB II INTERREG-POCTEFA 2021-2027.

## **Desarrollo de ensayos de identificación de paneles de variantes localizadas en regiones codificantes de genes asociados a la susceptibilidad y resistencia a la infección por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en la raza Holstein**

Gerard Badia-Brinqué<sup>1</sup>, Stephanie Lam<sup>2</sup>, Ángela Cánovas<sup>2</sup>, and Marta Alonso-Hearn<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, NEIKER- Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 48160 Derio, Bizkaia

<sup>2</sup> Department of Animal Biosciences, Center for Genetic Improvement of Livestock, University of Guelph, N1G2W1 Guelph, Ontario, Canada

\* malonso@neiker.eus

La paratuberculosis bovina (PTB) es una enfermedad inflamatoria crónica del ganado bovino que causa importantes pérdidas económicas a nivel mundial. Una estrategia de control de esta enfermedad generalmente aceptada es la que se basa en la selección de animales resistentes a la enfermedad. Los estudios de asociación a genoma completo (GWAS) han permitido identificar polimorfismos de secuencia única (SNPs) asociados a la susceptibilidad y resistencia a la PTB. Sin embargo, la mayoría de los SNPs que se identifican mediante GWAS se localizan en regiones no codificantes de genes. Los SNPs en regiones codificantes de proteínas (cSNPs) pueden alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente, provocar efectos deletéreos en su estructura, alterar su función y ser causantes de la resistencia y susceptibilidad del hospedador a enfermedades.

El objetivo de este estudio es el de identificar cSNPs con efectos deletéreos empleando datos de secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq) de muestras de sangre y válvula ileocecal pertenecientes a vacas de la raza Holstein sin lesiones y con lesiones intestinales asociadas a la PTB de tipo focal y difusa. Para ello, las secuencias de RNA se alinearon con el genoma de referencia bovino (ARS-UCD1.2.109) utilizando *STAR*, y se identificaron SNPs usando la herramienta *BCFtools*. La predicción del efecto que los cSNPs identificados podrían tener en la proteína y la identificación de regiones genéticas y genes candidatos en los que se localizaban los cSNPs deletéreos se llevó a cabo empleando *VeP* y *GALLO*, respectivamente. De los 856, 625, y 603 cSNPs exclusivamente identificados en el transcriptoma de los animales sin lesiones y con lesiones focales y difusas; 31, 15, y 31 tenían efectos deletéreos en las correspondientes proteínas, respectivamente. Los cSNPs con efectos deletéreos identificados en el grupo de animales con lesiones focales se localizaron mayoritariamente en regiones genéticas que previamente se habían asociados a la respuesta inmune celular mientras que en el grupo de animales con lesiones difusas y sin lesiones se localizaron en regiones determinantes de número de células sanguíneas. El análisis de enriquecimiento funcional llevado a cabo con los genes candidatos afectados por los cSNPs deletéreos reveló un enriquecimiento de genes implicados en la regulación negativa de la apoptosis y del metabolismo celular en los animales con lesiones focales y del reconocimiento y presentación de antígenos en los animales sin lesiones y con lesiones difusas. El único gen candidato que se vio afectado por distintos cSNPs deletéreos en los tres grupos de animales fue el *BOLA*, el homólogo bovino del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MCHII).

Los cSNPs identificados permitirán el desarrollo de estrategias de selección genética dirigidas a mejorar la resistencia genética a la PTB y de ensayos rápidos para detección de paneles de cSNPs asociados a la susceptibilidad y resistencia a la PTB. Estos ensayos rápidos basados en la detección de un número reducido de cSNPs permitirán acortar el tiempo que requieren los actuales métodos de genotipado.

Financiación: RTI2018-094192-R-C21 y PID2021-122197OR-C21 financiados por AEI/10.13039/501100011033 y FEDER, "una manera de hacer Europa". Gerard Badia-Brinqué es beneficiario de un contrato predoctoral (PRE2019-090562) financiado MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y "FSE Invierte en tu futuro".

## Evaluación de la resistencia/susceptibilidad genética al virus de la arteritis equina en caballos de Pura Raza Española

Paloma Gago<sup>1,2\*</sup>, Abel Dorrego<sup>1</sup>, Alejandra Ráez<sup>1</sup>, Belén Rivera<sup>1</sup>, Mercedes Domínguez<sup>3</sup>, Inmaculada Moreno<sup>3</sup>, Lucía de Juan<sup>1,2</sup>, Fátima Cruz-López<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, España.

<sup>2</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, España.

<sup>3</sup> Unidad de Inmunología Microbiana, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220, Majadahonda, España.

\* palomagago@ucm.es

El virus de la arteritis equina (VAE) es el agente causal de la arteritis viral equina (AVE), una enfermedad respiratoria, sistémica y reproductiva presente en casi todo el mundo, excepto en Japón, Islandia y Nueva Zelanda. Entre el 10% y 70% de los sementales infectados quedan como portadores persistentes, excretando el virus en el semen durante semanas o de por vida, jugando un papel clave en la transmisión y mantenimiento del VAE en la población. Diversos estudios han demostrado que un porcentaje de animales son susceptibles a la infección por el virus siendo la célula diana los linfocitos CD3<sup>+</sup>, asociándose la susceptibilidad al haplotipo ECA11 (cromosoma 11), y presentando cuatro polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen *CXCL16*, donde el alelo *CXCL16<sup>S</sup>* se relaciona con la capacidad del virus para establecer un estado de portador a largo plazo, mientras que el alelo *CXCL16<sup>r</sup>* confiere resistencia; los caballos con genotipos *CXCL16<sup>S/S</sup>* o *CXCL16<sup>S/r</sup>* son susceptibles a convertirse en portadores a largo plazo del VAE, mientras que los homocigotos *CXCL16<sup>r/r</sup>* muestran resistencia o un estado de portador de corta duración.

El objetivo principal de este estudio fue determinar el porcentaje de genotipos resistentes y susceptibles al VAE en caballos sanos de Pura Raza Española (PRE) residentes en España. Se recogieron muestras de sangre completa con anticoagulante (EDTA) de 120 caballos (27 hembras y 93 machos) entre el año 2021 y 2024. Tras extraer el ADN genómico total de las células mononucleares de sangre periférica, se realizó genotipado del gen *CXCL16* equino mediante una qPCR a tiempo real de discriminación alélica, utilizando sondas TaqMan® que se unen selectivamente a Adenina (*CXCL16<sup>r</sup>*) o Timina (*CXCL16<sup>S</sup>*).

En la población de caballos PRE estudiada, se identificaron tres genotipos con las siguientes distribuciones: *CXCL16<sup>S/S</sup>* (Susceptible) (n = 9) 7.5%, *CXCL16<sup>S/r</sup>* (Susceptible) (n = 41) 34.2% y *CXCL16<sup>r/r</sup>* (Resistente) (n = 70) 58.3%. A pesar de que en los machos se observó un porcentaje de genotipo resistente ligeramente mayor que en las hembras (59.1% vs 55.6%, respectivamente), las diferencias entre ambos sexos en los porcentajes de los distintos genotipos no fueron estadísticamente significativas (p = 0.94).

Los resultados son consistentes con estudios previos que indican que la frecuencia de caballos con genotipo resistente y susceptible varía entre razas. El porcentaje de caballos PRE con genotipo resistente sería ligeramente superior al del caballo Cuarto de Milla (45%) y ligeramente inferior al del caballo Pura sangre inglés (66%) publicados en otros estudios, con un porcentaje de genotipo *CXCL16<sup>S/S</sup>* (susceptible) similar al del caballo Cuarto de Milla (8%).

El genotipado basado en *CXCL16* permite la identificación de los sementales con mayor riesgo de ser portadores del VAE, facilitando la implementación de estrategias de vacunación selectiva y optimizando la cría selectiva de caballos con genotipo resistente para ayudar a controlar la enfermedad en la población equina. La obtención de genotipo resistente mayoritario en hembras, similar a lo que ocurre en machos, sugiere la necesidad de realizar estudios en yeguas para determinar diferencias en la susceptibilidad a la infección por el virus.

Financiación: Ayudas para contratos predoctorales UCM de personal investigador en formación. Programa de Financiación de Universidad Complutense de Madrid-Banco Santander. Convocatoria 2020 (CT82/20-CT83/20).

## Sesión 3 comunicaciones Orales.

### Caracterización de la microbiota del calostro bovino mediante metabarcoding del gen 16S rRNA completo usando tecnología Oxford-Nanopore de secuenciación de fragmentos largos

Leire Urrutia-Angulo<sup>1\*</sup>, Medelin Ocejo<sup>1</sup>, Beatriz Oporto<sup>1</sup>, Gorka Aduriz<sup>1</sup>, Ana Hurtado<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, NEIKER - Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 48160, Derio, Bizkaia

\* lurrutia@neiker.eus

El calostro bovino proporciona al ternero un aporte nutricional e inmunológico fundamental. Al nacimiento, el ternero es inmunodeficiente y el calostro es su principal fuente de células inmunitarias. Además de la calidad inmunológica del calostro, su calidad microbiológica puede ser también relevante para la colonización y establecimiento de la microbiota intestinal de los terneros.

En este estudio se ha caracterizado la población bacteriana del calostro mediante 16S-metabarcoding utilizando la tecnología de secuenciación de fragmentos largos de Oxford-Nanopore Technologies (ONT). Para ello, entre septiembre 2022 y mayo 2023, se recogieron muestras de calostro de 42 vacas de raza Holstein-Friesian, 17 de las cuales habían sido tratadas con terapia antibiótica al secado (DCT, VIRBACTAN 150 mg pomada intramamaria). Tras la extracción del DNA, se prepararon las librerías siguiendo el protocolo 1-24 16S Barcoding y se secuenciaron (FLO-MIN106D) en un MinION Mk1C. Se realizó un *basecalling* de alta precisión (HAC), se eliminaron los adaptadores con Guppy y se evaluó la calidad de las lecturas con FastQC. La asignación taxonómica se realizó con NanoCLUST y la base de datos NCBI 16S rRNA. El análisis estadístico se realizó con diversos paquetes en RStudio.

Tras filtrar las muestras con menos de 10.000 lecturas, momento en el cual las curvas de rarefacción habían alcanzado la meseta (suficiente profundidad de secuenciación), se obtuvieron un total de 1.975.682 lecturas (56.394 lecturas/muestra, QScore promedio de 20,1). Se identificaron 342 especies pertenecientes a 226 géneros. No se vieron diferencias significativas asociadas al DCT en la alfa y beta diversidad; sólo el género *Shigella* fue diferencialmente más abundante (Lfc 2,04; q valor 0,02) en el calostro de los animales tratados (DCT). Los filos más abundantes fueron *Bacillota* (66,5%) y *Pseudomonadota* (23,9%); entre los géneros predominaron *Romboutsia* (8,0%), *Staphylococcus* (7,0%), *Pseudomonas* (5,9%) y *Paraclostridium* (5,8%), aunque fueron unas pocas muestras las que contribuyeron a la alta prevalencia de *Staphylococcus* y *Pseudomonas*. El microbioma central (*core*, bacterias presentes en  $\geq 75\%$  de las muestras con abundancia relativa  $\geq 0,1\%$ ) lo constituían ocho géneros y siete especies, siendo *Paraclostridium* y *Romboutsia* los géneros más prevalentes. El análisis de *enterotyping*, realizado para clasificar los calostros en función de la composición de su microbioma, identificó inicialmente 13 grupos, muchos de ellos compuestos por 1-2 muestras (8 grupos, 12 muestras). Tras excluir estas muestras, se identificaron tres enterotipos caracterizados por los géneros marcadores *Clostridium* (enterotipo 1), *Lacicoccus* (enterotipo 2) y *Lentimicrobium* (enterotipo 3), viéndose además 12 géneros con diferencias significativas en sus abundancias relativas entre enterotipos.

Este estudio sugiere que el tiempo transcurrido desde el tratamiento al secado hasta el parto (promedio 76 días) es suficiente para revertir cualquier posible efecto sobre la microbiota original del calostro. El análisis de la calidad inmunológica de las muestras (IgGs, subpoblaciones de células T), actualmente en proceso, permitirá complementar la caracterización del calostro con sus perfiles inmunológicos. Aunque la aplicación de estos análisis al diagnóstico de rutina podría no ser todavía económicamente viable, la caracterización de los parámetros de calidad microbiológica e inmunológica del calostro sería muy útil para la optimización del enalostro de los terneros.

Financiación: MCIN/AEI /10.13039/501100011033 FEDER "Una manera de hacer Europa" (Proyecto\_PID2019-106038RR-100) y MCIN/AEI /10.13039/501100011033 FSE "Invierte en tu futuro" (Ayuda\_PRE2020-096275). Departamento de Alimentación, Desarrollo Rural, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco.



## Optimización de un protocolo de qPCR para la identificación rápida de mosquitos invasores *Aedes albopictus* y *Aedes japonicus* en programas de vigilancia entomológica

Patirke Ibarrondo-Mendiola<sup>1\*</sup>, Beatriz Oporto<sup>1</sup>, Patricia Vázquez<sup>1</sup>, Jesús F. Barandika<sup>1</sup>, Aitor Cevidanes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal. NEIKER- Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario. Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio, Bizkaia

\* patirke.ibarrondo@neiker.eus

La vigilancia entomológica de mosquitos invasores es crucial para la detección temprana y el control de enfermedades transmitidas por vectores (VBD, por sus siglas en inglés). En regiones como el País Vasco, las especies invasoras *Aedes albopictus* y *Aedes japonicus* están en expansión, lo que aumenta el riesgo de brotes epidémicos. Tradicionalmente, la identificación de especies ha dependido de métodos laboriosos, como la eclosión de huevos y la identificación morfológica de adultos, lo que retrasa los tiempos de respuesta en posibles emergencias de salud pública.

Para superar estas limitaciones, hemos desarrollado un protocolo específico de qPCR para la identificación rápida de huevos de *Ae. albopictus* y *Ae. japonicus* directamente desde las tablillas de oviposición, eliminando la necesidad de eclosión de huevos o secuenciación. Nuestro protocolo incluye una extracción de ADN optimizada utilizando resina Chelex, la cual toma aproximadamente menos de 2 horas, simplificando y acelerando la preparación de muestras. Los cebadores y las sondas específicas para cada especie fueron diseñadas considerando todos los haplotipos relevantes y otras especies de *Aedes* no objetivo. El ensayo utiliza el Premix Ex Taq master mix (Takara Bio) y sondas FAM y CY5 para la detección específica de especies.

Durante la validación, la qPCR demostró la capacidad de detectar un solo huevo de cualquiera de las especies, incluso en muestras mixtas, lo que destaca su alta sensibilidad. Las pruebas con diferentes combinaciones del número de huevos de ambas especies confirmaron la especificidad y robustez del ensayo. Este enfoque ha reducido significativamente el tiempo necesario para la identificación de especies, permitiendo respuestas más rápidas en los programas de vigilancia. Desde la implementación de este método, durante la vigilancia entomológica de 2024, se han recolectado hasta agosto un total de 2546 tablillas. De estas, en 612 (24,0%) se detectaron huevos compatibles con *Aedes* sp. Se la PCR duplex a huevos de 343 tablillas, dieron positivo para una o ambas especies, lo que representa 56,0% de las tablillas positivas. Específicamente, el 45,8% de las tablillas analizadas resultaron positivas para *Ae. albopictus*; 40,5% para *Ae. japonicus*; y 9,3% para ambas especies.

Este protocolo de qPCR recientemente optimizado proporciona una herramienta eficaz para la vigilancia de *Aedes* spp. Invasores, facilitando intervenciones rápidas y efectivas para prevenir la propagación de estos vectores a nuevas áreas.

Financiación: Departamento de Alimentación, Desarrollo Rural, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco; proyecto EU-LIFE 18 IPC/ES/000001 (Urban Klima 2050). AC disfruta de una beca postdoctoral 'Ramón y Cajal' RYC2021-033084-I financiada por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por la European Union NextGeneration EU/PRTR. PIM disfruta de una beca IKERTALENT del Departamento de Desarrollo Económico, Sostenibilidad y Medio Ambiente del Gobierno Vasco.

## Caracterización mediante secuenciación de genoma completo de enterobacterias productoras beta-lactamasas de amplio espectro aisladas de erizos encontrados en la provincia de Barcelona

Biel Garcias<sup>1\*</sup>, Chiara Seminati<sup>1</sup>, Samuel K. Sheppard<sup>2</sup>, Rafael A. Molina-López<sup>3</sup>, [Laila Darwich](#)<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Facultat de Veterinària UAB, Cerdanyola del Vallès, Barcelona

<sup>2</sup> Ineos Oxford Institute for Antimicrobial Research, University of Oxford, Oxford

<sup>3</sup> Centre de Fauna Salvatge de Torreferrussa, Santa Perpètua de Mogoda, Barcelona

\* [biel.garcias@uab.cat](mailto:biel.garcias@uab.cat)

El uso y abuso de antibióticos en las últimas décadas, tanto en salud humana como animal, ha provocado una situación de alerta sanitaria debido a la emergencia de resistencias antimicrobianas. La vigilancia epidemiológica de los animales salvajes, sobre todo aquellos en zonas urbanas y perurbanas, puede ser un buen indicador de lo que generan estos tratamientos. Los erizos son una de las especies donde más resistencias se han encontrado a nivel fenotípico. Por esta razón se secuenciaron 39 enterobacterias aisladas a partir del medio Agar MacConkey suplementado con ceftriaxona, procedentes de muestras fecales de erizos de la provincia de Barcelona. Los genes de resistencia a los antibióticos fueron detectados con la base de datos Resfinder y los plasmidios fueron reconstruidos con la combinación de los programarios plasmidEC y MOB-Suite y posteriormente identificados de acuerdo la base de datos Plasmidfinder. Los secuenciotipos (ST) fueron determinados mediante MLST.

Se detectaron bacterias pertenecientes al género *Klebsiella* (n=24, 61.5%), *Escherichia coli* (n=13, 33.3%), *Serratia marcerens* (n=1, 2.6%) y *Enterobacter cloacae* (n=1, 2.6%). A parte de las betalactamasas como era esperable por el medio que se usó, las cepas contenían un número elevado de genes de resistencia (10.4 de media), confiriendo resistencia a una media de 6.1 familias de antibióticos diferentes.

Dentro de las cepas del género *Klebsiella* se encontraron tres especies distintas: *Klebsiella aerogenes* (n=1), *Klebsiella oxytoca* (n=4) y *Klebsiella pneumoniae* (n=19), siendo estas últimas las que eran portadoras de un mayor número de genes de resistencia. Se detectaron distintos ST implicados en brotes nosocomiales con ST307 (n=6), ST15 (n=1) y ST11 (n=1), conteniendo este último el gen productor de carbapenemasas bla<sub>OXA-48</sub>, asociado con el plásmido IncL/M. Los perfiles de genes de resistencia eran muy similares entre los distintos aislados (conteniendo una media de 12.3 genes), debido a que, a parte de los genes que forman parte del genoma común, 12 de las 19 cepas de *K. pneumoniae* contenían el plásmido de multirresistencia IncFIB(K)\_I\_Kpn3, detectado principalmente en hospitales y que contiene entre 8 y 11 genes de resistencias.

Respecto a *E. coli*, se observó una mayor clonalidad ya que el 83,6% de las cepas correspondían al clon ST711, implicado también en brotes nosocomiales alrededor del mundo. El perfil de genes era igual en todas las cepas de este clon (conteniendo 10 genes de resistencia), habiendo siempre implicado el plasmidio IncI1-Alpha, que contenía el gen de productor de beta-lactamasas de amplio espectro bla<sub>CTX-M-14</sub>.

La detección de estos clones y plasmidios nosocomiales indica que las medidas de bioseguridad externa de los hospitales de la zona deberían ser aplicadas con mayor cuidado, para evitar que puedan pasar a la comunidad. A parte, queda demostrado la utilidad de muestrear los erizos para detectar contaminación ambiental de las muestras procedentes de los hospitales y debería valorarse su inclusión en programas de vigilancia.

## **Desarrollo y validación sobre el terreno de ensayos serológicos y moleculares DIVA complementarios para vacunas contra la PPA, basados en la detección de los genes/proteínas codificadas p72, EP153R y eGFP**

Gabriela González-García<sup>1</sup>, Jovita Fernández-Pinero<sup>2</sup>, Carmina Gallardo<sup>2</sup>, Carmen Galán<sup>1</sup>, Mercedes Montón<sup>1</sup>, Sandra Barroso-Arévalo<sup>3</sup>, Nadia Casado<sup>2</sup>, José Ángel Barasona<sup>3</sup>, Žanete Šteingolde<sup>4</sup>, Jūratė Buitkuvienė<sup>5</sup>, Petr Václavek<sup>6</sup>, Annalisa Oggiano<sup>7</sup>, Imbi Nurmoja<sup>8</sup>, José Manuel Sánchez-Vizcaíno<sup>3</sup>, Ana Ranz<sup>1\*</sup>, Marga García-Durán<sup>1</sup>, Ángel Venteo<sup>1</sup>, Patricia Sastre<sup>1</sup>, Paloma Rueda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gold Standard Diagnostics Madrid SA, 28037, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Centro de Investigación en Sanidad Animal, 28130, Valdeolmos, Madrid, Spain

<sup>3</sup> VISAVET Health Surveillance Center, 28040, Madrid, Spain

<sup>4</sup> Institute of Food Safety, Animal Health and Environment "BIOR", LV-1076, Riga, Latvia

<sup>5</sup> National Food and Veterinary Risk Assessment Institute, 08409, Vilnius, Lithuania

<sup>6</sup> Department of Virology, State Veterinary Institute Jihlava, 586 01, Jihlava, Czech Republic

<sup>7</sup> Department of Animal Health, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, 07100, Sassari, Italy

<sup>8</sup> National Centre for Laboratory Research and Risk Assessment, 51006, Tartu, Estonia

\* Ana.Ranz@eu.goldstandarddiagnostics.com

La peste porcina africana (PPA) es una de las enfermedades infecciosas más importantes que afectan a las poblaciones de cerdos domésticos y jabalíes. En la actualidad se han notificado brotes en todo el mundo, lo que subraya la urgente necesidad de una vacuna eficaz y segura para el control de la PPA. En este contexto, en el marco del proyecto VACDIVA se han generado varias vacunas candidatas prometedoras basadas en Lv17/WB/Rie1, un virus de la PPA de genotipo II atenuado de forma natural, en el que se han eliminado varios genes, entre ellos el gen EP153R, y se han sustituido por el gen reportero eGFP. El objetivo del presente estudio ha sido desarrollar ensayos de acompañamiento DIVA (Diferenciación entre animales infectados y vacunados) tanto moleculares como serológicos para estas vacunas candidatas. Además, el gen/antígeno p72 se incluyó en los ensayos como control de la infección y para monitorizar la vacunación.

Para lograr este objetivo, se desarrolló una PCR triplex DIVA para la detección de los genes B646L, EP153R y eGFP. Del mismo modo, a partir de las proteínas codificadas, se desarrolló un ensayo serológico complementario basado en la plataforma ELISA.

Inicialmente, ambos ensayos se evaluaron con muestras experimentales. En particular, la evaluación del ensayo serológico se realizó utilizando 112 muestras de 6 cerdos domésticos (DP) y 87 muestras de 8 jabalíes (WB), inmunizados con el virus parental. Los resultados mostraron que el 100% de los animales seroconvirtieron frente a p72 y pEP153R, aunque con un inicio retardado entre ambas respuestas de anticuerpos, y todos resultaron negativos frente a eGFP. Por otra parte, se analizaron 207 muestras de 16 DP y 96 muestras de 8 WB vacunados con las vacunas candidatas. Todos los animales vacunados resultaron negativos frente a pEP153R, y positivos frente a p72 y eGFP, con un perfil de seroconversión similar.

Posteriormente, se llevó a cabo una validación de campo de ambos ensayos utilizando más de 1.500 muestras de suero y tejido de regiones endémicas europeas, lo que condujo a unos parámetros de diagnóstico de campo muy buenos para ambos ensayos.

Los resultados demuestran que ambos ensayos de diagnóstico DIVA podrían ser herramientas de acompañamiento útiles para la vigilancia durante campañas de vacunación prospectivas en regiones en las que se podrían utilizar vacunas basadas en cepas modificadas del genotipo II del virus de la peste porcina africana en las que se ha eliminado el gen EP153R y/o se ha insertado el gen informador eGFP.

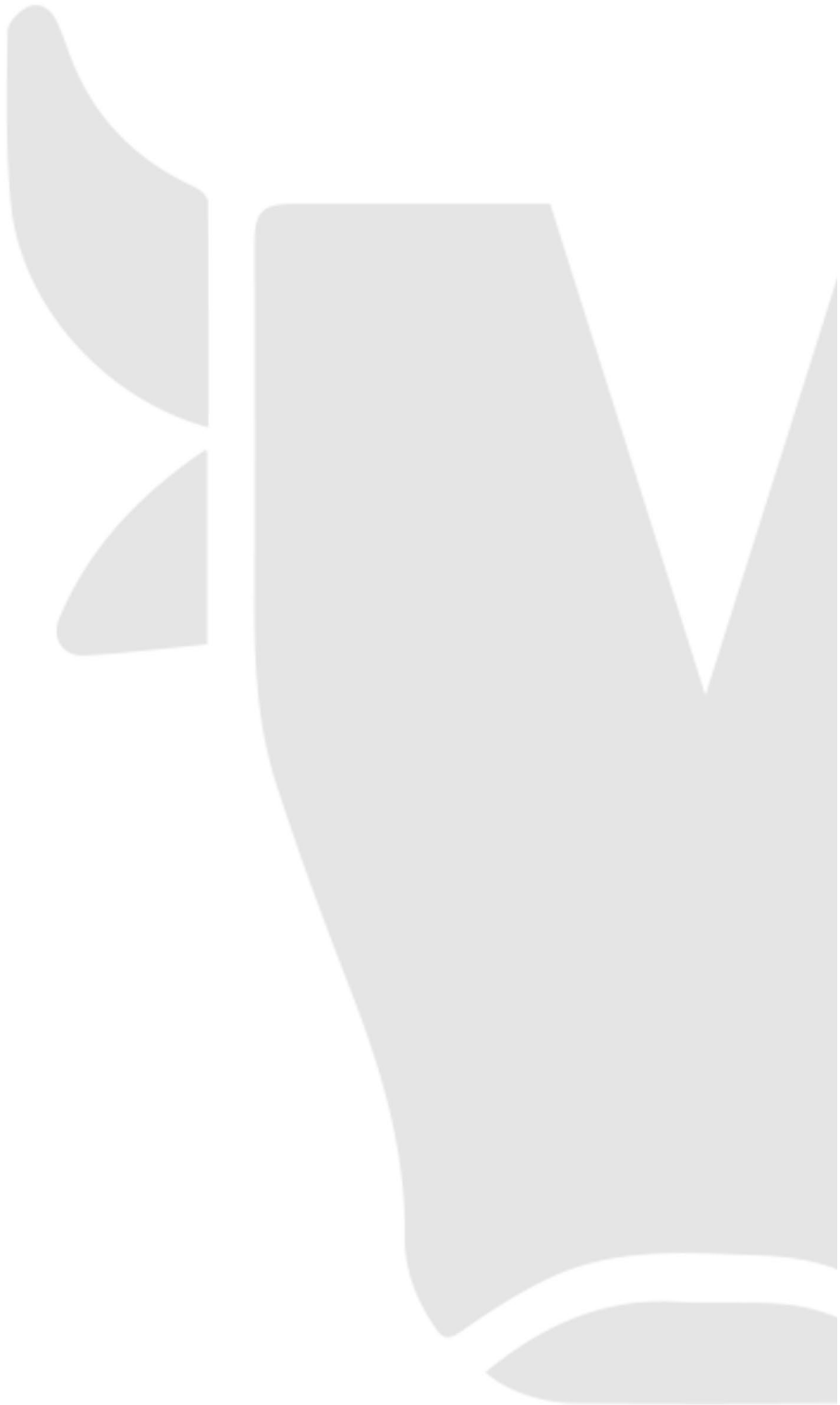
Agradecimientos: Este estudio ha sido financiado por el programa Horizonte 2020 de la UE (VACDIVA, GA n° 862874), y la subvención DIN2019-010833 financiada por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

**Jueves 14/11/2024**

**Ponencia invitada**

**Particularidades del diagnóstico del síndrome reproductivo y respiratorio porcino**

**Cinta Prieto**  
UCM. Facultad de Veterinaria



## Sesión 4 comunicaciones orales

### Norovirus porcino: identificación y caracterización molecular en muestras de la cabaña porcina en España

Sofía Lázaro<sup>1\*</sup>, Celia Martínez<sup>1</sup>, José Luis Amal<sup>1</sup>, Alfredo Benito<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Molecular y Celular, EXOPOL, 50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza

\* slazaro@exopol.com

Las infecciones por norovirus son la primera causa no bacteriana de gastroenteritis aguda en humanos. Este virus puede infectar a otras especies animales como bovinos, ovinos, perros y gatos, y también a la especie porcina. El norovirus porcino ha sido descrito en cerdos sanos y enfermos de distintas categorías productivas. Estudios experimentales con aislados virales han demostrado que puede ocasionar síntomas de diarrea y excreción viral. Su genoma ARN se caracteriza por una alta variabilidad, producto de mutaciones puntuales y procesos de recombinación intragenómica. Hasta la fecha, se han identificado un total de 10 genogrupos y 49 genotipos en base al gen RdRp y al gen VP1. Diferentes genotipos se asocian a distintas especies animales. Los genotipos GII.11, GII.18 y GII.19, con estrecha relación genética a los genotipos que infectan a humanos, son específicos del cerdo. Por el momento, no existen trabajos que hayan confirmado la presencia de este virus en la cabaña porcina española, a pesar de que se ha detectado en diferentes países europeos. Además, el hallazgo en 2007 de una cepa humana GII.4 en cerdos de Canadá y después en Japón, generó una preocupación sobre el rol de esta especie como posible reservorio de virus zoonóticos. Este trabajo tuvo como objetivo analizar muestras digestivas de la especie porcina en nuestro país y llevar a cabo la caracterización molecular de aquellas positivas para determinar su genotipo.

Entre 2020 y 2022, se evaluaron un total de 480 casos clínicos procedentes de 38 provincias que llegaron a nuestro laboratorio. Las muestras, provenientes de cerdo blanco (81%) e ibérico (15%), incluyeron hisopados de órganos (55%), heces (30%), e intestino (15%). Se empleó la técnica de PCR a tiempo real para la detección y la secuenciación Sanger para la caracterización, utilizando cebadores y sondas descritos en trabajos previos y también diseñados en este estudio. La clasificación de genogrupo y genotipo se realizó con la herramienta Norovirus Typing Tool V2 y se construyó un árbol filogenético para comparar las secuencias obtenidas con otras ya descritas en la literatura.

De las 480 muestras analizadas, 52 resultaron positivas (11%), una tasa similar a la obtenida en otros países europeos. El porcentaje de positivos en las muestras de cerdo ibérico (31%) fue significativamente mayor que el de cerdo blanco (7%), posiblemente debido a la mayor interacción con animales silvestres en los cerdos ibéricos, como ocurre con otros patógenos. Considerando la región, se encontraron muestras positivas en 14 de las 38 provincias analizadas, siendo Extremadura, región con alta producción de ibérico, la comunidad con mayor número de casos positivos (42%). Se lograron secuenciar seis muestras, de las cuales dos fueron identificadas como genotipo GII.18 y cuatro como GII.11, ambos frecuentemente descritos en cerdos. Este es el primer estudio que confirma la presencia de norovirus porcino en nuestro país. No obstante, todavía se requiere estudiar en más profundidad la patogénesis de esta enfermedad y valorar, desde una perspectiva *One Health*, los riesgos asociados a la especie porcina como potencial reservorio de este virus.

## Utilización de la técnica MLST para el estudio de la variabilidad genética de aislados de *Streptococcus suis* en España

Mario Delgado García<sup>1\*</sup>, Oscar Mencía-Ares<sup>1</sup>, Ana Isabel Pastor Calonge<sup>1</sup>, Alba González-Fernández<sup>1</sup>, César B. Gutiérrez Martín<sup>1</sup>, Sonia Martínez-Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, Universidad de León, 24004, León

\* mdelgg05@estudiantes.unileon.es

*Streptococcus suis* es una bacteria patógena de gran importancia en la producción porcina debido a las pérdidas económicas que provoca, no solo por la elevada mortalidad de los cerdos que desarrollan la infección, sino también por los intentos de controlar la enfermedad. A pesar de que forma parte de la microbiota comensal en el tracto respiratorio superior de cerdos sanos, este microorganismo puede volverse patógeno bajo determinadas condiciones adversas. La enfermedad afecta fundamentalmente a cerdos en periodo de postdestete, ocasionando un cuadro clínico caracterizado por meningitis, artritis, bronconeumonía, endocarditis y, en los casos más graves, septicemia y muerte súbita del animal (Estrada *et al.*, 2019).

En este trabajo se buscó estudiar la variabilidad genética de *S. suis* mediante su clasificación con la técnica MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*), comparando los resultados obtenidos con su clasificación basada en serotipos. Para ello, se seleccionaron 50 aislados de *S. suis* en función de los serotipos más prevalentes y se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de siete genes constitutivos. Posteriormente, se purificaron los productos de amplificación y se secuenciaron cada uno de los genes de los aislados seleccionados. Las secuencias obtenidas fueron introducidas en la base de datos PubMLST, a partir de la cual se determinó la variante alélica de cada gen, y una vez obtenidas las siete variantes de cada uno de los aislados, se les asignó un tipo de secuencia (ST, *Sequence Type*) específico. Tras obtener los diferentes ST, los aislados seleccionados se agruparon en complejos clonales (CC) en función de las diferencias entre las variantes alélicas de los siete genes secuenciados. Como criterio de agrupación se empleó la presencia de variantes de un solo locus (SLV, *single locus variants*) y variantes de doble locus (DLV, *doble locus variants*) entre los diferentes perfiles MLST de cada aislado. Por último, se estudió la presencia significativa de cinco factores de virulencia en función tanto del serotipo como de los ST y CC encontrados.

Los resultados obtenidos mostraron que el 14% (n = 7) de los aislados presentaron una combinación de variantes alélicas para los siete genes constitutivos que no se encontraba previamente registrada en la base de datos PubMLST, por lo que se le asignó un ST específico. A partir de los 50 aislados seleccionados se determinaron 13 ST diferentes, de los cuales los más frecuentes fueron ST1, ST29 y ST123 junto a sus respectivos CC. Además, a partir de los perfiles MLST de cada aislado se pudo determinar que los genes constitutivos con mayor variabilidad en cuanto al número de variantes alélicas obtenidas fueron *aroA*, *gki*, *mutS* y *cpn60*. También se pudo apreciar que el factor de virulencia que aparece con mayor frecuencia en los aislados seleccionados, independientemente del serotipo, ST o CC, fue *luxS*.

A partir de este estudio se puede concluir que la técnica MLST es un procedimiento importante para el análisis de la variabilidad genética de *S. suis* y su clasificación en ST es una forma alternativa y complementaria a la clasificación basada en serotipos, ayudando a comprender la epidemiología global de este patógeno.

## Caracterización de la virulencia y la resistencia a los antimicrobianos en aislados de *Staphylococcus hyicus* recuperados de granjas porcinas españolas

Ana Isabel Pastor-Calonge<sup>1\*</sup>, Sonia Martínez-Martínez<sup>1</sup>, Eva Ramos-Calvo<sup>1</sup>, Alba González-Fernández<sup>1</sup>, Álvaro Aguarón<sup>2</sup>, César B. Gutiérrez-Martín<sup>1</sup>, Óscar Mencía-Ares<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24007, León, España

<sup>2</sup> Laboratorios SYVA, 24009, León, España

\* apastc00@estudiantes.unileon.es

*Staphylococcus hyicus* es un patógeno relevante en la producción porcina española, causando principalmente epidermitis exudativa en lechones, pero también mastitis, metritis e, incluso, infecciones sistémicas. Abordar las infecciones por *S. hyicus* requiere tanto de la caracterización de su virulencia como de su perfil de resistencia a los antimicrobianos (RAM). Hasta la fecha, han sido descritas seis toxinas exfoliativas (ExhA, ExhB, ExhC, ExhD, SHETA y SHETB), que constituyen sus principales factores de virulencia (FV). No obstante, la formación de *biofilms* también puede tener un papel relevante en su patogenicidad. Además, la caracterización de su perfil de RAM es fundamental para realizar un correcto tratamiento.

Este estudio tiene como objetivos caracterizar la virulencia, la RAM y la formación de *biofilms* en aislados de *S. hyicus* procedentes de granjas porcinas españolas. Para ello, se analizaron un total de 49 aislados de *S. hyicus* procedentes de animales con signos clínicos cutáneos, reproductivos y sistémicos. Para la caracterización molecular de los factores de virulencia se realizó una PCR simple para los genes *SHETA* y *SHETB* y una múltiple para *ExhA*, *ExhB*, *ExhC* y *ExhD*. Para la determinación de la RAM se establecieron las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) con el método de microdilución en caldo usando las placas BOPO6F Sensititre®. La determinación de la formación de *biofilms* se cuantificó mediante densidad óptica (DO) basándonos en un protocolo previamente definido para *S. aureus*.

Los resultados obtenidos revelan que casi la mitad de los aislados de *S. hyicus* (49,0 %) fueron positivos para al menos uno de los FV, siendo el gen *SHETA* el más común (28,6%). El hecho de que estos aislados fueran extraídos de animales con signos clínicos pero que solo cerca de la mitad de los aislados tuvieran como mínimo un FV, sugiere la posibilidad de la existencia de otros mecanismos de virulencia. Se observó una alta frecuencia de aislados multirresistentes (resistentes a tres o más clases de antimicrobianos) (83,7%), con una resistencia especialmente elevada a antimicrobianos de uso común en producción porcina, como lincosamidas (83,7%), pleuromutilinas (81,6%), penicilinas (75,5%) y tetraciclinas (73,5%). Todos los aislados mostraron una gran capacidad de formación de *biofilms* (DO = 15.6 ± 7.0), lo cual se asocia a un mayor potencial de supervivencia y persistencia en diferentes nichos biológicos. Se encontraron asociaciones significativas entre los FV, la formación de *biofilms* y los patrones de RAM, destacando la relación entre la resistencia a las lincosamidas y las pleuromutilinas ( $p < 0.001$ ;  $\Phi = 0.57$ ) y los macrólidos ( $p < 0.001$ ;  $\Phi = 0.48$ ), así como la asociación de los perfiles de RAM con los genes *ExhC* y *ExhD*. Estas asociaciones indican posibles mecanismos de adaptación y selección de *S. hyicus*.

Estos hallazgos subrayan la necesidad de un diagnóstico específico de *S. hyicus* para mejorar las estrategias de manejo y tratamiento, con el fin de mitigar su impacto en la producción porcina.

## RealPCR PRRSV-1/PRRSV-2 Multiplex RNA Test - la última incorporación a la plataforma modular RealPCR de IDEXX

Vanessa Harjunen\*, Silke Fischer, Alvaro Hidalgo, Juan Ignacio Salido

IDEXX Europe, Hoofddorp, The Netherlands

\* [vanessa-harjunen@idexx.com](mailto:vanessa-harjunen@idexx.com)

El diagnóstico rápido y la notificación de resultados son fundamentales para minimizar la propagación de enfermedades como el virus de la peste porcina africana, el virus de la peste porcina clásica y el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV).

IDEXX facilita este proceso con su plataforma modular RealPCR. Esta plataforma permite la detección simultánea en tiempo real de dianas de ADN y ARN, combinando reactivos compartidos y un protocolo de termociclador. Una característica exclusiva de nuestros productos RealPCR es el control interno de la muestra (ISC), que se basa en el ADN o ARN del hospedador, dependiendo de la diana. El ISC controla todo el proceso, desde el muestreo hasta el almacenamiento, la extracción, así como la configuración y ejecución de la PCR. Además, los productos están diseñados no solo para reducir el espacio de almacenamiento, sino también para ayudar a proteger el medio ambiente, reduciendo los residuos y eliminando la necesidad de envíos con hielo seco. Todos los productos RealPCR de IDEXX están validados en varios termocicladores de uso común y kits de extracción disponibles en el mercado. Nuestro equipo técnico y especialista en PCR están siempre disponibles para ayudar con cualquier consulta, incluida la demostración.

La última innovación de la plataforma RealPCR es el RealPCR PRRSV-1/PRRSV-2 Multiplex RNA Test. Este test detecta e identifica cepas contemporáneas de PRRSV-1 y PRRSV-2 que circulan en Europa. Se ha demostrado su precisión y alta inclusividad tanto en pruebas *in silico* como *in vitro*, realizadas en más de 1300 muestras recogidas en toda Europa. Por lo tanto, el RealPCR PRRSV-1/PRRSV-2 Multiplex RNA Test garantiza no solo la detección de las cepas circulantes más recientes, incluidas cepas emergentes como Rosalia y Horsens, sino también la confianza en los resultados negativos gracias al ISC basado en el RNA del hospedador.

Para obtener más información, visita [www.idexx.com/swine](http://www.idexx.com/swine).



## Detección y aislamiento de *Rotavirus A* en brotes de diarrea de explotaciones porcinas españolas

Héctor Puente<sup>1\*</sup>, Julián Andrés Tezza<sup>2</sup>, Miriam Velasco<sup>1</sup>, Carlos Artigas<sup>1</sup>, Ana Carvajal<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Unidad de diagnóstico y autovacunas veterinarias, Aquilón CyL S.L., 24006, León, España

<sup>2</sup> Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24007, León, España

\* hpuente@aquiloncyl.com

Los rotavirus son uno de los principales agentes etiológicos de enfermedades entéricas en humanos y animales en todo el mundo. *Rotavirus A* (RVA), *Rotavirus B* (RVB), *Rotavirus C* (RVC) y *Rotavirus H* (RVH) han sido asociados a brotes de diarrea en cerdos. Su elevada resistencia ambiental favorece una presentación endémica en las explotaciones porcinas y dificulta su eliminación, teniendo que centrar los esfuerzos en medidas de control que reduzcan la presión de infección y potencien la respuesta inmune.

El objetivo principal de este trabajo fue investigar la relevancia de RVA como agente etiológico de brotes de diarrea en cerdos de diferentes edades, además de desarrollar y evaluar un protocolo de aislamiento en cultivo celular de RVA en muestras porcinas de heces.

El estudio se realizó en 15 explotaciones porcinas españolas con brotes de diarrea en lactación (5), transición (2) y cebo (8). Mediante un kit comercial se extrajo el ARN total de una muestra conjunta por granja y para su detección se utilizó RT-qPCR con los cebadores y sondas descritos por Masuda et al. (2016), dirigidos al gen VP6 de RVA. En todas las muestras positivas se intentó el aislamiento de RVA en células MA-104, monitorizándose la adaptación *in vitro* durante los cinco primeros pases por observación directa del efecto citopático y por RT-qPCR.

Se detectó RVA en el 33 % de los brotes investigados siendo esta prevalencia mayor en las etapas de lactancia y postdestete (60 y 50 %, respectivamente) en comparación con el periodo de engorde (12,5 %). La tasa de éxito del método de aislamiento alcanzó el 60 %, estando estrechamente asociada a la carga viral en la muestra fecal.

Las infecciones por RVA son prevalentes en las granjas porcinas con brotes de diarrea en España, particularmente en la etapa de lactación y post-destete, siendo la RT-qPCR una herramienta muy útil para su detección proporcionando una medida cuantitativa de la carga viral presente en heces y, en consecuencia, del grado de replicación intestinal.

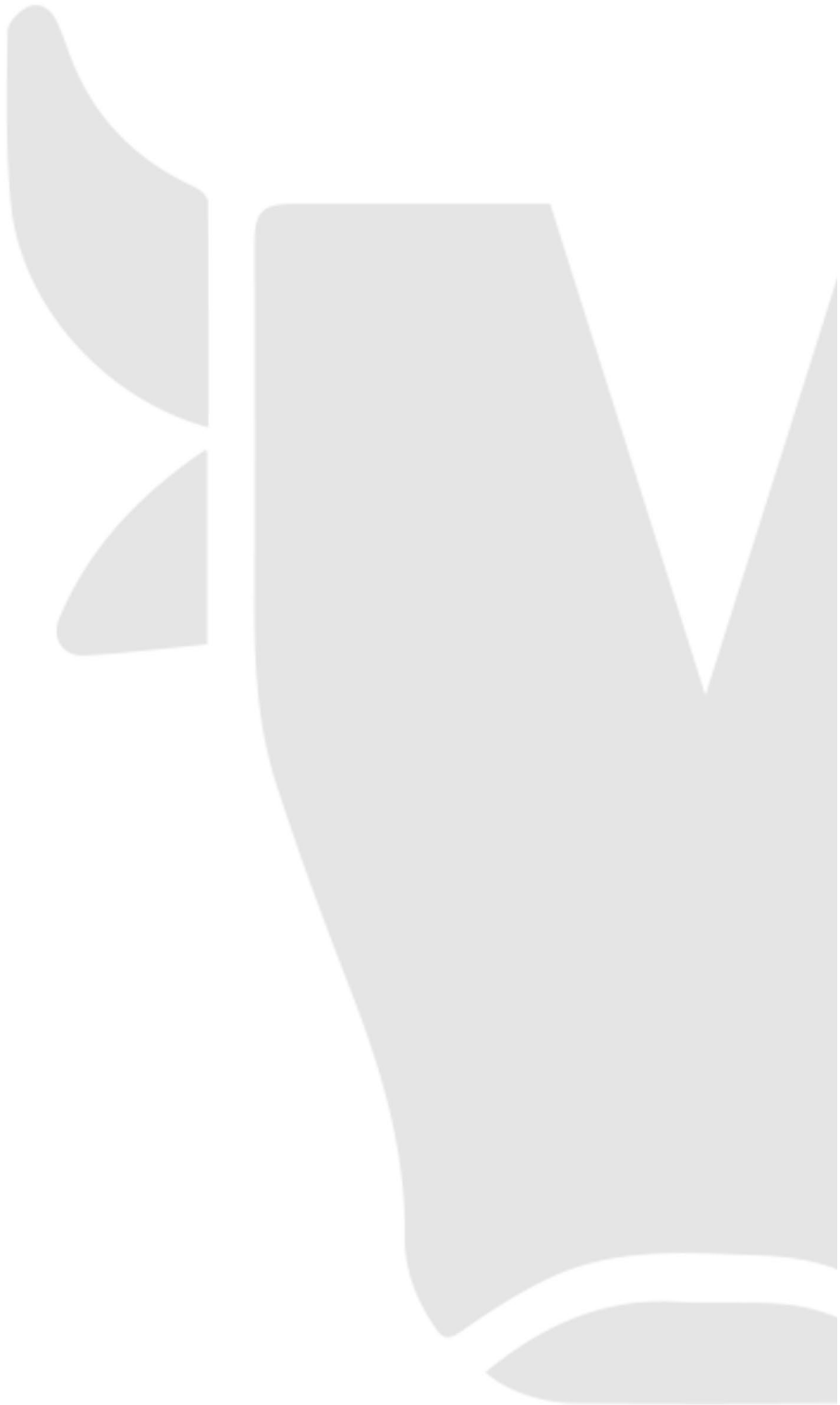
La inoculación de monocapas de la línea celular MA-104 en presencia de tripsina permite el aislamiento de los RVA presentes en muestras de heces, en particular cuando la carga viral es elevada. Este resultado podría ser de interés para el desarrollo de estrategias de control, como las autovacunas, así como para la realización de estudios que permitan caracterizar estos RVA o su patogenicidad en el hospedador porcino.

**Ponencia Invitada**

**Influenza Aviar y diagnóstico diferencial con otros procesos respiratorios**

**Mar Biarnés**

CESAC. Centro de Sanidad Avícola de Cataluña y Aragón



## Sesión 5 comunicaciones orales

### Diseño y validación de un ensayo duplex DIVA qPCR para diferenciar la vacuna Primun Salmonella T de cepas silvestres de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium

Gema Bru<sup>1\*</sup>, Antonio Martínez-Murcia<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Genetic PCR Solutions™, 03300, Orihuela, Alicante

<sup>2</sup> Departamento de Microbiología, Universidad Miguel Hernández, 03312, Orihuela, Alicante

\*laboratory@geneticpcr.com

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium es una bacteria Gram-negativa, predominantemente localizado en intestino, que constituye un importante agente etiológico de gastroenteritis en humanos y otros mamíferos. La infección en humanos es frecuentemente atribuida a la ingesta de alimentos contaminados, siendo los productos avícolas la principal fuente de transmisión. Las vacunas vivas atenuadas han demostrado ser herramientas eficaces para mitigar la prevalencia de la infección en poblaciones aviares. No obstante, la capacidad de diferenciar entre la cepa vacunal y las cepas silvestres es esencial para una vigilancia epidemiológica rigurosa y un control efectivo de la enfermedad, asegurando la efectividad de los programas de vacunación y la correcta identificación de las infecciones.

En este estudio, se presenta la validación del kit SalTym&PriSal-T qPCR Duplex, un ensayo DIVA qPCR desarrollado específicamente para discriminar entre cepas silvestres y la cepa vacunal ST CAL16 Str+/Rif+/Enr-, empleada en la vacuna viva Primun Salmonella T de Laboratorios Calier S.A. Se evaluaron tanto la especificidad y sensibilidad analíticas como la especificidad y sensibilidad diagnósticas, utilizando muestras obtenidas en el marco del Programa Nacional de Control de *Salmonella* en España. El DNA empleado se extrajo de colonias aisladas previamente identificadas como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. Los resultados obtenidos fueron óptimos en ambos tipos de análisis, evidenciando además una reducción significativa en el tiempo requerido para el diagnóstico en comparación con los métodos de referencia basados en antibiogramas.

Es relevante destacar que este ensayo qPCR es el primer test disponible diseñado específicamente para este propósito, habiendo sido registrado como producto zosanitario para diagnóstico veterinario en el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (12186-RD).

## El rol de las aves urbanas como portadoras de bacterias y genes de resistencia antimicrobiana relevantes para la salud pública

Mercedes Fernández\*, Ana Rebeca Zamora, Chiara Seminati, Rafael A. Molina-López, Laila Darwich

Universidad Autónoma de Barcelona

\*MariaMercedes.Fernandez2@autonoma.cat

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un problema creciente que afecta a la salud pública, salud animal y la medioambiental. Las aves urbanas representan una fuente interesante de estudio ya que pueden actuar de reservorio de bacterias resistentes y transmitir las RAM a distintas especies animales (de consumo o de compañía) y también a las personas, debido a la estrecha convivencia de hábitats. Esto puede tener evidentemente implicaciones económicas para la agricultura, el bienestar animal, la seguridad alimentaria y, por último, para la salud pública.

El objetivo de este estudio es determinar la prevalencia de resistencias antimicrobianas en las aves urbanas de Cataluña. Un total de 128 muestras cloacales de diversas especies de aves urbanas fueron recolectadas en el centro de recuperación de fauna silvestres de Torreferrusa durante el año 2023. Entre las más frecuentes se incluyeron: *Passer domesticus* (n=25), *Apus apus* (n=16), *Columba palumbus* (n=12), *Streptopelia decaocto* (n=11), *Turdus philomelo* (n=10) y *Turdus merula* (n=9), entre otras especies (n=45). Se realizó el cultivo de las muestras en los medios de Agar Sangre y McConkey con ceftriaxona (1ug/mL) y se identificaron las bacterias aisladas a través de pruebas bioquímicas convencionales. El fenotipado se realizó mediante el método Kirby-Bauer (método de difusión en agar Müller-Hilton) y el genotipado de los genes de resistencia antimicrobiana se realizó mediante PCR para la detección de las BLEE ( $\beta$ -lactamasas de espectro extendido). Se obtuvo crecimiento microbiológico del 50.8% de las muestras, siendo los géneros bacterianos más prevalentes *E. coli* (46%) y *P. aeruginosa* (23%). Los resultados de sensibilidad antimicrobiana mostraron que *Pseudomonas spp.*, fue uno de los patógenos con mayores niveles de RAM presentando un 93% de cepas resistentes a los macrólidos, el 88% resistentes a la amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), el 86% a las lincosamidas y un 80% de cepas resistentes a los fenicoles. Las cepas de *E. coli* mostraron una alta prevalencia de RAM a las lincosamidas (80%), macrólidos (76%) y a la amoxicilina con ácido clavulánico (56%). Los resultados del estudio del genotipado, indicaron que un 8.5% (n=11 muestras) resultaron positivas para el gen de resistencia *bla*CMY2, siendo las especies portadoras el *Passer domesticus* (n=3), *Turdus philomelos* (n=2), *Turdus merula* (n=2), *Columba livia* (n=1), *Columba palumbus* (n=1), *Delichon urbicum* (n=1) y *Passer montanus* (n=1). El 7% (n=9) resultaron positivas para el gen *bla*SHV, principalmente en las especies *Turdus philomelos* (n=5) y *Turdus philombos* (n=3) y un animal de la especie *Gaius garrulus*. En cuanto al gen *bla*CTX, el 3% (4 muestras) dieron positivo en las especies *Turdus philombos*, *Passer domesticus* y *Columba palumbus*. Finalmente, 1 muestra dio positivo para el gen *bla*OXA (confiere resistencia a los carbapenemos) en la especie *Gaius garrulus*.

En base a estos resultados, podemos concluir que este estudio destaca la importancia del papel que desempeñan las aves urbanas en el mantenimiento y propagación de bacterias y genes de resistencia a antimicrobianos de uso crítico para la salud animal y humana.

## Presencia de *Salmonella* en heces de buitre leonado en el Parque Natural de Valderejo (Álava)

Ane López-Morales<sup>1\*</sup>, Vega Álvarez<sup>1</sup>, Xeider Gerrikagoitia<sup>1</sup>, Nekane Kortabarria<sup>1</sup>, Beatriz Oporto<sup>1</sup>, Francisco Zufiaur<sup>2</sup>, Jose Luis Lavín<sup>3</sup>, Marta Barra<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sanidad Animal. NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA). 48160, Derio, Bizkaia

<sup>2</sup> Araia, Álava

<sup>3</sup> Matemática Aplicada. NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA). 48160, Derio, Bizkaia

\* ane.lopez@neiker.eus

El buitre leonado (*Gyps fulvus*) es un ave carroñera obligada que se alimenta de cadáveres de animales tanto salvajes como domésticos. España acoge al 90% de la población de buitre leonado presente en Europa. Las 103 parejas de buitre leonado censadas en Valderejo suponen casi el 20% de la población de Álava, conformando la colonia más grande presente en el País Vasco.

Diferentes medidas de conservación como el uso de alimentación suplementaria en muladares permitieron una mejora de la población en España a partir del año 2003. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que los buitres ingieren patógenos zoonóticos mientras se alimentan en estos muladares. Asimismo, estas aves suelen también frecuentar otros lugares de alimentación, como vertederos, que están igualmente asociados a la presencia de patógenos con relevancia para la salud pública. Por otro lado, tanto la capacidad de los buitres para regular patógenos en el medio, como para diseminarlos está todavía siendo estudiada. En este trabajo se pretende determinar la presencia de algunos patógenos de interés en una población local de buitre leonado.

Un total de 196 muestras de heces frescas de buitres fueron recogidas en la colonia del Parque Natural de Valderejo (Álava) durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2023. La recogida de muestras se llevó a cabo principalmente tras la alimentación y partida de los animales en un muladar de la zona y en un posadero. Las muestras fueron recogidas de forma individual en botes estériles provistos de cucharilla, se resuspendieron en DNA/RNA Shield y se conservaron a -80°C.

El material genético (DNA y RNA) de las muestras se extrajo utilizando el kit Biosprint DNA Blood de Qiagen y el robot Biosprint 96 de QIAGEN. Se realizaron PCRs y RT-PCRs a tiempo real para la detección de los virus de la Influenza aviar, virus del Nilo Occidental, virus de la enfermedad de Newcastle y *Salmonella*.

Se detectó la presencia de *Salmonella* en el 32,1% (63/196) de las muestras estudiadas. A continuación, en las muestras positivas, se realizó una PCR multiplex a tiempo real que permite identificar *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) y serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), incluyendo la identificación específica de la variante monofásica 4,[5],12:i- de *S. Typhimurium*. Se confirmó la presencia de *S. Typhimurium* monofásica 4,[5],12:i- en 12 muestras, lo que supone el 6,1% del total de muestras analizadas. Todas las muestras fueron negativas a *S. Enteritidis* y no se detectó la presencia de ninguno de los virus estudiados.

La variante monofásica de *S. Typhimurium* se ha convertido, junto a *S. Enteritidis*, en una de las causas más importantes de salmonelosis humana en la Unión Europea. Sería necesaria la identificación de las especies de *Salmonella* presentes en las 51 muestras en las que no se pudieron determinar, y estudiar el interés sanitario que podrían tener los serovares detectados tanto para la población de buitres estudiada, como para otras especies domésticas y silvestres o para el ser humano.

Financiación: Ministerio de Ciencia e Innovación (MCIN/AEI/10.13039/501100011033) proyecto PID2020-114060RR-C31; Departamento de Alimentación, Desarrollo Rural, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco (proyecto VEPIFAUS-2200002) y Departamento de Medio Ambiente de la Diputación Foral de Álava.

## Evaluación de muestras y protocolos alternativos para el seguimiento serológico de la vacunación contra la influenza aviar en manadas de patos

Mathilda Walch<sup>1,2</sup>, Clément Castille<sup>1</sup>, Bruno Casalinho<sup>1</sup>, Marina Gaimard<sup>2</sup>, Chloé Redal<sup>2</sup>, Alejandra Castillo<sup>2\*</sup>, Guillaume Croville<sup>1</sup>, Stéphanie Lesceu<sup>2</sup> & Jean-Luc Guerin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31300 Toulouse, France

<sup>2</sup>Innovative Diagnostics, 34790 Grabels, France

\*[alejandra.castillo@innovative-diagnostics.com](mailto:alejandra.castillo@innovative-diagnostics.com)

Los virus de la gripe aviar pertenecen a la familia Orthomyxoviridae, con linajes específicos de alta patogenicidad H5 asociados a epizootias a gran escala, pérdidas económicas sustanciales y amenazas zoonóticas. Además de la bioseguridad y el sacrificio de las manadas de aves infectadas, la vacunación es una opción complementaria y se aplica a los patos en Francia desde octubre de 2023. Este programa de vacunación debe ir asociado a un plan de vigilancia intensiva que incluya pruebas moleculares y serológicas. La toma regular de muestras de sangre debe ser realizada por personal formado, lo que resulta costoso y requiere mucho tiempo para los programas de vigilancia a gran escala. Los métodos de muestreo menos invasivos, asociados a soluciones alternativas para el almacenamiento y procesamiento de las muestras, podrían aumentar la rentabilidad de la vigilancia serológica. En esta perspectiva, evaluamos matrices de muestreo alternativas, asociadas al depósito de muestras en tarjetas de papel, para el seguimiento serológico de patos.

El seguimiento serológico individual se realizó en manadas de patos vacunados con vacunas registradas H5. Los anticuerpos H5 se valoraron mediante un ELISA indirecto (IDvet) comercial para patos H5 validado en patos de Moscovia, de Pekín y patos mulos. Para cada ave, se recogieron muestras de sangre y de plumas en diferentes momentos tras la vacunación contra el H5: las muestras de sangre se tomaron utilizando (1) un muestreo de sangre regular (seno occipital) o, alternativamente, un sangrado no invasivo y la deposición directa de una gota de sangre en tarjetas de transporte. El muestreo de plumas inmaduras se realizó utilizando tres métodos diferentes: (1) sangre residual de plumas inmaduras depositada directamente en tarjetas de transporte, (2) líquido intersticial de la pulpa de las plumas, recogido en tarjetas de transporte, y (3) pulpa de las plumas resuspendida directamente en tampón ELISA. Para cada ave, tipo de muestra y momento, se determinó el título ELISA y se comparó a nivel individual y de manada.

Para este estudio se tomaron muestras de un total de 200 patos mulas. El muestreo no invasivo de sangre y plumas resultó fácil de realizar tras una formación mínima. La deposición en la tarjeta de transporte se realizó directamente o mediante una cánula, para calibrar la muestra. Las pruebas ELISA de las diferentes muestras se realizaron con los mismos kits y el mismo personal de laboratorio. Los ensayos ELISA mostraron que las diferentes muestras y protocolos de sangre y plumas daban lugar a títulos ELISA similares a nivel de manada, con coeficientes de correlación que oscilaban entre 0,80 y 0,85. El sangrado no invasivo se revela particularmente interesante en los patitos muy jóvenes, para los que el sangrado regular es peligroso. Se pudieron tomar muestras de pulpa de pluma inmadura de 4 a 10 semanas de edad. Resultados preliminares que sugieren el potencial de los métodos basados en las plumas como alternativas fiables y menos invasivas para el seguimiento serológico de los niveles de anticuerpos de la IAAP en las manadas de patos. La integración de tarjetas de transporte optimiza la recogida, el transporte y el almacenamiento de las muestras, mejorando así la viabilidad del seguimiento serológico.

**Premio AVEDILA 2024**

**A la mejor publicación científica sobre diagnóstico laboratorial veterinario**

**“An investigation of the transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* within vertically integrated systems using whole genome sequencing”**

**Anna Vilaró Vives  
Grupo de Saneamiento Porcino (GSP)**



# PRESENTACIONES

## TIPO PÓSTER





## **P01. Una nueva RT-qPCR triplex para detectar y diferenciar la lengua azul y la enfermedad hemorrágica epizootica en un solo pocillo**

Alejandra Castillo<sup>1\*</sup>, Ignacio García Pastor<sup>1</sup>, Léa Despois<sup>1</sup>, Emilie Bianchini<sup>1</sup>, Adrien Limozin<sup>1</sup>, Loïc Comtet<sup>1</sup>, Philippe Pourquier<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Innovative Diagnostics - IDvet, Grabels, France

\* [alejandra.castillo@innovative-diagnostics.com](mailto:alejandra.castillo@innovative-diagnostics.com)

El virus de la lengua azul (VLA) y el virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (EHDV) son orbivirus responsables, respectivamente, de la lengua azul (LA) y la enfermedad hemorrágica epizootica (EHD), que se notificaron en 2023 en toda Europa: VLA-3 (NL, BE, UK), nueva variante de VLA-8 (FR, IT) y EHDV (ES, FR).

Tienen un enorme impacto económico y muestran síntomas clínicos similares, por lo que las pruebas de laboratorio son esenciales para el diagnóstico. Innovative Diagnostics ofrece un nuevo kit, el ID Gene™ BTV & EHDV Triplex. Permite, en un único pocillo, la detección y diferenciación tanto del VLA como del VHE junto con un control endógeno de la muestra. Los resultados pueden obtenerse en 50 minutos con un programa de amplificación rápida, compatible con todos los kits IDGene™, lo que permite realizar pruebas en la misma serie para diferentes RT-qPCR de Orbivirus, ofreciendo así la máxima flexibilidad y capacidad de prueba mediante la optimización de los recursos de los equipos de laboratorio.

**Materiales y métodos.** Las purificaciones del ARN sanguíneo se realizaron con las microesferas magnéticas ID Gene™ Mag Fast (21 min). Las especificidades diagnósticas para el VLA y el VEHE se evaluaron con 327 muestras negativas, respectivamente. Las sensibilidades se probaron con 70 muestras positivas para el VLA y 143 muestras positivas para el VEHE. La inclusividad se evaluó en 3 paneles de referencia: 13 ARN del VEHE y 36 ARN del VLA (Laboratorio nacional francés de referencia para el VLA y el VEHE, Anses), 7 ARN del VEHE (Instituto Pirbright, Reino Unido) y 10 ARN del VLA (FLI, Alemania).

**Resultados.** Las especificidades medidas de ID Gene™ BTV & EHDV Triplex con respecto tanto al VLA como al VEHE fueron del 100%, IC95% [99,1-100], n=327. La sensibilidad diagnóstica medida con respecto a las dianas del VLA y el VHE fue respectivamente del 100%, IC95% [99,1-100], n=70 y del 98,9%, IC95% [98,2-100], n=143. BTV+/EHDV+ se constituyeron mezclando vol/vol muestras positivas de cada virus. Incluso para valores bajos de Cq, no se observó competencia en la qPCR, lo que indica la capacidad de detectar animales posiblemente coinfectados. Todas las cepas de VLA y VHE analizadas, incluidas las cepas de VLA y VHE detectadas en Europa en 2023, fueron detectadas eficazmente por el nuevo kit ID Gene™, lo que indica una perfecta inclusividad.

**Conclusión.** El nuevo ID Gene™ BTV & EHDV Triplex permite detectar y diferenciar eficazmente la lengua azul y la enfermedad hemorrágica epizootica en una sola reacción. En regiones donde ambos virus pueden co-circular, esta RT-qPCR es, en complemento a las qPCRs IDGene™ existentes, la herramienta ideal para pruebas de diagnóstico diferencial, para vigilancia de enfermedades y pruebas antes del movimiento de animales.

## **P02. Proceso integral de secuenciación masiva desde la extracción de muestras hasta el análisis primario de los datos**

Alejandro Navarro Gómez<sup>1\*</sup>, Raquel García Marivela<sup>2</sup>, Isabel López-Rull<sup>3</sup>, Juan A. Díaz de Tuesta García<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense Madrid, Avda. puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid.

<sup>2</sup> Tragsatec, Unidad Biología Molecular Genómica, Laboratorio Regional Sanidad Animal, 28770, Colmenar Viejo, Madrid

<sup>3</sup> Área de Biodiversidad y Conservación, Universidad Rey Juan Carlos, C/Tulipán s/n, 28933, Móstoles, Madrid

<sup>4</sup> Laboratorio Regional Sanidad Animal, 28770, Colmenar Viejo, Madrid

\* angomez@ucm.es

Las técnicas de secuenciación ofrecen una amplia gama de aplicaciones y, en los últimos años, han supuesto una revolución tanto en la biología aplicada como en la básica. Aunque son técnicas rápidas, precisas y relativamente sencillas, hay que tener en cuenta varios puntos básicos durante todo su desarrollo para asegurar resultados fiables. En la actualidad la utilización de estas técnicas en muchos laboratorios se está incrementando, pero uno de los problemas encontrados para su realización es la falta de armonización.

El objetivo del estudio en el que empleamos estas técnicas era determinar los microorganismos presentes en distintas muestras de aves. Para ello partimos de 284 muestras de hisopos cloacales, 262 muestras de heces y 101 extractos de plumas para realizar la determinación mediante NGS del 16 S, en el caso de los extractos de las plumas realizar también un análisis metagenómico. La extracción se llevó a cabo mediante un procesador automático (kingFisher, Applied Biosystems/Thermo scientific) con los kits MagMax Core y MagMax Core con el módulo de lisis de Life Technologies y también se valoró la utilización de un método manual mediante columnas (Stool DNA isolation kit de Norgen) en el caso de las muestras de hisopo y heces. Las muestras de plumas fueron extraídas manualmente mediante un kit comercial de Qiagen Power Solid DNA isolation Pro kit con modificaciones. Tras las extracciones se midieron tanto la cantidad de ADN mediante un Qubit version 3.0 (Life Technologies, Grand Island, NY) y la calidad con el Nanodrop One (ThermoFisher Scientific, USA). El siguiente paso fue la preparación de las librerías, en el caso del 16 S se adquirieron los primers que acotaban la región de estudio (V3/V4), la enzima Kapa HiFi HS RM kit (Roche Diagnostics, S.L.), las microesferas de purificación (Illumina Purification Beads) y los índices Nextera XT Index Kit v2 set A, B y C. El protocolo se realizó según las indicaciones del fabricante. En el caso de la metagenómica, se realizó mediante la utilización del kit DNA prep y los índices DNA/RNA UDI Tag. 96 de Illumina según las indicaciones del fabricante. Tras la realización de las librerías se midió la cantidad de ADN en el Qubit version 3.0 (Life Technologies, Grand Island, NY). También, un número representativo de librerías tanto previo como posterior a la inserción de los índices, así como todos los pools de librerías se analizaron mediante el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Posteriormente los pools para 16 S se introdujeron en un cartucho P1 de 600 ciclos (Illumina) y el run se hizo en un NextSeq 1000 mientras que los dos pools para metagenómica, cada uno de 24 muestras cada uno, en dos cartuchos P3 de 300 ciclos se realizó en un NextSeq2000. Los análisis primarios y secundarios se realizaron con el soporte de Base Space de la plataforma de Illumina. Los resultados obtenidos, en relación a las concentraciones, en los extractos de las muestras originales variaron entre las distintas matrices y métodos utilizados, pero por lo general fueron inferiores a los mínimos indicados por el fabricante (0.2 - 1 ng/μL) salvo excepciones puntuales. La calidad del material genético medida en el Nanodrop obtuvo un rango del índice 260/280 entre 0.9 - 2.1. En cuanto a las concentraciones de las librerías el 69.1% (IC 95%, 64.2%-73.8%) de las librerías finalmente utilizadas para el 16 S y el 72.9% (IC 95%, 59.0%-83.4%) de las empleadas para metagenómica no alcanzaron el mínimo de molaridad indicado por el fabricante quedándose dentro de la horquilla 0.2-3.9 nM para 16 S y 0.02-0.9 nM para shotgun. Una vez analizadas todas las carreras los resultados obtenidos de la secuenciación fueron satisfactorios.

Nuestros resultados indican que el tipo de matriz, la cantidad de la misma y método de extracción influyen en la cantidad y calidad de material genético obtenido. El kit de extracción MagMax Core con lisis mecánica obtuvo mejores resultados que el MagMax core en el caso de los hisopos y las heces. El rendimiento obtenido con el MagMax Core con módulo de lisis en comparación con

el método de columna de Novogen fue similar en cuanto a nivel de calidad del extracto siendo mejor en cuanto a la calidad del ADN. También debemos tener en cuenta que aunque las muestras presenten concentraciones iniciales sub-óptimas, tanto tras la extracción como tras la preparación de librerías, y con datos bajos de calidad pueden dar lugar a buenos resultados.

Financiación: Proyecto IND2022/AMB-23645, financiado por la Comunidad de Madrid.



### **P03. Caracterización molecular de virus de la enfermedad de Newcastle aislados en España entre 2017 y 2023**

Azucena Sánchez<sup>1\*</sup>, María Teresa Barrios<sup>1</sup>, María José Ruano<sup>1</sup>, Cristina Cano-Gómez<sup>1</sup>, Ana López-Herranz<sup>1</sup>, Rubén Villalba<sup>1</sup> y Montserrat Agüero<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Central de Veterinaria, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 28110 Algete, Madrid, España

\* azusan@mapa.es

La enfermedad de Newcastle (EN) es una enfermedad vírica altamente contagiosa que afecta a muchas especies de aves y puede causar una elevada mortalidad y graves lesiones tisulares en el sistema respiratorio, nervioso y digestivo. Está causada por cepas virulentas de paramixovirus tipo 1 (APMV-1), del género Orthoavulavirus, antes designados como *Avian avulavirus 1* (AAvV-1), perteneciente a la familia Paramyxoviridae.

La amplia circulación del virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV) dentro de las poblaciones aviares ha llevado al desarrollo de una amplia diversidad genética y a un constante surgimiento de cepas variantes. Debido a la importancia clínica y económica de la enfermedad de Newcastle, la secuenciación y el análisis molecular de una región del gen que codifica la proteína de fusión (F), se ha incorporado al diagnóstico rutinario, ya que permite determinar la patogenicidad de las cepas.

Además, el análisis completo de este gen permite llevar a cabo otros estudios para determinar el origen y evolución de las cepas o la diferenciación de las cepas de campo y vacunales. En este sentido, la clasificación de Dimitrov et al., 2019, en base al análisis de este gen, facilita estos estudios al dividir las cepas en clases y genotipos, estableciendo actualmente un total de 22 genotipos en la clase I y 2 genotipos en la clase II.

España posee el estatus de libre de la enfermedad desde octubre de 2022, lo que significa que no circula en aves domésticas; no obstante, el virus se sigue detectando en numerosas ocasiones en aves silvestres, principalmente en tórtola turca (*Streptopelia decaocto*). De una selección de 156 aislados de NDV, obtenidos desde 2017 a 2023 a partir de muestras de distintas regiones de España y diferentes especies aviares tomadas en el marco del Programa nacional de vigilancia y control de la enfermedad, se realizó la secuenciación parcial (desde 2017 a 2022) o completa (en 2023) del gen F usando protocolos del Laboratorio Europeo de Referencia de Newcastle (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe).

Los análisis filogenéticos han permitido clasificar los aislados en 4 genotipos dentro de la clase II: 10 cepas de baja patogenicidad en genotipo I, 45 cepas de alta patogenicidad en genotipo VI.2, 94 cepas de alta patogenicidad en genotipo XXI y 7 de alta patogenicidad en genotipo VII.2. Respecto a las cepas de alta patogenicidad se han detectado 5 motivos diferentes en la zona de procesamiento de la proteína F: RRQKRF, KRQKRF, RRQRRF, RRRKRF y RRKKRF. Las cepas de baja patogenicidad han mostrado 2 motivos diferentes: GKQGRL y EKQGRL.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).

## **P04. Caracterización molecular del genoma del virus de la peste equina a partir de muestra clínica de un caballo afectado en Nigeria en 2022**

Dolores Buitrago<sup>1</sup>, Laura Jiménez<sup>2\*</sup>, Bernabé Diéguez<sup>2</sup>, M<sup>a</sup> Jesús Cano<sup>2</sup>, Marta Valero-Lorenzo<sup>1</sup>, Cristina Tena-Tomás<sup>2</sup>, Jorge Morales-Bello<sup>1</sup>, Rubén Villalba<sup>1</sup>, Montserrat Agüero<sup>1</sup> y José Antonio Bouzada<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Central de Veterinaria, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 28110 Algete, Madrid, España

<sup>2</sup> Tecnologías y Servicios Agrarios, S.A. (TRAGSATEC), 28037 Madrid, España

\* at\_algete107@mapa.es

La peste equina (PE) es una enfermedad vírica infecciosa, pero no contagiosa, transmitida por Culicoides (insectos hematófagos), que afecta a todas las especies de équidos. Las tasas de letalidad de los caballos en poblaciones sin protección pueden alcanzar el 80-90%, lo que sitúa a la PE entre las infecciones víricas más letales conocidas en los caballos.

La enfermedad está causada por un Orbivirus de la familia Sedoreoviridae, virus con ARN de doble cadena, sin envoltura, segmentado (diez segmentos), con un diámetro de 55-70 nm y del que se han descrito nueve serotipos.

La peste equina es endémica del África subsahariana, especialmente en los países del sur, donde pueden circular los nueve serotipos. Los serotipos 9, 4 y 2 se han encontrado en el norte y el oeste de África, desde donde se han extendido ocasionalmente a los países que rodean el Mediterráneo. Se han producido algunos brotes fuera de África como en Oriente Medio (1959-1963), en España (serotipo 9 en 1966 y serotipo 4 en 1987-1990), en Portugal (serotipo 4 en 1989) y recientemente, en los primeros meses de 2020, en Tailandia (serotipo 1), afectando también a Malasia.

En el caso de Nigeria, la primera detección del virus de PE data de 1971, y el último brote había sido notificado en 2006, en Lagos. En diciembre de 2022 fue reportado un brote en un caballo estabulado en Ikoyi, Lagos. El brote fue confirmado en el National Veterinary Research Institute (NVRI), Vom, Nigeria, por RT-PCR y las muestras enviadas al Laboratorio Central de Veterinaria (LCV), como laboratorio de referencia de la OMSA, para la confirmación, serotipado y caracterización molecular. Tras confirmar la presencia del serotipo 9 de PE en las muestras, se llevó a cabo la secuenciación.

La secuenciación del genoma del virus aporta información importante para establecer los orígenes, la evolución y las características de cada población viral (eventos de reordenamiento del genoma o patogenicidad). El LCV secuencia habitualmente los aislados del virus de la peste equina utilizando una batería de cebadores diseñados en el propio laboratorio, que permiten obtener la secuencia casi completa de los distintos segmentos del virus mediante secuenciación Sanger. La incorporación de las técnicas de secuenciación masiva en el LCV desde finales del 2021 utilizando la plataforma MySeq de Illumina, ha permitido desarrollar una estrategia de secuenciación masiva por amplicones. Aprovechando los diseños de los cebadores antes mencionados, junto a la potencia de las técnicas de secuenciación masiva, se consiguió secuenciar el genoma casi completo del virus de la PE del brote de Nigeria 2022, desde muestras clínicas, concretamente desde muestras de bazo positivo al virus.

Por tanto, la secuenciación masiva de amplicones se presenta como un buen método a la hora llevar a cabo la caracterización del genoma del virus de la PE cuando no es posible el aislamiento viral.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA)

## P05. Garrapatas en humanos: Identificación de especies y detección de patógenos zoonóticos en garrapatas extraídas por el Servicio Vasco de Salud

Patirke Ibarrodo-Mendiola<sup>1\*</sup>, Patricia Vazquez<sup>1</sup>, Miriam Alkorta<sup>2</sup>, Kristina Zugazaga Inchaurreza<sup>3,4</sup>, Ana L. García-Pérez<sup>1</sup>, Jesús F. Barandika<sup>1</sup>, Aitor Cevidanes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal. NEIKER- Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario. Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio, Bizkaia

<sup>2</sup> Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Donostia. Donostia. Gipuzkoa

<sup>3</sup> Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica, Hospital Universitario de Basurto, Bilbao, Bizkaia, <sup>4</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Biocruces, Barakaldo, Bizkaia

\* acevidanes@neiker.eus

Las garrapatas son vectores importantes de diversos patógenos con relevancia en salud pública y sanidad animal. La creciente concienciación de la ciudadanía sobre el riesgo que suponen las picaduras de garrapatas ha llevado a un aumento en las consultas médicas y a la necesidad de implementar una vigilancia sistemática de estos artrópodos. Este estudio se centra en la identificación de las especies de garrapatas que pican a humanos, y en la detección de patógenos zoonóticos transmitidos por garrapatas recolectadas en personas que acuden a hospitales y centros de salud primaria del Servicio Vasco de Salud para su extracción.

Desde 2019, se han recolectado e identificado morfológicamente garrapatas retiradas de humanos en hospitales y centros de salud de Euskadi. Las garrapatas fueron identificadas a nivel de especie en base a características morfológicas, y se clasificaron según su estadio (adulto, larva, ninfa) y según su grado de alimentación (sin alimentar, parcialmente alimentada y alimentada). El ADN fue extraído a partir de garrapatas individuales o a partir de lotes, en el caso de extraer más de una garrapata por paciente, de acuerdo con la especie y estadio. Posteriormente se evaluó mediante técnicas moleculares (PCR) la presencia de los patógenos *Anaplasma* spp., *Coxiella burnetii*, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp. y Piroplasmas (*Babesia* spp./*Theileria* spp.).

Se han recibido un total de 260 garrapatas recogidas de 208 personas. Las garrapatas se recolectaron durante todo el año, principalmente en primavera y verano, con el 58% de los especímenes recibidos en junio y julio. Se identificaron cuatro géneros: *Ixodes* (n=233), *Rhipicephalus* (n=11), *Dermacentor* (n=8) y *Haemaphysalis* (n=6). Dos ejemplares no pudieron ser identificados debido a que estaban dañados. Se encontraron seis especies diferentes, siendo *Ixodes ricinus* la más común, representando el 88,9% de los especímenes. Cabe destacar que ninguna de las garrapatas identificadas pertenecía al género *Hyalomma*, conocido por ser vector del virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo.

Los resultados de la detección de patógenos en los 157 lotes de garrapatas analizados mostraron que 48 lotes presentaron ADN de *Anaplasma* spp. (30,6%), 26 *Rickettsia* spp. (16,6%), 13 *Borrelia* spp. (8,3%), 10 Piroplasmas (6,4%) y 3 *C. burnetii* (1,9%). Queda pendiente la identificación a nivel de especie de estos patógenos para determinar su potencial zoonótico y el riesgo asociado a la salud humana.

Este estudio proporciona una visión integral de las especies de garrapatas que pican con más frecuencia a la población en Euskadi, siendo *I. ricinus* la especie predominante. La alta prevalencia de patógenos como *Anaplasma* spp. y *Rickettsia* spp., subraya la necesidad de continuar con la vigilancia y la adopción de medidas preventivas que permitan mitigar el riesgo de estas enfermedades transmitidas por garrapatas en la población humana. Estos resultados también destacan la importancia del sistema sanitario en la vigilancia entomológica desde una perspectiva One Health.

Financiación: Departamento de Alimentación, Desarrollo Rural, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco; proyecto EU-LIFE 18 IPC/ES/000001 (Urban Klima 2050). AC disfruta de una beca postdoctoral 'Ramón y Cajal' RYC2021-033084-I financiada por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por la European Union NextGeneration EU/PRTR NextGenerationEU/PRTR. PIM disfruta de una beca IKERTALENT del Departamento de Desarrollo Económico, Sostenibilidad y Medio Ambiente del Gobierno Vasco.

## **P06. Q-Net-Assess: un proyecto dirigido a la caracterización de genomas completos de *Coxiella burnetii* y a la mejora de la vigilancia de esta zoonosis en Europa**

Ana Hurtado<sup>1\*</sup>, Jesús F. Barandika<sup>1</sup>, Gorka Aduriz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, NEIKER - Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 48160, Derio, Bizkaia

\* ahurtado@neiker.eus

La fiebre Q es una importante enfermedad zoonótica causada por la bacteria intracelular *Coxiella burnetii*. Los signos clínicos en humanos varían desde síntomas similares a los de la gripe hasta infecciones persistentes y potencialmente mortales. Los rumiantes, y en particular las ovejas y las cabras, son la principal fuente de infecciones humanas, aunque *C. burnetii* puede infectar a una amplia gama de otros animales domésticos y silvestres. En los rumiantes, *C. burnetii* puede causar abortos, mortinatos y crías débiles, principalmente en pequeños rumiantes, aunque, si los animales no están gestantes, la infección cursa de forma asintomática. Por lo tanto, el rango de hospedadores y el resultado de la infección son variables, si bien no está claro cómo el genotipo de *C. burnetii* puede contribuir a esta variación.

Los principales métodos utilizados actualmente para el genotipado de *C. burnetii* proporcionan información limitada y son difíciles de estandarizar entre laboratorios. La secuenciación del genoma completo (WGS, *whole genome sequencing*) ofrece una prometedora alternativa, ya que es más fácil de estandarizar y proporciona información más exhaustiva. En la actualidad, sólo se han publicado unas pocas secuencias del genoma completo de Coxiellaceae, la mayoría de las cuales se limitan a antiguos aislados de laboratorio. Esto se debe a que el aislamiento de este patógeno a partir de muestras de campo es a menudo complicado.

En el marco del proyecto europeo Q-Net-Assess, integrado por socios pertenecientes a 7 instituciones de 6 países, expertos en bacteriología, diagnóstico, vigilancia epidemiológica, y genómica de *C. burnetii*, trabajamos en la creación de un biobanco de muestras positivas a *C. burnetii* procedentes de diferentes hospedadores (animal y humano) con objeto de caracterizar la diversidad de cepas circulantes en Europa. Para ello, se está trabajando en la mejora de los métodos de aislamiento de *C. burnetii* a partir de distintos tipos de muestras, tanto en cultivo celular como en medio axénico. La secuenciación del genoma completo de las cepas aisladas durante el proyecto y de otras cepas ya disponibles en las colecciones de los distintos socios, se realiza mediante la combinación de técnicas de secuenciación masiva de lecturas cortas y largas. De forma paralela, también se están desarrollando métodos de secuenciación directa sobre muestras clínicas. En base al análisis de los genomas se seleccionarán cepas de interés para su caracterización fenotípica mediante ensayos de estimulación de sangre completa. La combinación de datos genotípicos y fenotípicos permitirá la identificación de determinantes moleculares del rango de hospedadores y la virulencia. Además, para conocer la situación epidemiológica y los métodos de vigilancia implementada en cada país participante en el proyecto, se ha elaborado un cuestionario en base al cual se plantearán recomendaciones para optimizar la vigilancia molecular de *C. burnetii* en Europa.

Desde NEIKER, animamos a todo aquel con acceso a muestras positivas a *C. burnetii* a que se ponga en contacto con el Departamento de Sanidad Animal para enviar muestras y colaborar con nosotros en la mejora del conocimiento sobre este patógeno.

Financiación: ERA-NET "Coordinación Internacional de Investigación sobre Enfermedades Animales Infecciosas" financiada por el Programa Horizonte 2020 dentro de la convocatoria ICRAD - *Coordination of Research on Infectious Animal Diseases* (Grant Agreement No. 862605) a través de la Agencia Estatal de Investigación - Proyectos de Colaboración Internacional 2023 (proyecto PCI2023-143391).

## P07. Optimización de la técnica de recogida y procesamiento de muestras ambientales basadas en esponjas para la detección molecular de patógenos

Marta Pérez-Sancho<sup>1,2\*</sup>, Carmen Herranz<sup>1</sup>, Teresa García-Seco<sup>1</sup>, Alberto Perelló<sup>3</sup>, Alberto Díez-Guerrier<sup>2,4</sup>, Antonio Martínez-Murcia<sup>5,6</sup>, Mercedes Domínguez<sup>7</sup>, Inmaculada Moreno<sup>7</sup>, Christian Gortázar<sup>3</sup>, Lucas Domínguez<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, España

<sup>2</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, España

<sup>3</sup> SaBio Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC) CSIC-UCLM-JCCM, 13071, Ciudad Real, España

<sup>4</sup> MAEVA SERVET S.L. 28749, Alameda del Valle, España

<sup>5</sup> Departamento de Microbiología, Universidad Miguel Hernández, 03312, Orihuela, Alicante, España

<sup>6</sup> Genetic PCR Solutions™, 03300 Orihuela, Alicante, España.

<sup>7</sup> Unidad de Inmunología Microbiana, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220, Majadahonda, España

\*maperezs@ucm.es

En la última década, el número de estudios sobre muestreos no invasivos aplicados en sanidad animal se ha visto incrementado ya que permiten la monitorización de agentes infecciosos facilitando una cobertura espaciotemporal más amplia velando por el bienestar animal. Sin embargo, esta aproximación presenta ciertas limitaciones, ya que la cantidad y la calidad del ADN obtenido puede ser inferior a la de los muestreos tradicionales, pudiendo ser más frecuente la presencia de inhibidores de técnicas moleculares.

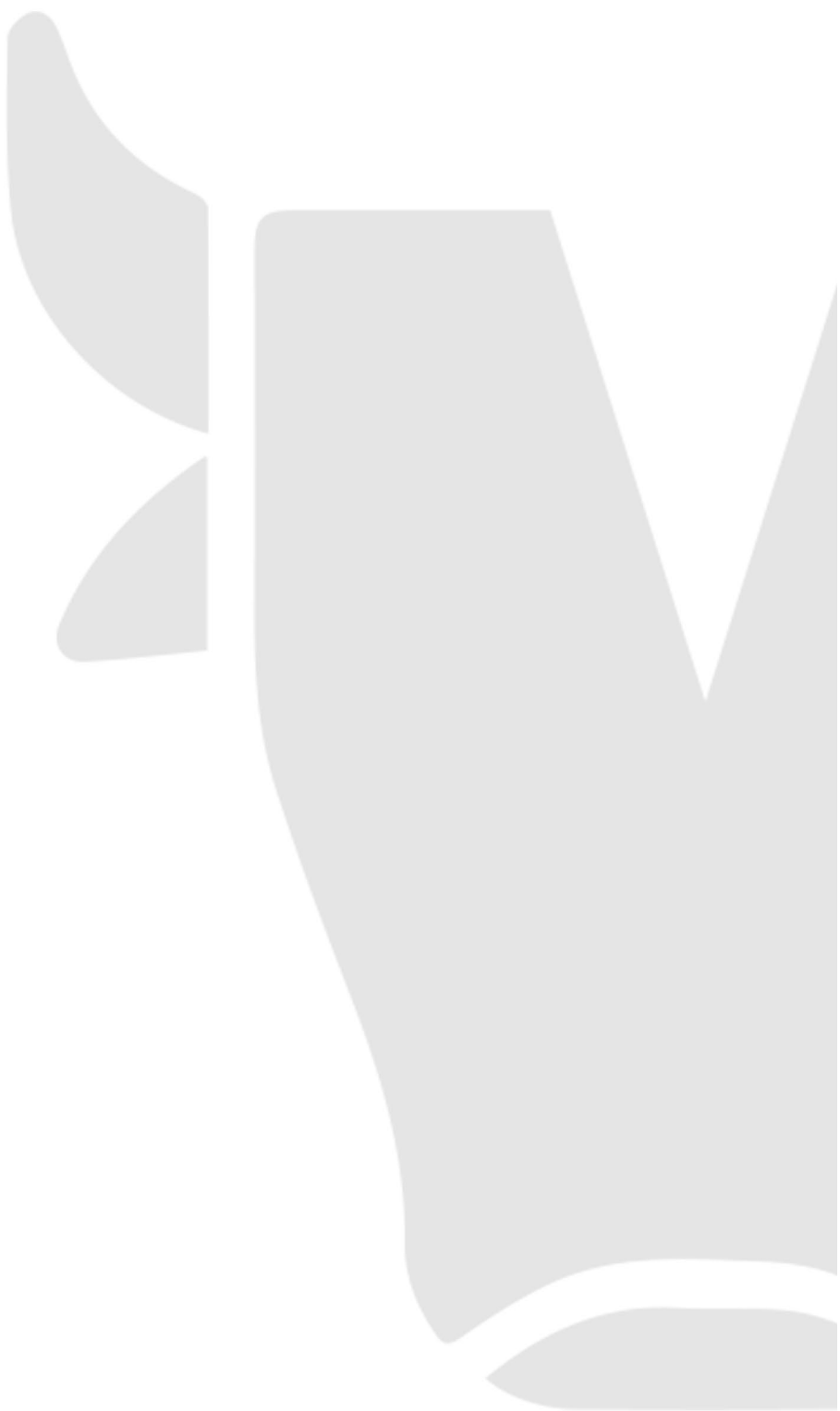
En el contexto de optimización de protocolos que permitan recuperar eficientemente material genético para mitigar las limitaciones asociadas a este tipo de muestras, en el presente estudio evaluamos distintos tratamientos de reconstitución de esponjas conservadas en un líquido surfactante (previamente empleadas con éxito para la detección de diversos patógenos como SARS-CoV-2 o *Brucella suis*) como paso previo a la extracción del material genético del líquido recogido a partir de las mismas.

Para ello se tomaron 25 esponjas (con líquido) ambientales previamente seleccionadas de puntos de muestreo de situación epidemiológica conocida y se evaluaron tres protocolos de reconstitución: (A) esponja reconstituida con 10 mL de líquido surfactante, (B) esponja no reconstituida y (C) la misma esponja de la opción B reconstituida con 10 mL de solución salina al 0,85%. Cada muestra de material genético extraído se sometió a la detección mediante PCR en tiempo real de tres dianas genéticas: IS6110 (complejo *Mycobacterium tuberculosis*), IS900 (*M. avium* subespecie *paratuberculosis*) e IS1111 (*Coxiella burnetii*).

Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el número de positivos entre los tres métodos para las 25 muestras seleccionadas; para IS6110: opción A 10 positivos, opción B 13 positivos, opción C 7 positivos. Para IS900: opción A 24 positivos, opción B 21 positivos y opción C 25 positivos. Para IS1111, opción A 17 positivos, opción B 19 positivos y opción C 20 positivos.

La adición de líquido surfactante para homogenizar y extraer muestras sólidas ya ha sido previamente descrita, pudiendo ser la elección del diluyente importante al afectar a la detección de microorganismos. Sin embargo, hay poca literatura comparando diferentes líquidos de reconstitución para muestras ambientales sólidas como esponjas. En nuestro estudio, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas sugiere que, aunque la optimización de otras variables asociadas al procesamiento y extracción de ADN puedan mejorar la sensibilidad diagnóstica, algunas variables (como la elección del diluyente) asociadas con el método de manejo de muestras previo a la extracción de material genético podría tener un impacto menor, permitiendo una mayor flexibilidad en el manejo y procesamiento de este tipo de muestras. Sin embargo, la elección del diluyente para la reconstitución de muestras ambientales sólidas, como las esponjas, puede ser crítico respecto a otros aspectos como, por ejemplo, la capacidad de inactivación de microorganismos lo que hace que sea una variable a tener en cuenta en próximas investigaciones en distintos contextos epidemiológicos.





## **P08. Diagnóstico laboratorial de *Tritrichomonas foetus***

Patricia Gómez Fernández<sup>1\*</sup>, Vicen Sanz Berzal<sup>2</sup>, Eusebio Peña Toril<sup>2</sup>, Juan A. Díaz de Tuesta García<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Tragsatec, Unidad de Parasitología, Laboratorio Regional Sanidad Animal, 28770, Colmenar Viejo, Madrid

<sup>2</sup> Unidad de Parasitología, Laboratorio Regional Sanidad Animal, 28770, Colmenar Viejo, Madrid

\* pgomez18@tragsa.es

La tricomonosis es una enfermedad venérea del ganado bovino causada por *Tritrichomonas foetus*, un parásito protozooario piriforme flagelado de aproximadamente 8–18 µm de largo y 4–9 µm de ancho con tres flagelos anteriores y uno posterior y una membrana ondulante. La enfermedad es asintomática en los toros en cambio, en las vacas pueden mostrar infertilidad, aborto y muerte embrionaria entre otros signos clínicos. Los toros de más de 3 o 4 años son el principal reservorio.

El cultivo e identificación de *Tritrichomonas foetus* se realiza en muestras de lavados prepuciales, las cuales se procesan en el momento de llegada al laboratorio por su baja viabilidad.

En primer lugar, se procede a la observación del sedimento y tras la decantación, se inocula en un medio de cultivo selectivo comercial para el crecimiento de *Trichomonas* spp. Se incuba a 37°C durante 7 días y se comprueba el crecimiento diariamente mediante observación microscópica.

Las muestras sospechosas se tiñen con May-Grünwald Giemsa y la confirmación se realiza mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) en el Laboratorio Nacional de Referencia (Laboratorio Central de Sanidad Animal).

Se obtuvieron 5 resultados positivos procedentes de lavados prepuciales analizados en el Laboratorio Regional de Sanidad Animal.

## **P09. Aislamiento de *Acinetobacter sp.* en muestras clínicas del Hospital Clínico Veterinario de la UCM**

C. Martínez-Torrecilla<sup>1\*</sup>, M.E. García<sup>1,2</sup>, S. Alvarez-Perez<sup>1,2</sup>, S. Quevedo-Caraballo<sup>1</sup>, M. Perez-Sancho<sup>1,2</sup>, J.L. Blanco<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. UCM. 28040 Madrid

<sup>2</sup> Hospital Clínico Veterinario Complutense. 28040 Madrid

\*camart30@ucm.es

Las bacterias del género *Acinetobacter* son bacilos Gram negativos, no formador de esporos, no fermentadores de glucosa, aerobios estrictos, inmóviles, catalasa positivos y oxidasa negativos. La temperatura óptima de crecimiento para las especies de interés clínico es de 33 a 35°C. La importancia epidemiológica de esta bacteria radica en su incremento de resistencia a los antibióticos en los últimos años, siendo el causante de importantes brotes nosocomiales en hospitales de medicina humana.

Con esta idea general y la falta de estudios en la medicina veterinaria, nuestro equipo ha querido estudiar la presencia de *Acinetobacter* en las muestras procesadas en el Hospital Clínico Veterinario de la UCM, profundizando en la detección de posibles resistencias a antibióticos. Todo ello, con el fin de poder mejorar el uso de antibióticos, evitar brotes nosocomiales y mejorar el bienestar de nuestros animales.

El estudio consta de 23 aislamientos realizados desde el año 2011 hasta la actualidad, de diferentes especies de pacientes (équidos, cánidos, felinos, reptiles y roedores) y diferentes tipos de fluidos (hisopos, lavados traqueales, incisiones abdominales, heridas, abscesos, líquido cefalorraquídeo, etc). A partir de las muestras, se aislaron en medio Agar-sangre y se cultivaron a 37° C, excepto las muestras de los reptiles, que fue a 28° C. A continuación, se realizó una identificación fenotípica visual (buscando colonias bacterianas circulares, mayoritariamente blancas, muy elásticas y viscosas) y una identificación a través de dos equipos, el MALDI-TOF y el VITEK-2. También incorporamos un medio de cultivo cromogénico selectivo y diferencial (CHROMagar™ *Acinetobacter*) donde *Acinetobacter* crece de color rosa-rojo.

Los resultados fueron que, de 23 muestras, sólo coincidieron en los tres métodos de identificación 7 muestras. En 4 muestras, el MALDI-TOF no obtuvo identificación, mientras que el VITEK-2 y el medio cromogénico sí identificaron *Acinetobacter*, concretamente la especie *A. Iwoffii*. En otras 4 muestras, el MALDI-TOF y el VITEK-2 identificaron dos especies diferentes de *Acinetobacter* mientras que el medio cromogénico seguía dando positivo. Y en un par de casos, tanto el MALDI-TOF como el medio cromogénico no identifican *Acinetobacter*, mientras que el VITEK-2 sí. Las especies más abundantes fueron *A. baumannii*, *A. Iwoffii* y *A. radioresistens*.

En cuanto al estudio sobre resistencias antibióticas, la bibliografía indica importantes resistencias a grupos farmacológicos como los beta-lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas, y carbapenemes. Mientras que hablan de sensibilidad a tetraciclinas y polimixinas. En nuestro estudio, usamos un total de 24 antibióticos de varios grupos farmacológicos. Nuestros resultados indicaron resistencia a ampicilina, amoxicilina-clavulánico, clindamicina, metronidazol, oxitetraciclina, penicilina; sensibles a amikacina, enrofloxacina, gentamicina, trimetoprim-sulfamida, doxiciclina, y marbofloxacino. Además, también podemos concluir que, de 23 muestras, 10 de ellas son bacterias multiresistentes.

En la actualidad estamos realizando estudios de secuenciación de genoma completo de cada uno de los aislados para completar la información del presente trabajo.

## **P10. Desarrollo de un protocolo para cuantificar las bacterias viables en biofilms: Eficacia del ácido peracético frente a biofilms producidos por *Listeria monocytogenes***

Romero-Salmoral, Antonio<sup>1,3</sup>, Costa, Jean<sup>2,3</sup>, Bolívar Carrillo, Araceli<sup>2,3</sup>, Cardoso-Toset, Fernando<sup>4</sup>, Jurado-Martos, Francisco Luis<sup>4</sup>, Boyer Bustamante, Eva<sup>1,3</sup>, Luque Moreno, Inmaculada<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Sanidad Animal. Unidad de Investigación Competitiva (UIC) Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, International Excellence Agrifood Campus 'CeIA3', University of Córdoba, Córdoba

<sup>2</sup> Dpto. Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Córdoba

<sup>3</sup> Unidad de Investigación Competitiva (UIC) Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, International Excellence Agrifood Campus 'CeIA3', University of Córdoba, Córdoba

<sup>4</sup> Departamento I+D+i, CICAP, 14400, Pozoblanco, Córdoba

\* sa1lumoi@uco.es

Los biofilms o biopelículas son comunidades de microorganismos, de una o varias especies, que producen una matriz orgánica polimérica en que las células están unidas irreversiblemente a un sustrato vivo o inerte. Estas comunidades presentan características diferentes a las bacterias en su forma planctónica, tanto en términos de crecimiento como en la transcripción de genes, y pueden exhibir distintos rasgos fenotípicos. Esta adaptación aumenta la supervivencia en el ambiente y la resistencia a algunos antibióticos y desinfectantes. Este aspecto es particularmente relevante en bacterias como *Listeria monocytogenes* (Lmc), responsable de la listeriosis, una de las enfermedades más graves de origen bacteriano transmitida por alimentos. El uso de desinfectantes eficaces e inocuos para inhibir la formación y destruir los biofilms ya formados supone un reto para la industria agroalimentaria en la actualidad. Para valorar la eficacia de estos desinfectantes, es necesario establecer protocolos que puedan ser llevados a cabo en los laboratorios de diagnóstico y que sean fácilmente reproducibles.

En este trabajo se ha desarrollado un protocolo para evaluar la eficacia de desinfectantes en condiciones *in vitro* para la destrucción de biofilms producidos por bacterias de importancia sanitaria. Se presentan los resultados obtenidos con el ácido peracético (PAA Kersia®), a una concentración de 0,5% y tiempo de contacto de 15 min., sobre el biofilm formado en placas de poliestireno (Nunc™ MicroWell™, Thermo Fisher Scientific) por un total de 38 cepas de *Lmc*. La producción de biofilms se realizó siguiendo la metodología descrita por Stepanovic' et al., (2004) y Tsukatani et al., (2020), utilizando Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI, Oxoid, UK) para el crecimiento de la bacteria (37 °C/24 h). El tratamiento del biofilm con PAA se realizó según Rodríguez-Melcón et al. (2019), neutralizando el efecto del PPA con tiosulfato al 10% (3 min) y retirando el biofilm según la metodología de Vandecandelaere et al. (2016). Posteriormente, se procedió a liberar las bacterias sésiles añadiendo a cada pocillo solución salina estéril 150 mM, aplicando dos ciclos de ultrasonidos ajustado a 50-60 kHz durante 5 min y centrifugando a 4000 rpm durante 10 minutos, resuspendiendo el pellet con 1 mL de PBS.

El número de células viables en el biofilm se determinó realizando diluciones decimales, y posterior recuento en placas de Agar Trypticase Soja (TSA, Oxoid). Los recuentos en placas de *Lmc* se transformaron en valores logarítmicos decimales (log UFC/mL), tanto antes como después del tratamiento. Todos los ensayos se realizaron por duplicado, utilizando controles negativos que incluyeron caldo BHI con *Lmc* sin PAA, caldo BHI sin *Lmc* y sin PAA. La prueba se realizó usando una columna (8 pocillos) por cada cepa, obteniendo el promedio y la desviación estándar.

En general, el PPA ha reducido el número de células viables dentro del biofilm, aunque con variabilidad entre aislados. De los aislados, 5 (13,16%) mostraron reducciones entre 0,51 y 2 log, 29 (76,32%) presentaron reducciones entre 2 y 4 log, y 4 (10,52%) mostraron reducciones logarítmicas entre 4 y 5 log. Sin embargo, el PAA no mostró efecto bactericida en las condiciones evaluadas. Por ello, es necesario realizar estudios adicionales para evaluar otras concentraciones y tiempo de contacto más eficaces con el PPA, así como otros desinfectantes autorizados. El protocolo utilizado ha demostrado ser reproducible y fácil de realizar e interpretar.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto P18-RT-1386 (RESISTALI), subvencionado por la Junta de Andalucía. Kersia® ha suministrado el PPA. JC disfruta de una beca postdoctoral "Margarita Salas" (UCOR01MS) de la Universidad de Córdoba, financiada por el Ministerio de Universidades del Gobierno de España, a través del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia financiado por la Unión Europea – NextGenerationEU. ARS disfruta de un contrato con cargo al proyecto Valoración de la Eficacia y Seguridad de Vacunas (Ref. 12019059).

## **P11. Evaluación del rendimiento diagnóstico de la intradermotuberculinización y la inspección macroscópica para el diagnóstico de la tuberculosis bovina según las directrices de la Organización Mundial de la Sanidad Animal**

Vera-Salmoral Eduardo<sup>1</sup>, Sánchez-Carvajal José María<sup>2</sup>, Gómez-Gascón Lidia<sup>1</sup>, Larenas-Muñoz Fernanda<sup>2</sup>, Astorga Márquez, Rafael Jesús<sup>1</sup>, Luque Moreno, Inmaculada<sup>1\*</sup>, Gómez-Laguna Jaime<sup>2</sup>, Huerta Lorenzo, Belén<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Sanidad Animal. Unidad de Investigación Competitiva (UIC) Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, International Excellence Agrifood Campus 'CeIA3', University of Córdoba, Córdoba

<sup>2</sup> Dpto. Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Toxicología. Unidad de Investigación Competitiva (UIC) Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, International Excellence Agrifood Campus 'CeIA3', University of Córdoba, Córdoba

\*sa1lumoi@uco.es

La tuberculosis bovina (TBb) producida por micobacterias del Complejo *Mycobacterium Tuberculosis* (CMT) constituye un reto para la salud pública y la sanidad animal, y su erradicación es un objetivo prioritario de la Unión Europea. El diagnóstico rutinario de la enfermedad se basa en la detección y eliminación de animales infectados en campo, con la prueba de intradermotuberculinización simple (IDTB) y la observación de lesiones macroscópicas en el matadero, para su posterior confirmación mediante el cultivo bacteriológico y molecular (PCR). En nuestro país, hay diferentes escenarios epidemiológicos (zonas infectadas, zonas libres) y por ello, conocer la utilidad diagnóstica de las pruebas resulta de especial interés para tomar decisiones. El objetivo de este estudio fue estimar la utilidad diagnóstica de la IDTB y la inspección macroscópica para diferentes objetivos diagnósticos siguiendo las directrices de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OMSA).

Se un total de 117 muestras obtenidas en matadero, procedentes de 59 bovinos con cultivo microbiológico/PCR positiva y 58 con cultivo microbiológico/PCR negativa. Se estimó la sensibilidad (SE) y especificidad (E) diagnósticas, las razones de probabilidad positiva (RPP) y negativa (RPN), así como los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) de cada técnica para distintas probabilidades pre-test (PPT).

La IDTB con interpretación estricta demostró una precisión moderada para confirmar la ausencia de infección en poblaciones históricamente libres de TBb, con una tasa de falsos positivos del 12,1%, pero también para detectar animales positivos en la fase inicial de los programas de erradicación, con una tasa de falsos negativos del 13,6%. El rendimiento diagnóstico para descartar la TBb fue notablemente alto (VPN > 90%) en animales con una PPT inferior al 42%. La inspección post mortem constituyó una alternativa interesante como herramienta para confirmar los casos sospechosos y positivos a la IDTB, sobre todo en zonas con una prevalencia de la TBb superior al 19%, donde la aplicación de la IDTB y de medidas de erradicación puede resultar poco práctica. En estas zonas, la probabilidad de que los animales con lesiones compatibles con TBb estén afectados por la enfermedad supera el 90%. Del mismo modo, en los rebaños con una PPT inferior al 25%, la ausencia de TBb podía descartarse con una certeza superior al 90%.

Estos resultados ponen de manifiesto la eficacia de la IDTB y de la inspección post-mortem en matadero como técnicas de diagnóstico eficaces en zonas de alta prevalencia en los actuales programas de erradicación de la TBb, donde las técnicas moleculares pueden no ser viables.

Financiación: Este trabajo ha sido posible gracias al proyecto "GOP2I-CO16-0010. Nuevas medidas y técnicas para el control de la Tuberculosis Bovina en Andalucía". Subvencionado los Grupos Operativos de la Asociación Europea para la Innovación para la productividad y sostenibilidad agrícolas, EIP-AGRI José María Sánchez-Carvajal ha disfrutado de un contrato Margarita Salas del Ministerio de Universidades. Fernanda Larenas Muñoz ha disfrutado de una beca de doctorado de ANID (Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo)/Beca de doctorado Chile/2019/72200324.

## P12. Evaluación de un protocolo rutinario de aislamiento e identificación de microorganismos causantes de mastitis bovina como alternativa al uso del sistema automatizado VITEK®

Silvia Molina Gay<sup>1</sup>, Lidia Gomez Gascón<sup>2</sup>, Francisco Jurado Martos<sup>1</sup>, Belén Barrero Domínguez<sup>1</sup>, Ángela Galán Relaño<sup>2</sup>, Inmaculada Luque Moreno<sup>2</sup>, Carmen Tarradas Iglesias<sup>2</sup>, Fernando Cardoso Tose<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento I+D+i, CICAP, 14400, Pozoblanco, Córdoba

<sup>2</sup> Departamento Sanidad Animal. Unidad de Investigación Competitiva (UIC) Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, International Excellence Agrifood Campus 'CeIA3', Universidad de Córdoba, Córdoba

\* fcardoso@cicap.es

La mastitis bovina es la patología infecciosa más prevalente en el ganado bovino lechero, ocasionando pérdidas económicas de difícil cuantificación en la industria láctea. Se trata de una patología multietiológica cuyo control se basa en instaurar medidas de manejo y tratamiento selectivo con antimicrobianos eficaces. Para ello, es necesario identificar los microorganismos causales y evaluar el antimicrobiano más adecuado en condiciones *in vitro*. Los métodos convencionales de aislamiento e identificación están siendo sustituidos por otros automatizados, como el sistema VITEK® 2 Compact (BioMérieux, España), que permite obtener resultados fiables a partir de las 22 horas, aunque requiere una inversión en equipamiento y el consumo de fungibles específicos que encarecen el diagnóstico. El objetivo de este estudio fue evaluar la idoneidad de un protocolo rutinario de aislamiento e identificación bioquímica basado en las recomendaciones del National Mastitis Council (método 1) respecto al sistema automatizado VITEK® 2 Compact (método 2) como alternativa coste-eficiente en el laboratorio de diagnóstico de mastitis. El método 1 se basa en el estudio de las características culturales en medios generales y selectivos y pruebas bioquímicas, como el crecimiento en agar bilis y esculina, factor CAMP o test de aglutinación (grupos de Lancefield), donde se obtiene el resultado en 24-48 horas, mientras que el método 2 es un método comercial que utiliza un sistema de tarjetas cerradas, que se compara con una base de datos que incluye una gran variedad de microorganismos. Se determinó el grado de concordancia (valor  $\kappa$ ), utilizando el programa WinepiScope for Window 2.0 (<http://www.winepi.net/>).

Se analizaron 477 muestras de leche bovina con sospecha de mastitis clínica o subclínica procedentes de 103 ganaderías de la comarca de los Pedroches (Córdoba). Se obtuvieron un total de 484 aislamientos que fueron identificados por ambos métodos en paralelo.

Los resultados de este estudio muestran un grado de concordancia excelente en la identificación de especies como *Escherichia coli* ( $\kappa=0.905$ ,  $IC_{95}$ : 0.857- 0.952), *Enterococcus* spp. ( $\kappa=0.873$ ,  $IC_{95}$ : 0.812, 0.933), *Staphylococcus aureus* ( $\kappa=0.922$ ,  $IC_{95}$ : 0.770, 1.074) o *Trueperella pyogenes* ( $\kappa=1$ ). Se obtuvo un grado de concordancia adecuada para *Streptococcus dysgalactiae* ( $\kappa=0.689$ ,  $IC_{95}$ : 0.594, 0.783) o moderada para *Streptococcus uberis* ( $\kappa=0.483$ ,  $IC_{95}$ : 0.398, 0.568).

En base a estos resultados consideramos que el protocolo convencional es útil para identificar diferentes grupos microbianos, pero es necesario disponer de técnicas complementarias para identificar microorganismos atípicos de carácter emergente en situaciones epidemiológicas concretas como *Lactococcus garviae*, *Aerococcus viridans*, o especies de estafilococos coagulasa negativo.

Financiación: Este estudio ha sido financiado por la Junta de Andalucía como parte del proyecto PY18-RE-0051: Estudio de la epidemiología y las resistencias antimicrobianas de los microorganismos emergentes implicados en el desarrollo de mastitis bovina en Andalucía y actualización de los protocolos del diagnóstico.

### **P13. Validación y comparación de un protocolo rutinario de aislamiento de *Streptococcus uberis* aislados de mastitis bovinas y el sistema automatizado VITEK®**

Silvia Molina-Gay<sup>1</sup>, Fernando Cardoso-Toset<sup>1\*</sup>, Belén Barrero-Domínguez<sup>1</sup>, Ángela Galán-Relaño<sup>2</sup>, Inmaculada Luque Moreno<sup>2</sup>, Belén Huerta Lorenzo<sup>2</sup>, Rafael J. Astorga Márquez<sup>2</sup>, Lidia Gómez-Gascón<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento I+D+i, CICAP, 14400, Pozoblanco, Córdoba

<sup>2</sup>Departamento Sanidad Animal. Unidad de Investigación Competitiva (UIC) Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, International Excellence Agrifood Campus 'CeIA3', Universidad de Córdoba, Córdoba

\* fcardoso@cicap.es

La mastitis es una de las principales dominantes patológicas que afectan al ganado bovino lechero, responsable de importantes pérdidas económicas para el sector. Es un proceso multietiológico, y entre los agentes responsables, *Streptococcus uberis*, se relaciona con cuadros de mastitis recurrentes. Para su control, es necesario identificar la bacteria y evaluar el antimicrobiano más adecuado en condiciones *in vitro*. La identificación de este patógeno se basa en su aislamiento e identificación (características fenotípicas), mediante pruebas bioquímicas convencionales o comerciales. Cada vez más se emplean en laboratorios sistemas automatizados, como el sistema VITEK® 2 Compact (BioMérieux, España), aunque requiere una inversión en equipamiento y fungibles específicos que encarecen el diagnóstico.

El objetivo de este estudio fue validar, tomando como prueba de referencia la PCR (Sherwin et al. 2020), el sistema automatizado VITEK® 2 Compact (método 1) y un método basado en los medios selectivos y las pruebas bioquímicas recomendadas por el National Mastitis Council (método 2): producción de catalasa (-), hidrólisis de esulina (+), crecimiento en presencia de bilis (-) factor CAMP (-/+) grupos de Lancefield (-). Asimismo, se compararon ambas pruebas fenotípicas para determinar su concordancia (valor  $\kappa$ ). Para ello se empleó el programa Epidata.

Un total de 477 muestras de leche bovina con sospecha de mastitis clínica o subclínica procedentes de 103 ganaderías de la comarca de los Pedroches (Córdoba) se sembraron en medio TSA y Edwards suplementado con sangre ovina al 8%, obteniéndose un total de 484 aislamientos que fueron identificados por los tres métodos. Mediante PCR se identificaron un total de 80 cepas como *S. uberis*. De estas, 80 fueron positivas al sistema automatizado VITEK® 2 Compact, determinando una sensibilidad (Se) del 100% (99,38%;100%), una especificidad (Es) del 97,8% (96,2%; 99,34%) y un índice de validez de 98,14% (96,83%; 99,45%). En base a ello, la razón de probabilidad de los resultados positivos (RP+) sería del 44,89 (23,56; 85,64) y de los resultados negativos 0. Mediante el método 2, se identificaron un total de 52 aislados (37 + también a la PCR), determinando una Se del 46,25% (34,7%;57,8%), una Es del 96,29% (94,32%; 98,25%) y un índice de validez de 88,02% (85,02%; 91,01%). En base a ello, la razón de probabilidad de los resultados positivos (RP+) sería del 12,46 (7,19; 21,59) y de los resultados negativos (RP-) 0,56 (0,46; 0,68). Finalmente, se compararon ambos métodos fenotípicos mediante el valor  $\kappa$  (0,483 IC95% 0,398, 0,568), obteniendo un grado de acuerdo no debido al azar moderado.

En base a estos resultados consideramos que ambos métodos pueden ser utilizados para el diagnóstico de *S. uberis* en el laboratorio de diagnóstico, aunque el sistema automatizado se revela como una mejor opción, ya que este método tiene un alto valor diagnóstico tanto para confirmar como para descartar a este patógeno, mientras que el método 2 solo serviría para confirmar su identidad.

Financiación: Este estudio ha sido financiado por la Junta de Andalucía como parte del proyecto PY18-RE-0051: Estudio de la epidemiología y las resistencias antimicrobianas de los microorganismos emergentes implicados en el desarrollo de mastitis bovina en Andalucía y actualización de los protocolos del diagnóstico.

## **P14. Estudio retrospectivo de la prevalencia de las variantes maestras A y B del Virus de las Alas Deformadas (DWV) en los apiarios de España mediante PCR en Tiempo Real**

Jose Manuel Casatorres<sup>1\*</sup>, Pilar Fernández<sup>1</sup>, Ana López<sup>1</sup>, María José Ruano<sup>1</sup>, Leticia Hernández<sup>1</sup>, Isabel Gonzalo<sup>1</sup>, Rubén Villalba<sup>1</sup> y Montserrat Agüero<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Central de Veterinaria, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 28110 Algete, Madrid, España

\* bec\_algete03@mapa.es

El Virus de las Alas Deformadas (en adelante DWV) representa un problema apícola a escala internacional, siendo una de las causas responsables de la elevada mortalidad en colonias de abejas infestadas por el ácaro *Varroa*, y uno de los factores más influyentes en el fenómeno de desdoblamiento masivo de estos himenópteros.

El ácaro ectoparásito *Varroa* actúa a la vez como vector de este patógeno (transmisión horizontal), y como agente potenciador de las infecciones causadas por el mismo, lo que ha favorecido la expansión de este virus y la aparición de tres “variantes maestras” o genotipos diferenciados, clasificados como DWV-A, DWV-B y DWV-C. Los dos primeros genotipos, A y B, han sido descritos e identificados de manera extensa a escala internacional, mientras que la variante maestra C fue identificada recientemente, existiendo poca información en lo que se refiere a su prevalencia mundial (Mordecai et al., 2016).

En España, la prevalencia de DWV en las colonias apícolas está documentada de manera efectiva desde el año 2012, gracias a la adopción del proyecto europeo EPILOBEE y su posterior evolución en el territorio nacional en el Programa de Vigilancia de enfermedades de las abejas, que durante el periodo 2012-2013 realizó análisis sistemáticos de muestras de un total de 204 apiarios de 14 comunidades autónomas, de manera normalizada y sin atender a parámetros exclusivamente sintomáticos. Este tipo de análisis resulta de elevado valor debido a la naturaleza habitualmente asintomática de las infecciones crónicas de este virus, que de otro modo no resultarían identificadas.

Si bien el Programa fue un sólido primer paso en la detección y estimación de la prevalencia de este virus, la técnica de referencia empleada en su diagnóstico, basada en PCR Convencional seguida de electroforesis en gel de agarosa, no asegura la detección de la variante maestra DWV-B debido a la mínima especificidad de los cebadores empleados en el diagnóstico para este genotipo concreto. Este hecho puede dar lugar a que la prevalencia del virus en este periodo pueda estar infravalorada.

En este contexto, se ha llevado a cabo un estudio retrospectivo en las muestras recogidas en el periodo 2012-2013, empleando técnicas de PCR en Tiempo Real específicas que permiten el diagnóstico diferencial de las variantes DWV-A y DWV-B, para conocer la prevalencia y distribución de ambos genotipos virales en los apiarios del territorio nacional, así como obtener una estimación de su proporción comparada. El método empleado, desarrollado por el Laboratorio Europeo de referencia de ANSES (Francia), utiliza cebadores y sondas específicos para cada variante maestra, dirigidos a la secuencia genómica codificante para la proteína VP3.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). J. M. Casatorres fue financiado por una beca de formación práctica para titulados universitarios, en el ámbito de los laboratorios de sanidad animal de genética molecular y de sanidad vegetal, dependientes de la Dirección General de Sanidad de la Producción Agroalimentaria y Bienestar Animal (Orden APA/1340/2022).



## **P15. Evaluación retrospectiva de las muestras de Vigilancia Pasiva de Fiebre Q recibidas en el LCSA**

Eugenia R. Glez. Nuño<sup>1</sup>, Rocío Fernández Oropesa<sup>1\*</sup>, Manuel Francisco Hernández<sup>1</sup>, Olga Fernández Navarro<sup>2</sup>, Antonio López Mariscal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Central de Sanidad Animal, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 18320, Santa Fe (Granada).

<sup>2</sup>Tecnologías y Servicios Agrarios, S.A.

\*rforopesa@mapa.es

La fiebre Q (Enfermedad de Declaración Obligatoria) es una zoonosis de distribución mundial causada por la bacteria intracelular *Coxiella burnetii*, considerándose el ganado caprino y ovino los principales reservorios para la infección en humanos en España.

En el Informe de Zoonosis de One Health de la Unión Europea elaborado por la EFSA, España figura como uno de los países de la UE que ha notificado mayor número de casos en humana en los últimos años, considerándose una enfermedad de relevancia tanto en sanidad animal como pública. A pesar de ello, esta enfermedad no cuenta aún con un programa de vigilancia y notificación armonizado a nivel europeo.

En España, el programa nacional de vigilancia de Fiebre Q en sanidad animal se basa fundamentalmente en la Vigilancia Pasiva. Esta vigilancia se basa en la notificación y comunicación inmediata de cualquier sospecha por parte del sector ganadero y veterinario, al reconocer signos compatibles con la enfermedad como son la presencia de abortos esporádicos, nacidos muertos o débiles en establecimientos de rumiantes.

En este estudio evaluamos los datos de las muestras recibidas en el LCSA entre los años 2018 y 2023 en el marco de la Vigilancia Pasiva de la Fiebre Q (*Coxiella burnetii*) en pequeños rumiantes.

En este contexto, analizamos según el número de muestras recibidas en nuestro laboratorio como ha ido variando su evolución en el tiempo y su distribución geográfica, así como distintos factores que intervienen en el diagnóstico molecular y su posible impacto en los resultados obtenidos.

En concreto, aunque en pequeños rumiantes la excreción del agente patógeno en heces se considera una vía importante, se pretende confirmar que los hisopos vaginales son las muestras de elección para la detección del agente patógeno mediante PCR en el ámbito de la Vigilancia Pasiva, sin restar importancia a las demás matrices en el diagnóstico molecular, ya que la combinación de todas las vías de excreción relevantes (secreciones vaginales y rectales y leche) mejorará la sensibilidad diagnóstica.

Finalmente hemos estudiado el porcentaje de las muestras remitidas en el contexto de la Vigilancia Pasiva en las que se ha detectado el agente patógeno tanto por métodos directos o indirectos en función de las matrices analizadas.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Eugenia R. Glez. Nuño fue financiada por una beca de formación práctica para titulados universitarios, en el ámbito de los laboratorios de sanidad animal, de genética molecular y de sanidad vegetal, dependientes de la Dirección General de Sanidad de la Producción Agroalimentaria y Bienestar Animal (Orden APA/1340/2022).

## **P16. Otitis externa en perros: microbiología y susceptibilidad antimicrobiana**

Miguel Manzano Chinchón<sup>1\*</sup>, Patricia Gómez Fernández<sup>2</sup>, Gema López Lozoya<sup>1</sup>, Marcos Querol Sánchez<sup>3</sup> Juan A. Díaz de Tuesta García<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Bacteriología, Laboratorio Regional Sanidad Animal, 28770, Colmenar Viejo, Madrid

<sup>2</sup> Tragsatec, Unidad de Bacteriología, Laboratorio Regional Sanidad Animal, 28770, Colmenar Viejo, Madrid

<sup>3</sup> Unidad de Microbiología, Laboratorio Municipal Salud Pública, 28043, Madrid

\* mmc350@madrid.org

La otitis externa es una inflamación del oído relativa al canal auditivo externo, y una de las afecciones que con más frecuencia se observa en la clínica. La otitis externa afecta al 15-20% de los perros y al 4-7% de los gatos en consultas veterinarias.

Evaluación microbiológica y susceptibilidad antibiótica de otitis externas analizadas en el Laboratorio Regional de Sanidad Animal desde el año 2005 al año 2024.

Se obtuvieron resultados de 49 muestras de otitis externas. A partir de las muestras se realizaron cultivos bacteriológicos e identificación mediante perfiles bioquímicos para cada uno de los microorganismos aislados. Asimismo, se realizaron antibiogramas mediante difusión en placa según Kirby-Bauer, utilizando los criterios del CLSI.

## P17. El coipú (*Myocastor coypus*) como reservorio potencial de resistencias antimicrobianas en humedales de Cataluña

Mercedes Fernández\*, Chiara Seminati, Rafael A. Molina-Lopez, Laila Darwich

Universidad Autónoma de Barcelona

\*MariaMercedes.Fernandez2@autonoma.cat

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una de las amenazas sanitarias más preocupantes actualmente por su impacto directo en las personas y los animales, al dificultar el tratamiento de infecciones, aumentar el riesgo de mortalidad y la aparición de patologías más graves. El estudio de las RAM en la fauna salvaje es esencial para el enfoque "One Health", ya que los animales salvajes pueden ser reservorios, portadores y diseminadores de bacterias resistentes, actuando como centinelas medioambientales. Un buen modelo para estudiar como centinela ambiental lo podemos encontrar en el coipú (*Myocastor coypus*), un roedor semiacuático originario de Suramérica que se considera una especie exótica invasora a nivel global. El coipú llegó hace unos años a Cataluña y desde entonces se ha multiplicado exponencialmente hasta convertirse en una verdadera plaga que se controla organizando batidas. El objetivo de este estudio es determinar la prevalencia de resistencias antimicrobianas en la especie *Myocastor coypus* en Cataluña durante el año 2023. Para lograr este propósito, se recolectaron y analizaron 116 muestras fecales de animales abatidos. Las muestras se cultivaron en medios de agar sangre y McConkey con ceftriaxona (1 µg/mL), y la identificación microbiológica de las bacterias aisladas se realizó mediante pruebas bioquímicas. Para el estudio de sensibilidad antimicrobiana (AST) se utilizó el método de Kirby-Bauer y el genotipado de los genes de resistencia a las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) se realizó mediante PCR cualitativa. Se observó crecimiento en el medio selectivo con ceftriaxona en el 16.3% (n=19) de las muestras. Según la identificación bacteriológica, los géneros más prevalentes fueron *Aeromonas* (31.5%) y *Pseudomonas* (26.3%). Las enterobacterias representaron alrededor del 42.1% de los aislados, siendo *Escherichia coli* (26.3%) la especie más frecuente, seguido por *Serratia* spp (5.3%), *Citrobacter* spp (5.3%) y *Providencia* spp (5.3%). En cuanto a los resultados del AST, *Pseudomonas* spp., es uno de los patógenos más prevalentes con mayores niveles de RAM presentando un 100% de cepas resistentes a la lincosamida, penicilina y ceftriaxona, mientras que el 60% de las cepas resultaron resistentes a amoxicilina con ácido clavulánico (AMC) y un 40% de cepas resistentes a sulfonamidas, macrólidos, fenicoles y cefalosporinas de primera y tercera generación. Por otro lado, las cepas de *E. coli* mostraron una prevalencia del 100% a las lincosamidas y macrólidos y 80% de cepas resistentes a las penicilinas y amoxicilina con ácido clavulánico. No se observaron resistencia frente a las fluoroquinolonas, aminoglucósidos y carbapenemos en ninguno de los aislados analizados. El estudio del genotipado reveló un 5% de cepas positivas al gen de resistencia *bla*CMY2 en *E. coli* (n=3), *Pseudomonas* spp (n=2) y *Aeromonas hydrophila* (n=1). A partir de estos resultados, podemos concluir que este estudio destaca la importancia de la fauna salvaje, como el *Myocastor coypus*, en la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) y de su utilidad como centinela de contaminación ambiental. Asimismo, se enfatiza la necesidad de colaboración entre profesionales de la salud humana y animal para monitorear estos roedores y abordar este desafío sanitario.

## P18. Secuenciación *shotgun* para evaluar el efecto de la terapia de secado con antibióticos en el resistoma de la leche en ganado bovino

Medelín Ocejo<sup>1\*</sup>, Leire Urrutia-Angulo<sup>1</sup>, Beatriz Oporto<sup>1</sup>, José Luis Lavín<sup>2</sup>, Gorka Aduriz<sup>1</sup>, Ana Hurtado<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, NEIKER - Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 48160, Derio, Bizkaia

<sup>2</sup> Departamento de Matemática Aplicada, NEIKER - Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 48160, Derio, Bizkaia

\* mocejo@neiker.eus

La mamitis es una de las enfermedades más relevantes en el ganado bovino lechero a nivel mundial por su impacto negativo en la producción de leche y en el bienestar animal, así como por las pérdidas económicas que provoca. El periodo de secado, durante el cual la ubre se recupera para la siguiente lactación, es un momento clave para implementar estrategias de control encaminadas a reducir la incidencia de la mamitis. Para ello, en casos justificados, se utilizan antibióticos como parte de la terapia de secado. Ante el incremento de las resistencias a los antimicrobianos (RAM), se hace imprescindible contar con herramientas diagnósticas eficientes para su monitorización. En este estudio, se ha aplicado la secuenciación masiva para investigar el impacto del tratamiento antibiótico durante el secado sobre la composición del resistoma de la leche, es decir, la presencia y abundancia de determinantes genéticos de resistencia a antimicrobianos (DGRs).

Se recogieron 31 muestras de leche de vacas de raza Frisona aparentemente sanas de una misma explotación lechera, que se agruparon en función de si habían recibido o no tratamiento antibiótico al secado: 18 tratadas (T) y 13 no tratadas (NT). Tras extraer el ADN genómico se realizó una secuenciación metagenómica *shotgun* con la plataforma Illumina (lecturas pareadas de 2x150pb). Para caracterizar el resistoma, las secuencias obtenidas se analizaron con el *pipeline* bioinformático AMR++(v.3.0.6) y la base de datos MEGARes (v.3.0).

La secuenciación generó un total de 799,2 millones de lecturas pareadas, con un índice de calidad (Q) promedio de 38,1. Se detectaron 29 DGRs en total, incluyendo 17 genes de resistencia a antibióticos (GRAs) y 12 SNPs, correspondientes a 12 clases antimicrobianas. En las muestras de 18 animales se encontró al menos un DGR; 11 T (61,1%) y 7 NT (53,8%). En las muestras NT se identificaron 9 GRAs y 4 SNPs distintos, asociados a resistencia a 4 clases de antimicrobianos, frente a los 16 GRAs y 11 SNPs relacionados a resistencia a 12 clases en las muestras T. En ambos grupos predominaron los DGRs asociados a resistencia a las clases macrólido-lincosamida-estreptogramina (MLS) y aminoglucósidos. Además, se detectaron DGRs asociados a  $\beta$ -lactámicos y resistencia a múltiples fármacos (MDR). Ambos grupos compartieron 8 de los 17 GRAs y 3 de los 12 SNPs detectados. La presencia de DGRs no solo fue significativamente mayor en los animales tratados (regresión logística, OR=1,58 [1,06-2,36],  $p = 0,023$ ), sino que también se observó una mayor cantidad total de DGRs (GLM binomial negativa, coef=0,81 [0,69-0,92],  $p < 0,001$ ). Además, las muestras de animales tratados mostraron resistencia a un mayor número de clases antimicrobianas.

La secuenciación *shotgun* ha permitido caracterizar la composición del resistoma y estimar la abundancia de DGRs. Los resultados de este estudio sugieren que el tratamiento antibiótico durante el secado influye en la composición del resistoma de la leche en vacas lecheras, incrementando tanto la diversidad de DGRs como su abundancia, lo que subraya la necesidad de utilizar los antibióticos con prudencia y desarrollar estrategias alternativas para la prevención de la mamitis.

Financiación: MCIN/AEI /10.13039/501100011033 FEDER "Una manera de hacer Europa" (Proyecto\_PID2019-106038RR-100) y MCIN/AEI /10.13039/501100011033 FSE "Invierte en tu futuro" (Ayuda\_PRE2020-096275). Departamento de Alimentación, Desarrollo Rural, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco.

## **P19. Vigilancia molecular de *Campylobacter* resistentes a antimicrobianos desde la perspectiva de una Única Salud: análisis comparado de genomas de aislados humanos, animales y alimentarios**

Ana Hurtado<sup>1\*</sup>, Medelin Ocejo<sup>1</sup>, Beatriz Oporto<sup>1</sup>, Ruth Rodríguez<sup>2</sup>, M<sup>a</sup> Ángeles Marcos<sup>2</sup>, Mikel Urrutikoetxea-Gutiérrez<sup>3</sup>, Miriam Alkorta<sup>4</sup>, José María Marimón<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, NEIKER - Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 48160, Derio, Bizkaia

<sup>2</sup> Laboratorio de Salud Pública en Gipuzkoa, Donostia-San Sebastián, Gipuzkoa

<sup>3</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Basurto (HUB), Bilbao, Bizkaia

<sup>4</sup> IIS Biogipuzkoa. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Donostia (HUD), Donostia-San Sebastián, Gipuzkoa

\* ahurtado@neiker.eus

En respuesta a la creciente amenaza que supone la propagación de bacterias resistentes a los antimicrobianos, en el País Vasco se ha planteado la creación de una Red de vigilancia integrada de las bacterias con resistencias antibióticas de mayor interés en Salud Pública para abordar desde la perspectiva de una Única Salud su detección y análisis epidemiológico. Como prueba piloto se ha seleccionado a *Campylobacter*, un importante patógeno zoonótico de transmisión alimentaria y causa de preocupación debido al incremento de la resistencia a diversos antimicrobianos, en particular a fluoroquinolonas y macrólidos.

En este estudio se seleccionaron 154 aislados (83 *C. jejuni* y 71 *C. coli*) procedentes de humanos, animales y alimentos con objeto de examinar su diversidad genómica, investigar las relaciones filogenómicas entre las cepas y determinar la distribución de determinantes genéticos de resistencia (DGR). Los aislados se obtuvieron en el País Vasco en 2021-2022 de pacientes (n=54) de dos hospitales del Servicio Público de Salud Osakidetza en Bilbao (HUB) y Donostia-San Sebastián (HUD); de animales sacrificados en cuatro mataderos (28 rumiantes, 16 porcino, 23 pollos); y de alimentos (n=33), fundamentalmente de origen aviar, del comercio minorista. El perfil fenotípico de resistencias se determinó a partir de las concentraciones mínimas inhibitorias mediante microdilución (Sensititre® EUCAMP3, ThermoFisher Scientific) interpretadas según los puntos de corte epidemiológicos de EUCAST. El genoma completo de los 154 aislados se secuenció usando la tecnología de secuenciación de fragmentos largos Oxford-Nanopore (ONT).

El análisis de MLST identificó una gran variedad de tipos ST y complejos clonales (CC) lo que indica una gran diversidad genómica. El análisis de pangenomas mostró que la mayoría de los aislados humanos de *C. jejuni* se agrupaban con aislados de alimentos y/o animales (pollos y rumiantes). Excepcionalmente (C-22 y CC-48), el genoma accesorio separaba los aislados de rumiantes de los humanos, que estaban más próximos a aislados aviares. En *C. coli*, los aislados humanos estaban más estrechamente relacionados con los aislados de pollo y productos alimentarios aviares que con los procedentes de rumiantes y cerdos. Esto sugiere un mayor riesgo de infección humana a partir de fuentes avícolas en el caso de *C. coli* mientras que en el caso de *C. jejuni* depende de los genotipos.

Se observó una buena correlación entre los perfiles fenotípicos de susceptibilidad y la distribución de DGR. Los perfiles genéticos de resistencia fueron independientes de los genotipos, lo que indica que no existe una asociación aparente entre la resistencia y el origen filogenético. La mayoría de los DGR se compartieron entre aislados de diferentes fuentes. Se detectaron más DGRs en *C. coli* que en *C. jejuni*; ocho de las 25 DGR se detectaron en ambas especies de *Campylobacter*, 12 sólo en *C. coli* y cinco sólo en *C. jejuni*. Los DGR asociados a resistencia a aminoglucósidos fueron significativamente más abundantes (en número y variedad) en *C. coli*, mientras que los genes *bla<sub>OXA</sub>* estaban más extendidos en *C. jejuni*.

La secuenciación ONT es una potente herramienta para la vigilancia molecular de patógenos bacterianos en el ámbito de una Única Salud.

Financiación: Departamento de Salud del Gobierno (Proyecto 2019111038); Departamento de Alimentación, Desarrollo Rural, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco (Proyecto URAGAN 21-00012).



## **P20. Un nuevo ELISA competitivo de alto rendimiento para la detección de anticuerpos contra *Besnoitia besnoiti* en bovinos**

Alejandra Castillo<sup>1\*</sup>, Ignacio García Pastor<sup>1</sup>, Laura Olagnon<sup>1</sup>, Adrien Limozin<sup>1</sup>, Loïc Comtet<sup>1</sup>, Philippe Pourquier<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Innovative Diagnostics - IDvet, Grabels (34), France

\*Alejandra.castillo@innovative-diagnostics.com

La besnoitiosis es una enfermedad transmitida por vectores debida a un parásito apicomplejo, *Besnoitia besnoiti* (Bb), que causa pérdidas económicas y un aumento de la mortalidad. La besnoitiosis ha sido clasificada como enfermedad emergente en Europa. Dado que la identificación de animales seropositivos es clave para controlar la enfermedad, las herramientas serológicas como ELISA, western blot (WB) o IFAT desempeñan un papel crucial para el diagnóstico de Bb. La mayoría de los kits ELISA disponibles en el mercado se basan en un método indirecto. Para mejorar el diagnóstico serológico de la Bb, Innovative Diagnostics ha generado varios anticuerpos monoclonales, y el más prometedor, se utilizó para desarrollar un nuevo ELISA de bloqueo (cELISA) que puede utilizarse en sueros/plasmas individuales y en grupos de 10 sueros/plasmas.

**Materiales y métodos:** La prueba ELISA se realizó como se describe en el prospecto del kit. La especificidad diagnóstica se evaluó en 500 sueros individuales y 404 pools únicos de 10 sueros negativos procedentes de rebaños bovinos libres de besnoitiosis sin antecedentes de besnoitiosis y/o con resultados serológicos negativos regulares.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó en 200 sueros bovinos individuales procedentes de Francia, cuyo estado positivo se había determinado mediante WB, y 200 pools positivos de 10 sueros compuestos de la siguiente manera: un único suero positivo y una mezcla de 9 sueros negativos procedentes de una región libre de besnoitiosis.

Para comprobar la ausencia de reacciones cruzadas con otros protozoos apicomplejos, 10 y 5 sueros de bovinos (Francia) con un estado seropositivo confirmado por la prueba ELISA indirecta ID Screen® *Neospora caninum* y la prueba ELISA indirecta ID Screen® *Toxoplasmosis*, respectivamente, se sometieron a la prueba ID Screen® *Besnoitia Competition*. También se evaluaron la repetibilidad, la estabilidad, la robustez y la reproducibilidad interlaboratorios.

**Resultados.** La especificidad medida para las aplicaciones individuales y en piscina fue del 100,0%, IC95% [99,2 - 100]. La sensibilidad medida para las aplicaciones individuales y colectivas fue respectivamente del 100,0%, IC95% [98,1 - 100] y del 99%, CL95% [96,4-99,7]. El porcentaje de correlación con el WB fue del 100%, lo que indica una concordancia perfecta. Todas las muestras seropositivas a *Neospora caninum* o *Toxoplasma gondii* resultaron negativas con el cELISA, lo que indica una buena exclusividad. Se validaron la repetibilidad, la estabilidad y la robustez. La reproducibilidad interlaboratorios fue buena, ya que los coeficientes de variación fueron inferiores al 15%.

**Conclusiones.** El ID Screen® *Besnoitia Competition* ELISA detecta eficientemente animales positivos, demuestra una excelente especificidad tanto en muestras individuales como en grupos de 10 muestras y una excelente correlación con el WB. Además, las prestaciones del kit cumplen los requisitos del Laboratorio Francés Experto en Besnoitiosis (ANSES).

El nuevo ID Screen® Bb cELISA es una herramienta fiable para la detección de anticuerpos bovinos dirigidos contra *Besnoitia besnoiti*. Este nuevo kit reforzará la experiencia única de IDvet en el diagnóstico de la Besnoitiosis, ofreciendo la gama más completa, con kits para la vigilancia de la leche en tanques a granel, leche o suero.

## **P21. Un nuevo ELISA indirecto de alta sensibilidad para la detección de anticuerpos contra el virus de la Peste Equina Africana**

Ignacio García-Pastor<sup>1\*</sup>, Kristine Klewer<sup>1</sup>, Océane Mercier<sup>1</sup>, Alix Carpentier<sup>1</sup>, Philippe Pourquier<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Innovative Diagnostics, IDvet, 310 rue Louis Pasteur, 34790 Grabels, France

\*ignacio.garciapastor@innovative-diagnostics.com

**Antecedentes.** La peste equina africana (PEA) es una enfermedad infecciosa de los équidos causada por el Orbivirus AHSV (familia Reoviridae), vectorizado por mosquitos Culicoides. La peste equina es endémica en el África subsahariana, pero se han producido brotes en muchos países ribereños del Mediterráneo (Marruecos, España, Portugal...), en Oriente Medio y en Asia. La peste equina está incluida en la lista de la OMAH; para los desplazamientos internacionales deben aplicarse las directrices para el reconocimiento oficial del estatus de libre de la enfermedad. La vacunación está prohibida en los países oficialmente libres.

**Objetivos:** El kit ELISA indirecto ID Screen® African Horse Sickness se ha desarrollado para detectar anticuerpos contra la proteína VP7, que se conserva entre los 9 serotipos del virus de la peste equina. El objetivo del estudio fue la evaluación de la especificidad y sensibilidad del ELISA.

**Diseño del estudio:** evaluación del ensayo.

**Métodos:** La especificidad y sensibilidad diagnósticas se evaluaron en 1015 sueros de animales no infectados (Francia, Brasil, Argentina, Islandia) y 26 sueros positivos de diferentes laboratorios de referencia (Laboratorio de Referencia UE/WOAH para la peste equina, España; Instituto Pirbright, Reino Unido; Instituto Friedrich-Loeffler, Alemania). Se analizaron muestras de suero de rumiantes infectados por el virus de la lengua azul o el virus de la enfermedad hemorrágica epizootica para comprobar su exclusividad.

**Resultados:** La especificidad observada del ELISA ID Screen® fue del 100% (IC 95% [99,6, 100,0], n=1015) y la sensibilidad diagnóstica observada fue del 100% (IC 95% [87,13, 100,0], n=26). Los sueros analizados en diluciones seriadas revelaron una excelente sensibilidad analítica. No se observó ninguna reacción cruzada con sueros positivos al VLA y al VEHE. La evaluación del ID Screen® ELISA fue realizada por el laboratorio de referencia EU/WOAH y confirmó las excelentes prestaciones del nuevo kit.

**Conclusión:** ID Screen® ELISA es una prueba fiable, robusta y fácil de usar para la detección de anticuerpos contra el VP7 del virus de la peste equina. Presenta una especificidad muy elevada y una excelente sensibilidad diagnóstica y analítica. La detección de anticuerpos VP7 es el método WOAH prescrito para demostrar la ausencia de infección, la estimación de la prevalencia y la vigilancia de un estatus libre de enfermedad.



## P22. Cuantificación de toxina B en cepas de *Clostridioides difficile* mediante un ELISA Sándwich

Daniela Tercero-Guerrero<sup>1</sup>, José L. Blanco<sup>1</sup>, Mercedes Domínguez<sup>2</sup>, Inmaculada Moreno<sup>2</sup>, Marta E. García<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, España

<sup>2</sup> Unidad de Inmunología Microbiana, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28222, Majadahonda, Madrid, España

\* megarcia@ucm.es

*Clostridioides (Clostridium) difficile* es una bacteria grampositiva y anaeróbica estricta, que posee la capacidad de formar esporas, permitiéndole sobrevivir en condiciones ambientales adversas. Este patógeno es la principal causa de diarrea asociada a antibióticos y nosocomial en humanos y, además, es un patógeno entérico significativo en muchas especies animales, principalmente en lechones. Su acción patógena esta mediada por la producción de las toxinas A (TcdA), B (TcdB) y binaria. Sin embargo, varios estudios han sugerido que la TcdB juega un papel predominante en la infección por *C. difficile* (CDI) debido a que es más tóxica para la línea celular HeLa (células epiteliales cervicales humanas), hasta 64 veces superior que la TcdA.

El objetivo del presente trabajo fue cuantificar la producción de TcdB en 23 aislados de la colección de cepas de *C. difficile* del grupo de investigación COVEMI de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Doce cepas fueron aisladas de animales y once provienen de muestras ambientales. El 86,95% de las muestras pertenecen al Secuencia Tipo (ST) 11, donde se encuentra el RT078, caracterizado por ser un ribotipo hipervirulento, asociado a CDI en animales y CDI comunitario en humanos.

El medio de cultivo de los clostridios estaba constituido por 30 g/L de triptona, 20 g/L de extracto de levadura, ZnCl<sub>2</sub> 5 mM y glucosa 10 mM en tampón de PBS 100 mM (pH 7,5). Al finalizar el cultivo en medio líquido se obtuvo el producto fin de fermentación que contenía las toxinas de *C. difficile*. Inmediatamente después del centrifugado y filtrado 0,45 µm de los sobrenadantes, estos se alicuotaron y se congelaron a -80°C.

La cuantificación de la TcdB en aislados de *C. difficile* se realizó mediante un ELISA Sándwich, utilizando como anticuerpo de captura y revelado un anticuerpo policlonal de conejo generado frente a una proteína recombinante (B-Tcd), diseñada a partir del dominio CROPs de la TcdB. El anticuerpo de revelado se marcó con HRP.

Los límites de detección y cuantificación del ELISA- Sándwich se determinaron al realizar la curva patrón con la B-Tcd y fueron de 0,033ng/ml y 0,92 ng/ml respectivamente. Atendiendo al límite de cuantificación establecimos que las muestras con concentraciones de TcdB por debajo de 1 µg/mL se considerarían negativas, entre 1 y 2 µg/mL dudosas y por encima de 2 µg/mL positivas.

Tras el análisis mediante el ELISA tipo sándwich de las 23 muestras determinamos que el rango de concentración de TcdB oscilaba entre 3,15- 514,76 µg/mL. Estos resultados subrayan la alta capacidad de producción de TcdB en cepas de *C. difficile*.

Financiación: Proyecto del Plan Nacional Referencia: PID2019-18071RR-C22.

## P23. Desarrollo de un nano-biosensor óptico para la detección de biomarcadores de tolerancia a la paratuberculosis

Rosa Casais<sup>1\*</sup>, Alejandra Isabel Navarro León<sup>1</sup>, Natalia Iglesias<sup>1</sup>, Susana Belen Bravo López<sup>2</sup>, Candela Melendreras<sup>3</sup>, Ana Soldado<sup>3</sup>, J.M. Costa-Fernández<sup>3</sup>, L.J. Royo<sup>4</sup>, Marta Alonso-Hearn<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, Centro de Biotecnología Animal del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), 33394, Gijón, Asturias

<sup>2</sup> Plataforma de Proteómica, Instituto de Investigación Sanitaria, Santiago de Compostela, La Coruña

<sup>3</sup> Departamento de Química Física y Analítica, Facultad de Química, Universidad de Oviedo, 33006, Oviedo, Asturias

<sup>4</sup> Departamento de Biología Funcional, Área de Genética, Universidad de Oviedo, 33006, Oviedo, Asturias

<sup>5</sup> Departamento de Sanidad Animal, NEIKER - Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 48160, Derio, Bizkaia

\* rosacg@serida.org

La identificación y cría selectiva de animales tolerantes a la paratuberculosis (PTB) bovina es una posible estrategia de control de la enfermedad. La tolerancia a la PTB es un mecanismo de defensa, determinado genéticamente, que disminuye la susceptibilidad del hospedador al daño tisular causado por *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Map), sin afectar a la carga del patógeno. El objetivo principal de este estudio es desarrollar un nano-biosensor para la detección de animales tolerantes a la PTB bovina. En primer lugar, se procedió a la identificación de biomarcadores de tolerancia a la PTB mediante análisis proteómico cuantitativo sin marcaje de muestras de suero y válvula ileocecal de animales con dos fenotipos de tolerancia: 1) animales con lesiones multifocales, con carga y sin signos clínicos y 2) animales con carga de Map pero sin lesiones histológicas asociadas a la infección. Las proteínas expresadas diferencialmente (ED) ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ) entre los grupos tolerantes y los grupos control se analizaron con STRING para generar redes de asociación de proteínas funcionales para identificar los mecanismos y los procesos biológicos clave para el desarrollo de la tolerancia a la PTB. Una vez identificadas, se seleccionaron varias proteínas ED en base a su "fold change", función biológica y localización celular para su validación mediante ELISA. El análisis ROC de los resultados obtenidos nos permitirá seleccionar el biomarcador con mejor sensibilidad y especificidad para el desarrollo del nano-biosensor y la identificación de animales tolerantes. El biomarcador seleccionado será la base para el desarrollo de un biosensor óptico basado en el cambio de color de las nanopartículas de oro (AuNPs) en función de su estado de agregación (rojo o azul). La propuesta biosensora, se basa en un ensayo competitivo de agregación/no-agregación, en el que será necesario funcionalizar una parte de las AuNPs, bioconjugándolas con el biomarcador y la otra con anticuerpos específicos frente a dicho biomarcador. Las AuNPs bioconjugadas con el anticuerpo se incuban primero con la muestra de suero. En un segundo paso, las AuNPs que han sido funcionalizadas con el biomarcador se añaden al ensayo. Si las muestras de suero no contienen biomarcador habrá reconocimiento Ac-biomarcador y las AuNPs se agregarán dando lugar a un color azul debido al efecto de resonancia de plasmón. Sin embargo, si las muestras de suero contienen biomarcador, este se unirá a las AuNPs bioconjugadas con anticuerpos evitando de este modo la interacción AuNPs-Ac con biomarcador-AuNPs, razón por la cual no tendrá lugar la agregación de las AuNPs, manteniéndose estas dispersas en la disolución, que será de color rojo. En la actualidad, se está trabajando de forma preliminar en la optimización del ensayo de agregación utilizando como modelo la proteína Glutación-S Transferasa (GST), probando distintos tamaños de AuNPs (15 y 25 nm), y distintas ratios de las AuNPs con la GST y con anticuerpos anti-GST en la bioconjugación (siguiendo la química de la carbodiimida). El desarrollo de este biosensor nos permitirá la detección de bovinos capaces de tolerar la presencia de Map sin comprometer ni su salud ni su producción lechera.

Financiación: este estudio forma parte del proyecto I+D+I (PID2021-122195OR-C22), financiado por el MCIN/AEI /10.13039/501100011033 / FEDER, UE y por los fondos regionales PCTI 2021-2023 (GRUPIN: IDI2021-000102)

## **P24. Detección simultánea de antígeno y anticuerpos frente al virus de la Peste porcina africana en un nuevo ensayo de flujo lateral en formato combo**

Cristina Aira<sup>1</sup>, Gabriela González-García<sup>1</sup>, Juan Martínez-Cano<sup>1</sup>, Nuria de la Roja<sup>1</sup>, Ana Ranz<sup>1</sup>, Monica Giammarioli<sup>2</sup>, Francesco Feliziani<sup>2</sup>, Žanete Šteingolde<sup>3</sup>, Jurate Buitkuvienė<sup>4</sup>, Petr Václavěk<sup>5</sup>, Dimitrije Glišić<sup>6</sup>, Carmina Gallardo<sup>7</sup>, Patricia Sastre<sup>1</sup>, Marga García-Durán<sup>1\*</sup>, Alba Fresco-Taboada<sup>1</sup> and Paloma Rueda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gold Standard Diagnostics Madrid S.A. (GSD Madrid), 28037, Madrid, Madrid

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati" (IZSUM), 06126, Perugia, Italy

<sup>3</sup> Institute of Food Safety, Animal Health and Environment "BIOR", LV-1076, Riga, Latvia

<sup>4</sup> National Food and Veterinary Risk Assessment Institute, 08409, Vilnius, Lithuania

<sup>5</sup> Department of Virology, State Veterinary Institute Jihlava, 58601, Jihlava, Czech Republic

<sup>6</sup> Virology Department, Institute of Veterinary Medicine of Serbia, 11000, Belgrade, Serbia

<sup>7</sup> European Union Reference Laboratory for African Swine Fever, Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA/CSIC), 28130, Madrid, Spain

\* marga.garcia@eu.goldstandarddiagnostics.com

**Antecedentes y objetivo.** La Peste porcina africana (PPA) es una enfermedad infecciosa que afecta al ganado porcino y a suidos salvajes. La enfermedad está causada por un virus envuelto de ADN de doble cadena perteneciente a la familia *Asfarviridae*, el virus de la PPA (vPPA). La infección por el vPPA se correlaciona con una amplia gama de síndromes clínicos que van desde una enfermedad casi inaparente hasta una fiebre hemorrágica con altas tasas de letalidad. Hasta la fecha, no se dispone de vacunas accesibles globalmente por lo que, ante la elevada transmisión actual del virus, el diagnóstico precoz sigue siendo la principal herramienta disponible para el control de la enfermedad.

Para identificar adecuadamente a los animales infectados, el diagnóstico en el punto de atención (POC) es crucial para asegurar un diagnóstico precoz y la rápida adquisición de medidas de bioseguridad. Para este fin, los ensayos de flujo lateral ofrecen ventajas como la velocidad en obtener los resultados y la posibilidad de realizarlo sin equipos ni formación específica, que los convierten en la mejor alternativa.

En este trabajo se muestra la validación en campo de una prueba rápida de flujo lateral para la detección conjunta de antígeno y anticuerpo del vPPA en tan solo 15 minutos.

**Materiales y Métodos.** El nuevo ensayo rápido está formado por la combinación de una tira para la detección de antígenos (mismo ensayo que producto INgezim® ASFV CROM Ag 2.0) y una tira para la detección de anticuerpos (mismo ensayo que producto INgezim® ASFV CROM Ab 2.0) dentro de un único casete *Combo*.

Para evaluar el funcionamiento de la detección combinada, se analizaron un total de 332 muestras de sangre positivas y 193 negativas recogidas de cerdo o jabalí. Todas las muestras evaluadas se recogieron en el campo durante diferentes campañas de vigilancia realizadas en Letonia, Lituania, República Checa y Serbia y fueron realizadas por los distintos laboratorios participantes del estudio. Estas muestras fueron previamente caracterizadas por PCR y serología (ELISA y/o IPT), y se separaron en grupos según su valor de Ct en PCR.

**Resultados.** La detección combinada de antígeno y anticuerpos mejoró el porcentaje de resultados positivos en todos los grupos analizados, con unos porcentajes de detección de entre el 100% y el 75% según la carga viral del animal. Además, la detección combinada permitió identificar 93 animales positivos que no mostraron un resultado positivo mediante PCR. Esta mejora fue más marcada para las muestras recogidas de jabalíes que en las de cerdos domésticos.

**Discusión y conclusión.** El nuevo ensayo combinado (INgezim® ASFV Combo CROM Ag/Ab) demostró ser una herramienta valiosa para la vigilancia de la PPA. Nuestros resultados apoyan la idea de que la detección combinada de antígeno/anticuerpo da información valiosa para un mejor control de la PPA, permitiendo la identificación de más animales infectados. Se observó una mayor mejoría en muestras recogidas de jabalíes debido, probablemente, al diferente enfoque de vigilancia (cadáveres/caza vs control de señales).

## **P25. Generación y uso de anticuerpos recombinantes en pruebas diagnósticas de sanidad animal**

Juan Martínez-Cano, Elena Soria, Ana Camuñas, Javier Sarraseca, Ángel Venteo, Silvia Collado, Paloma Rueda, Marga García-Durán\*

Gold Standard Diagnostics Madrid, 28037, Madrid

\* Marga.Garcia@eu.goldstandarddiagnostics.com

Los anticuerpos se utilizan de forma habitual como detectores en pruebas basadas en el inmunodiagnóstico. En comparación con los anticuerpos policlonales y monoclonales utilizados tradicionalmente para estos fines, los anticuerpos monoclonales recombinantes (rMab) ofrecen muchas ventajas porque se basan en una secuencia de ADN conocida y definida. Por tanto, su funcionalidad está garantizada, su producción industrial es altamente reproducible y pueden modificarse para mejorar sus aplicaciones posteriores. En este trabajo se muestra la adaptación de dos anticuerpos monoclonales, 1DB12 anti-TGEV y 2BD1 anti-gE ADV, al formato recombinante, ya que cada línea de hibridoma presentaba inicialmente problemas de producción. Los resultados demostraron que los nuevos anticuerpos funcionan tan bien como sus análogos derivados de hibridoma en los ELISAs de competición de los kits de diagnóstico animal originales. Para demostrarlo se extrajo ARN de muestras de líneas de hibridoma y las cadenas variables de anticuerpos se amplificaron por RT-PCR utilizando una mezcla específica de cebadores degenerados. Las secuencias se clonaron en formato scFv-Fc, se transfectaron en cultivos celulares de HEK293 en suspensión y los rMab se purificaron mediante columnas de proteína A. Los rMab se marcaron con peroxidasa y se diluyeron según los requisitos de la prueba de diagnóstico. Se analizaron paneles de sueros positivos y negativos con los tests ELISA INgezim CORONA DIFERENCIAL 2.0 e INgezim ADV gE PLUS originales y, en paralelo, se utilizaron los mismos tests pero sustituyendo el anticuerpo original por el rMab. La clasificación de 206 sueros de animales con patologías porcinas analizados con el kit INgezim CORONA DIFERENCIAL 2.0 dio como resultado 103 positivos a coronavirus, 27 positivos a PRCV, 74 positivos a TGEV y 2 dudosos; cuando se utilizó el rMab sólo varió la clasificación de 2 sueros obteniéndose 75 positivos a TGEV y 1 dudoso. Por otro lado, el análisis de 176 sueros con el test INgezim ADV gE PLUS original dio como resultado 13 positivos a ADV, 156 negativos y 7 dudosos; al utilizar el rMab se obtuvieron 12 positivos, 161 negativos y 3 dudosos, es decir, 10 sueros cambiaron su clasificación, pero en todos los casos estaban en el valor límite de su clasificación. En resumen, ambos rMab mostraron una elevada concordancia con la prueba de referencia tanto en DO (Densidad Óptica) como en clasificación. Las diferencias están relacionadas con pequeños cambios en el porcentaje de competición que pueden resolverse fácilmente mediante el ajuste fino de los controles ELISA. Los resultados obtenidos en la prueba final demuestran su aplicabilidad al kit comercial definitivo, incorporando las ventajas de una mayor reproducibilidad entre lotes.

## P26. Solución diagnóstica completa para la monitorización de la Enfermedad Hemorrágica Epizoótica

Cristina Aira<sup>1</sup>, Sonia Hernández-Antón<sup>1</sup>, Marga García-Durán<sup>1\*</sup>, María Ángeles Risalde<sup>2</sup>, Paloma Rueda<sup>1</sup>, Alba Fresco-Taboada<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gold Standard Diagnostics Madrid S.A. (GSD Madrid), 28037, Madrid, Madrid

<sup>2</sup> Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Toxicología, Grupo de Investigación GISAZ, UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, Universidad de Córdoba, 14004 Córdoba, Spain

\* [marga.garcia@eu.goldstandarddiagnostics.com](mailto:marga.garcia@eu.goldstandarddiagnostics.com)

**Antecedentes y objetivos** La enfermedad hemorrágica epizoótica (EHE) es una enfermedad no contagiosa de los rumiantes salvajes y domésticos transmitida por mosquitos del género *Culicoides*. En los cérvidos suele provocar niveles de mortalidad, mientras que en los bovinos se suelen observar infecciones menos graves. El agente causal es el virus de la EHE (vEHE), perteneciente a la misma familia de los *Orbivirus* que el virus causante de la enfermedad de la lengua azul (vLA) o de la Peste equina africana (AHSV). Los primeros casos en Europa se notificaron en otoño de 2022, y, desde entonces, los brotes han aumentado mostrando un importante impacto en el ganado bovino. La evolución que tendrá esta enfermedad no está clara, aunque los expertos sugieren que podría ser similar a la del vLA en Europa.

Para responder a estos brotes, en este trabajo se muestra el desarrollo de un diagnóstico completo para la vigilancia y monitorización de la EHE.

**Materiales y métodos.** En este trabajo, se muestra el desarrollo de un ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra el vEHE y dos ensayos de flujo lateral para la detección de antígeno y anticuerpos. El ELISA se desarrolló en un formato de bloqueo utilizando placas recubiertas de VP7 y un anticuerpo monoclonal que demostró ser específico para el vEHE (sin reacciones cruzadas con el vLA o AHSV). El nuevo ELISA se evaluó con un total de 626 muestras de suero y se validó para su uso con muestras de sangre de papel de filtro. En cuanto a los LFA, se ha realizado una evaluación analítica y en los próximos meses se evaluará su comportamiento en muestras de campo.

**Resultados.** El ELISA de bloqueo mostró una sensibilidad del 99,7 % entre las 304 muestras positivas analizadas. Además, se ha analizado un total de 81 muestras de ganado recogidas en paralelo como sangre fresca y en papel de filtro. Este estudio mostró los mismos parámetros de diagnóstico independientemente del método de muestreo utilizado. Para evaluar la especificidad del ELISA, se evaluaron 98 muestras de campo negativas de bovinos, cérvidos, ovinos y caprinos, y 24 muestras de bovinos recogidas de animales infectados por el virus de la lengua azul. El ELISA mostró una especificidad del 100%.

La evaluación analítica del ensayo rápido de antígeno mostró un límite de detección de 5 ng/tira y mostró un reconocimiento específico del vEHE. Por otro lado, el ensayo rápido para la detección de anticuerpos detectó todos los serotipos analizados (1, 2, 4-6 y 8) y mostró una buena caracterización inicial de las 15 muestras positivas y 15 muestras negativas evaluadas.

**Discusión y conclusión.** Estos resultados indican que el ELISA es una buena herramienta para el seguimiento de la evolución de la enfermedad y, gracias a la extracción de sangre con papel de filtro, puede aplicarse fácilmente al seguimiento de la fauna salvaje. El panel de muestras se ampliará en los próximos meses. Además, los ensayos rápidos desarrollados pueden ayudar en la investigación de campo de los brotes de EHE.

## **P27. Papel del ovino como hospedador del serotipo 8 del virus de la Enfermedad hemorrágica epizootica que circula en España desde 2022**

Marta Valero-Lorenzo<sup>1</sup>, Cristina Tena-Tomás<sup>2</sup>, Jorge Morales-Bello<sup>1</sup>, David Romero-Trancón<sup>1</sup>, María José Ruano<sup>1\*</sup>, Cristina Cano-Gómez<sup>1</sup>, Ana López-Herranz<sup>1</sup>, Antonio Fernández<sup>2</sup>, José Ignacio Varo<sup>1</sup>, Montserrat Agüero<sup>1</sup> y Rubén Villalba<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Central de Veterinaria, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 28110 Algete, Madrid, España

<sup>2</sup> Tecnologías y Servicios Agrarios, S.A. (TRAGSATEC), 28037 Madrid, España

\* mruanor@mapa.es

La Enfermedad hemorrágica epizootica es una enfermedad vírica infecciosa no contagiosa producida por un virus del género Orbivirus, del que se han descrito siete serotipos (1, 2 y del 4 al 8), y transmitida a través de diferentes especies de dípteros del género Culicoides. Afecta tanto a rumiantes domésticos como salvajes, especialmente a bovinos y ciervos. Su presencia en Europa se notificó por primera vez en Italia en noviembre de 2022, producida por una cepa viral del serotipo 8, y unos días después en España donde se extendió muy rápidamente en 2023. A pesar de la amplia circulación del virus por todo el país, no se observaron signos clínicos en ovino. La susceptibilidad de esta especie y su papel en la transmisión del virus pueden ser claves en el control de la enfermedad.

Se analizaron muestras de suero y sangre con EDTA de 2.051 ovejas pertenecientes a 14 explotaciones, sin signos clínicos, en áreas afectadas, mediante ELISA para detección de anticuerpos específicos y RT-PCR específica de serogrupo para detección de genoma viral, respectivamente. Además, se infectaron experimentalmente cinco ovejas con una cepa del serotipo 8 del virus de la enfermedad hemorrágica epizootica aislada de un bovino afectado en España en 2022, y las muestras de suero y sangre con EDTA, tomadas a diferentes días post-infección, se analizaron usando los mismos métodos.

Los resultados de las muestras de campo mostraron que la oveja es una especie susceptible, ya que se detectaron resultados positivos en 8 granjas. El 12% de las muestras fueron positivas por ELISA y el 10,7 % por RT-PCR (valor medio de Ct 29,5±3,3). Las prevalencias intra-explotación fueron variables en función de la zona y en general más bajas que en bovino. En los animales experimentalmente infectados, no se observaron signos clínicos ni aumento de la temperatura en ningún animal. Se detectó el genoma del virus en sangre con EDTA en 3 de las 5 ovejas entre 3 y 7 días post-infección (Cts > 30), y tres de ellas seroconvirtieron a partir del día 7 post-infección.

Tanto los datos de campo como los experimentales confirman una susceptibilidad reducida de las ovejas a la infección con esta cepa, lo que sugiere que los ovinos pueden no estar involucrados en la transmisión o tener un papel secundario.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).

## **P28. Evaluación de la protección y la interferencia diagnóstica de vacunas basadas en inactivación por calor y fagos y una cepa viva atenuada en cabritos frente a la tuberculosis animal**

Leire Fernández-Veiga<sup>1\*</sup>, Miguel Fuertes<sup>1</sup>, María V. Geijo<sup>1</sup>, Elena Molina<sup>1</sup>, Maddi Oyanguren<sup>1</sup>, David Sánchez-Martel<sup>1</sup>, Marta Barral<sup>1</sup>, Natalia Elguezabal<sup>1</sup>, Adrián Ramos<sup>2</sup>, Yvonne Espada<sup>2</sup>, Cristian Melgarejo<sup>3,4</sup>, Enric Vidal<sup>3,4</sup>, Gareth J. Jones<sup>5</sup>, Ramón A. Juste<sup>1</sup>, Bernat Pérez de Val<sup>3,4</sup>, Joseba M. Garrido<sup>1</sup>, Iker A. Sevilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 48160, Derio, Bizkaia

<sup>2</sup> Departament de medicina i Cirujia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Catalonia

<sup>3</sup> Unitat mixta d'investigació IRTA-UAB en Sanitat Animal. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA). Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193, Bellaterra, Catalonia.

<sup>4</sup> IRTA. Programa de Sanitat Animal. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA). Campus de la UAB, 08193, Bellaterra, Catalonia

<sup>5</sup> Department of Bacteriology, Animal and Plant Health Agency (APHA), KT15 3NB, Surrey, United Kingdom

\*lfernandez@neiker.eus

La tuberculosis animal es una enfermedad zoonótica causada por los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, siendo *M. bovis* y *M. caprae* las especies más relevantes en Europa. En España, el ganado caprino es el mayor reservorio de *M. caprae*, pero este patógeno ha saltado a otras especies, incluyendo vacas, ovejas, conejos, jabalíes, ciervos y zorros, además de humanos. La enfermedad provoca importantes pérdidas de producción, aumento de la mortalidad y restricciones de movimiento y comercio en los sistemas ganaderos. Además del control basado en diagnóstico, la vacunación representa una valiosa herramienta que podría ayudar a reducir la propagación y el mantenimiento de la enfermedad en diferentes especies y entornos, siempre y cuando no interfiera con las técnicas de diagnóstico. En este estudio evaluamos la capacidad protectora y la posible interferencia diagnóstica de una vacuna de *M. bovis* inactivada por calor (HIMB), otra de *M. caprae* (PIMC) inactivada por fagos y otra de *M. microti* viva (LMM). Se utilizó un grupo de cabritos (n=6) por cada vacuna y se incluyó un grupo control sin vacunar. Las vacunaciones tuvieron lugar 7 semanas (S) antes del desafío (S-7). Todos los animales fueron desafiados por vía intratraqueal con una cepa de *M. caprae* la semana 0 (S0) y se sacrificaron 9-10 semanas después (S9). Se tomaron muestras de sangre en S-7, S-3, S0, S3, S5, S7 y S9 para la detección de anticuerpos mediante ELISA frente a MPB70&83 en plasma y de producción de interferón-γ (IGRA) en sangre estimulada con los antígenos oficiales (PPD-B y PPD-A) y otros alternativos (P22 y los basados en ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c, PCL y FP). En los muestreos S-7, S0 y S9, también se analizó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la fagocitosis de neutrófilos y monocitos mediante citometría de flujo, los niveles de lactato y la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano en sangre entera (MGIA). En S9, se llevó a cabo la prueba de intradermorreacción con los mismos antígenos usados en IGRA, y posteriormente, tras el sacrificio, se caracterizó la patología (incluyendo tomografía computerizada de pulmón) y la carga bacteriana (en 3 lotes de nódulos linfáticos) de cada grupo. Entre los resultados más relevantes, cabe destacar que: i) a diferencia del resto de prototipos, la vacunación con LMM no generó títulos significativos de anticuerpos, manteniéndose así incluso tras el desafío. ii) todas las vacunas fueron compatibles con el diagnóstico IGRA utilizando los antígenos definidos FP y PCL. iii) la carga bacteriana fue menor en todos los grupos vacunados en comparación con el control, especialmente en el lote respiratorio del grupo HIMB. iv) el cuadro patológico fue más leve en los grupos vacunados que en el control, particularmente, en los pulmones del grupo LMM. Estos prometedores resultados animan a continuar optimizando los prototipos y los protocolos de administración en busca de una vacuna compatible con las técnicas de diagnóstico que ofrezca una gran protección.

Financiación: PID2019-105155RB-C33 y PID2022-142939OR-C21 subvencionado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y "FEDER Una forma de hacer Europa". EFA115/01 INNOTUB II INTERREG-POCTEFA 2021-2027.

## **P29. Inmunidad entrenada: una nueva aproximación para el control de *Streptococcus suis***

Teresa García-Seco<sup>1\*</sup>, Andrea Pérez-Domingo<sup>1</sup>, Aránzazu Buendía<sup>1</sup>, Lidia Sánchez-Morales<sup>1,2</sup>, Fátima Cruz<sup>1</sup>, Carmen Herranz<sup>1</sup>, Marta Díaz de Frutos<sup>1,2</sup>, Mercedes Domínguez<sup>3</sup>, Leydis Zamora<sup>3</sup>, Inmaculada Moreno<sup>3</sup>, Lucas Domínguez<sup>1,2</sup>, Marta Pérez-Sancho<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, España

<sup>2</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, España

<sup>3</sup> Unidad de Inmunología Microbiana, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220, Majadahonda, España

\* [teresagsr@visavet.ucm.es](mailto:teresagsr@visavet.ucm.es)

*Streptococcus suis* es un agente zoonótico responsable de grandes pérdidas económicas en la producción porcina, generando sepsis y meningitis en cerdos. La limitación de vacunas eficaces y universales y la emergencia de resistencias frente a diferentes antibióticos han requerido la búsqueda de nuevas estrategias para el control de este patógeno. La inmunidad entrenada (IE) es el proceso mediante el cual algunas células del sistema inmune innato, como monocitos y macrófagos, experimentan cambios metabólicos y epigenéticos tras ser expuestas a ciertos estímulos (como el Bacilo de Calmette-Guérin-BCG), que incluyen un aumento en la glicólisis y una mayor producción de citoquinas proinflamatorias. Esto genera una respuesta inmunitaria más rápida y eficiente ante futuras infecciones. La protección asociada a la IE ha demostrado su eficacia frente a diferentes agentes bacterianos y víricos en modelo ratón, si bien la información sobre su efecto frente a *S. suis* es prácticamente inexistente.

Este estudio evalúa el impacto de la IE inducida por un inmunomodulador bacteriano (derivado de BCG de origen porcino) en la protección frente a *S. suis* en ratones C57/BL6 a través del estudio de la capacidad fagocítica de dicha bacteria presente en sangre completa de los individuos. Se trabajó con cuatro grupos de 8 animales cada uno: A (derivado BCG vivo vía intravenosa 1 dosis, aplicada el día 0 + inmunización frente a *S. suis*, un complejo proteico de *S. suis* y un adyuvante en base agua-aceite, vía intraperitoneal el día 40), B (derivado BCG inactivado vía oral 2 dosis, aplicadas los días 0 y 21 + inmunización frente a *S. suis* el día 40), C (inmunización frente a *S. suis* el día 40) y D (control sin tratamiento).

El día 60 se tomó una muestra de sangre completa de cada animal y se inoculó con una dosis conocida de *S. suis*. Tras incubarse 2 horas a 37°C, se realizó el cultivo de la muestra en agar sangre para estimar la concentración final de *S. suis* mediante recuento de colonias tras 24 horas de incubación a 37°C.

El grupo A mostró concentraciones de *S. suis* sensiblemente menores que el grupo D control (media UFC *S. suis*/mL sangre grupo A vs. media grupo D:  $6,7 \times 10^5$  vs.  $1,2 \times 10^6$  UFC *S. suis*/mL sangre), sugiriendo que el inmunomodulador vivo intravenoso otorga a las células del sistema inmune periférico una mejor capacidad de control de la infección por *S. suis*. Sin embargo, no se observaron diferencias en las concentraciones de *S. suis* en los grupos B y C respecto al grupo D, sugiriendo: i) la limitación de la inmunización frente a *S. suis* para inducir una mejora de la capacidad fagocítica por sí misma y ii) la restricción del inmunomodulador inactivado vía oral para mejorar la respuesta fagocítica en el modelo empleado. Por tanto, es necesario realizar más estudios para determinar con precisión la eficacia de la vía de administración y de la cepa inmunomoduladora (concentración, número y frecuencia de dosis...), caracterizando la IE mediante diversos marcadores, dada la complejidad de evaluación de este tipo de respuesta.

Financiación: Proyecto PID2020-112966RB-I00 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033.



### **P30. La vacunación contra la paratuberculosis activa mecanismos de inmunidad entrenada que pueden inducir protección contra otros patógenos**

Maitane Mugica<sup>1</sup>, Elena Molina<sup>1</sup>, Maddi Oyanguren<sup>1</sup>, Marivi Geijo<sup>1</sup>, Ainara Badiola<sup>1</sup>, Joseba M. Garrido<sup>1</sup>, Natalia Elquezabal<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, NEIKER - Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 48160, Derio, Bizkaia

\* nelquezabal@neiker.eus

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) es el agente etiológico causante de la paratuberculosis, una enteritis granulomatosa crónica severa que afecta a rumiantes en todo el mundo, generando grandes pérdidas económicas. Aunque la vacunación está limitada en muchos países, se ha propuesto como una medida coste-beneficio eficaz contra la paratuberculosis (PTB). Además, una vacuna inactivada de Map (IMV) ha mostrado protección heteróloga y características que sugieren inmunidad entrenada en estudios de campo. El objetivo de este trabajo es demostrar, mediante ensayos funcionales y análisis epigenéticos, que esta vacuna activa mecanismos de inmunidad entrenada en terneras. Para evaluar y comparar las respuestas inmunes innatas específicas y no específicas, se incluyeron en el estudio terneras vacunadas (n=5) y no vacunadas (n=5) de 15 días de edad. Las terneras vacunadas mostraron un aumento significativo en la actividad fagocítica y en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediada por neutrófilos, cuantificada por citometría de flujo uno, dos y tres meses post-vacunación, mientras que el ROS mediado por monocitos aumentó significativamente solamente a los 3 meses post-vacunación. La liberación de trampas extracelulares de neutrófilos, observada mediante análisis de imágenes *in vivo*, aumentó en los terneros vacunados tras 2 horas de estimulación con Map, *Mycobacterium bovis*-BCG, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y este incremento se mantuvo tras 4 horas de estimulación con BCG y *S. aureus*. Un aumento en los niveles de lactato a lo largo del tiempo, con valores más altos en el grupo vacunado, especialmente 3 meses post-vacunación, confirmó un cambio metabólico. En conjunto, estos resultados sugieren que la IMV induce inmunidad entrenada, con activación de células innatas mantenida durante al menos tres meses post-vacunación, pendiente de la confirmación completa con los resultados de ChIPseq sobre la acumulación de H3k4me3 en los promotores de genes relacionados con la inmunidad entrenada.

Financiación: Proyecto PID2021-125807OB de investigación financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por la Unión Europea NextGenerationEU/PRT. Ayudas para el Programa Predoctoral de Formación de Personal Investigador no Doctor del Departamento de Educación del Gobierno Vasco

### **P31. Efectos inmunomoduladores de un probiótico solo y en combinación con la vacunación frente a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***

Maddi Oyanguren<sup>1</sup>, Elena Molina<sup>1</sup>, Maitane Mugica<sup>1</sup>, Rakel Arrazuria<sup>1\*</sup>, Selvakumar Subbian<sup>2</sup>, Jose Luis Lavin<sup>3</sup>, Juan Anguita<sup>4,5</sup>, Natalia Elguezabal<sup>1</sup>

<sup>1</sup> NEIKER – Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (BRTA). Departamento de Salud Animal, 48160 Derio, España.

<sup>2</sup> Public Health Research Institute (PHRI), New Jersey Medical School, Rutgers University, Newark, Nueva Jersey, EE. UU.

<sup>3</sup> NEIKER – Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (BRTA). Departamento de Matemáticas Aplicadas, 48160 Derio, España.

<sup>4</sup> Laboratorio de Inflamación y Plasticidad de Macrófagos, CIC bioGUNE, Alianza Vasca de Investigación y Tecnología (BRTA), Derio, España.

<sup>5</sup> Ikerbasque, Fundación Vasca para la Ciencia, Bilbao, España.

\* rakel.araazuria@neiker.eus

La falta de un tratamiento eficaz para la paratuberculosis (PTB), causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), hace necesario buscar terapias alternativas o complementarias. La PTB ha sido vinculada con la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), una condición para la cual el tratamiento con probióticos es prometedor. En algunos estudios, además, los probióticos han demostrado mejorar la inmunidad específica de vacunas. En este trabajo, hemos estudiado el efecto de la vacunación sola (CV: vacuna inactivada de Map), de un probiótico solo (PR: *Dietzia*) y de ambos combinados (CV-PR) antes de la infección con Map en un modelo de conejo para evaluar la protección y determinar si *Dietzia* potencia la inmunidad de la vacuna. Se realizó histología de los tejidos, secuenciación del gen ribosomal 16S y el análisis de la expresión de citoquinas para evaluar los cambios en la microbiota y la respuesta inmunitaria en el tejido linfóide asociado al intestino (GALT).

La administración de probiótico disminuyó las citoquinas proinflamatorias (IL6, IL1 $\beta$ , TFG- $\beta$ ), pero aumentó la carga de Map en GALT, sugiriendo que el tratamiento fue perjudicial para el hospedador en las condiciones evaluadas. Los animales tratados con el probiótico (PR y CV-PR) mostraron los mayores índices de lesiones en tejido, sin embargo, debido al perfil inmunológico observado creemos que las lesiones observadas son debidas al tratamiento con el probiótico. La carga bacteriana en los grupos CV y CV-PR fueron similares indicando que ambos tratamientos son igual de efectivos en la eliminación de la infección, es decir, el papel de la vacunación en eliminación de la infección parece que prevalece sobre los efectos inmunomoduladores del probiótico.

Respecto a la microbiota, la frecuencia relativa de algunos grupos taxonómicos varió en función del tratamiento administrado/intervención. En el grupo PR, se observó una reducción de la abundancia relativa *Christensenellaceae R-7*, cuya disminución también se ha observado en pacientes con EII. El grupo CV mostró un aumento de abundancia relativa de *Ruminococcaceae*, *Christensenellaceae R-7* y *Oxalobacter*, indicando que puede haber una modulación positiva de la microbiota intestinal que favorece la reducción de la respuesta inflamatoria. En el grupo CV-PR, se observó que la abundancia relativa del género *Butyricoccus*, que ha demostrado tener una actividad antiinflamatoria, era mayor en comparación con el resto de los grupos. Estos resultados indican que *Dietzia* puede modificar el perfil inmunológico generado por la vacunación, pero no se podría justificar la administración junto con la vacunación, ya que no aumenta la eficacia de la vacuna. Además, pone de relieve la complejidad de las interacciones microbianas y la necesidad de optimizar las combinaciones de tratamientos en el contexto de cada enfermedad y especie animal.

Financiación: Este estudio ha contado con el apoyo del Gobierno de España a través de los proyectos de investigación PROBAK (RTA 2017-00089-00-00) y PARAINVAX (PID 2021-125807OB-C22) y del Departamento de Industria, Transición Energética y Sostenibilidad del Gobierno Vasco.

### **P32. Relación inversa entre la positividad a *Trichomonas* spp. por qPCR y la aparición de placas en la cavidad oral del águila de Bonelli (*Aquila fasciata*) en libertad**

Alberto Alvarado-Piqueras<sup>1\*</sup>, Rocío Fernández-Valeriano<sup>1</sup>, María Teresa Gómez<sup>2</sup>, Gonzalo Huerta-Casado, Marta Torrijos-Moya<sup>1</sup>, Ariadna Apruzzese<sup>1</sup>, Fernando González<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> GREFA (Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat). Carretera Monte del Pilar s/n, 28220 Majadahonda, Madrid. España

<sup>2</sup> Universidad Complutense, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal. Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid. España

<sup>3</sup> Universidad Complutense, Facultad de Veterinaria, Departamento de Farmacología y Toxicología. Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid. España

\*alberto@grefa.org

La tricomonosis, una enfermedad infecciosa de gran relevancia en aves silvestres, está causada mayoritariamente por el protozoo *Trichomonas gallinae*. Afecta principalmente a las vías digestivas superiores, provocando la aparición de placas necróticas en la cavidad oral que pueden conducir a la muerte del ave infectada. Dada la importancia ecológica de las aves silvestres en diversos ecosistemas, el estudio de esta enfermedad se vuelve crucial para la gestión de la dinámica de estas poblaciones. Aunque la tricomonosis es ampliamente conocida en aves domésticas, su impacto en aves silvestres, en particular en el águila de Bonelli, aún es motivo de estudio. Tiene especial importancia en pollos y jóvenes, cuyo sistema inmune no está completamente desarrollado.

En el presente estudio, llevado a cabo por GREFA (Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat), se realizaron chequeos sanitarios a 95 pollos de águila de Bonelli (*Aquila fasciata*) de entre 30 y 55 días de edad, en nidos ubicados en diversas provincias de la península ibérica, tomando muestras para analizar la presencia de este parásito. Este trabajo revisa los resultados de los hisopados de cavidad oral analizados mediante PCR en tiempo real (qPCR), junto con la aparición de lesiones en la cavidad oral y su relación con otras variables biológicas, como el sexo o la localización del nido.

Los resultados reflejaron una relación inversa entre la aparición de lesiones en la cavidad oral y la carga parasitaria (valor Ct) a *Trichomonas* spp. por qPCR. Además, se descartó cualquier asociación entre el sexo del ejemplar, la localización del nido, la presencia de lesiones en la cavidad oral y el número de Ct.

Este estudio, enmarcado en el proyecto AQUILA a-LIFE, subraya la importancia de la vigilancia sanitaria, la investigación y el papel esencial del veterinario en la salud de las aves rapaces, en concreto del águila de Bonelli, para promover su conservación.

Financiación: Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Transición Ecológica y Reto Demográfico, aunque no expresa necesariamente la opinión del Ministerio.

### **P33. Detección de *Leishmania infantum* en conejos silvestres en zonas de fuera del brote de la Comunidad de Madrid**

Alejandro Navarro<sup>1\*</sup>, Irene Martínez<sup>1</sup>, Soledad Crespo<sup>2</sup>, Andrés Iriso<sup>3</sup>, Nerea García<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Servicio NED, Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET. Universidad Complutense Madrid. Avenida Puerta de Hierro, s/n. 28040 Madrid. España

<sup>2</sup> Unidad de Inmunología Microbiana del CNM, ISCIII. Ctra. Majadahonda Pozuelo Km 2 28220 Majadahonda, España

<sup>3</sup> Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid. Ronda de Segovia 52 1ª Planta 28005 Madrid

<sup>4</sup> Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense Madrid. Avenida Puerta de Hierro, s/n. 28040 Madrid. España

\* angomez@ucm.es

La leishmaniosis es una de las enfermedades vectoriales más importantes a nivel mundial. Está causada por un protozoo intracelular del género *Leishmania* que se transmite fundamentalmente por insectos flebotomos y que puede afectar diversas especies de mamíferos, incluido el hombre. Se trata de una enfermedad endémica en muchos países, entre los que se encuentran los de la Cuenca Mediterránea. Se han descrito distintos hospedadores del parásito, siendo el reservorio principal el perro. Sin embargo, otros animales silvestres se han destacado como reservorios competentes de la enfermedad en años recientes. Así, en el caso del brote de la Comunidad de Madrid (CM) que se inició en el año 2009 se puso en relevancia la importancia de los lepóridos (liebres y conejos) en un nuevo ciclo de transmisión selvático siendo los principales reservorios y el origen de su transmisión a los humanos. Además, en estudios recientes en otras zonas de España, Italia y Grecia destacan la presencia de este parásito en lepóridos silvestres en áreas no asociadas a brotes.

En los animales silvestres la infección por *Leishmania* cursa generalmente de manera asintomática, por lo que suele pasar desapercibida y es necesario la realización de distintas técnicas laboratoriales para detectarla. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia del parásito en conejos en áreas no asociadas al brote de la CM comparando distintas muestras y metodologías.

Se analizaron muestras de piel de la zona auricular y exudado de hígado de 100 animales recogidos en tres zonas situadas fuera del brote y divididas en zona norte, sur y oeste de la CM. En las muestras de exudado de hígado se detectó la presencia de anticuerpos mediante una técnica *in house* de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), mientras que las muestras de piel fueron analizadas mediante PCR según las condiciones descritas por Cruz *et al.* 2002. El método de extracción utilizado para las muestras de piel fue el kit *Blood and Tissue* (Qiagen). Para los análisis estadísticos se utilizó en programa WinPepi.

En las muestras de piel analizadas se obtuvo un porcentaje de positividad del 27,0% (95% IC 19,3 – 36,4%), siendo del 10,0% (95% IC 5,52 – 17,4%) en las muestras de exudado analizadas mediante IFI. El 17,2% (95%, 7,60%-34,5%) de los individuos fueron positivos en ambas muestras. Los resultados obtenidos en los porcentajes de positividad de los distintos sexos y edad (jóvenes vs adultos) de los animales fueron similares. Por último, en lo que se refiere a las distintas zonas estudiadas (norte, sur y oeste) se detectó la presencia del parásito en torno al 20% de los animales estudiados procedentes de las zonas norte y sur mientras que este porcentaje se elevó a más del 40% en el caso de los animales procedentes de la zona oeste. Todos los resultados obtenidos han sido evaluados siguiendo una interpretación sensible de los mismos.

Los resultados muestran, de acuerdo con estudios previos, que los conejos silvestres se encuentran frecuentemente infectados por *Leishmania*. Además, también se evidencia, en concordancia con otros autores, que la piel es una muestra excelente para detectar *Leishmania*, mejor que la muestra de exudado de hígado y de más fácil obtención. Además, en 2024 un estudio de Martín-Sánchez y col. en conejos del suroeste de España se relacionó la carga parasitaria en la piel de la oreja con la incidencia de casos en humanos de la misma zona, por lo que podría ser un indicador de posibles futuros casos. Asimismo, el detectar animales positivos en distintas zonas de la CM, ya sin relación con la zona del brote, sugiere la proliferación de conejos infectados por *Leishmania* por toda el área, siendo más importante en la zona oeste, lo que sugiere que se debería incidir en una mayor vigilancia en estas zonas.

Financiación: Contrato: "Análisis para la vigilancia y el control en la Comunidad de Madrid de las zoonosis en fauna silvestre y otros agentes infecciosos transmitidos por vectores". Comunidad d Madrid.



## P34. Identificación de garrapatas en fauna silvestre del País Vasco y su asociación parásito-hospedador

Leire Intxausti<sup>1</sup>, Jesús F. Barandika<sup>2</sup>, Xeider Gerrikagoitia<sup>2</sup>, Ane Arraibi-Larrea<sup>3</sup>, Ana L. García-Pérez<sup>2</sup>, Marta Barral<sup>2</sup>, Aitor Cevidanes<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Veterinaria, Universidad CEU Cardenal Herrera, Valencia

<sup>2</sup> Departamento de Sanidad Animal. NEIKER- Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario. Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio, Bizkaia

<sup>3</sup> Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Bizkaia, Diputación Foral de Bizkaia, Gorniz, Bizkaia

\* [acevidanes@neiker.eus](mailto:acevidanes@neiker.eus)

Las garrapatas (subclase *Acari*, orden *Ixodida*) son ectoparásitos hematófagos de gran importancia en la transmisión de patógenos de interés en sanidad animal y salud pública. Conocer estas asociaciones parásito-hospedador es fundamental para entender las dinámicas de transmisión de patógenos y desarrollar programas de control más efectivos, que mitiguen el riesgo tanto para los animales como para las personas. Este estudio se centra en las especies de garrapatas presentes en fauna silvestre del País Vasco, con el objetivo de identificar las especies y estadios de desarrollo de las garrapatas recolectadas y evaluar la relación entre los hospedadores y las garrapatas encontradas.

Los datos fueron recopilados desde 2019 hasta 2024, mediante estudios pasivos de recolección de garrapatas en animales silvestres realizadas en el marco del Plan de Vigilancia Sanitaria de Fauna Silvestre y con la colaboración del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Bizkaia. Las muestras se identificaron mediante claves taxonómicas usando microscopía estereoscópica.

Se recogieron garrapatas de 137 animales silvestres (20 aves y 117 mamíferos), identificándose un total de 929 garrapatas pertenecientes a 9 especies. En las aves se identificaron 3 especies de garrapatas, mientras que en los mamíferos 9, siendo *Ixodes ricinus* la especie más prevalente en ambos grupos de animales. Cabe destacar la clara asociación de *I. ricinus* con los corzos, liebres y ginetas, mientras que los zorros presentaron infestación tanto de *I. ricinus* como de *Ixodes hexagonus*. Junto con los zorros, otros mamíferos también nidícolas como erizos y tejones presentaban mayoritariamente *I. hexagonus*. La especie más común en jabalí fue *Dermacentor reticulatus*. Cabe destacar que no se ha identificado ninguna garrapata del género *Hyalomma*.

Los datos reflejan el hecho de que la ecología de las garrapatas revela una clara división en sus estrategias de vida, las cuales se pueden clasificar en exófilas o no-nidícolas, y endófilas o nidícolas. Las garrapatas exófilas, como *I. ricinus*, predominan en hábitats abiertos como bosques, mientras que las especies endófilas, como *I. hexagonus*, se asocian con hospedadores que viven en madrigueras o nidos. La fauna silvestre juega un papel clave en el ciclo de garrapatas y se observa una asociación de unas especies de garrapatas con algunas especies de hospedadores.

Dada la importancia del diagnóstico laboratorial en la identificación precisa de ectoparásitos y su asociación con los hospedadores, la colaboración entre laboratorios e instituciones implicadas en gestión y conservación de fauna silvestre puede facilitar una mejor comprensión de las dinámicas ecológicas entre garrapatas y hospedadores, lo que contribuirá a optimizar estrategias de vigilancia, control y prevención, fortaleciendo así el enfoque "One Health" en la gestión de la salud animal.

Financiación: Departamento de Alimentación, Desarrollo Rural, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco; proyecto EFA100/01 PYRTICK cofinanciado por la Unión Europea a través del Programa Interreg VI-A España-Francia-Andorra (POCTEFA 2021-2027). AC disfruta de una beca postdoctoral 'Ramón y Cajal' RYC2021-033084-I financiada por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por la European Union NextGeneration EU/PRTR NextGenerationEU/PRTR

### **P35. Estudio de *Mycoplasma agassizii* en poblaciones de Tortuga mora (*Testudo graeca*) de la isla de Mallorca**

Beatriz Sánchez-Ferreiro<sup>1</sup>, Laura Ballesteros<sup>2</sup>, Ugo Mameli<sup>1</sup>, Jessica Solá<sup>1</sup>, Nieves Negre<sup>1</sup>, Alicia Aranaz<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Recuperación de Fauna Silvestre, Consorci per a la Recuperació de la Fauna de les Illes Balears (COFIB), 07142, Mallorca

<sup>2</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria UCM, 28040, Madrid

\* alaranaz@ucm.es

La tortuga mora (*Testudo graeca*) es una de las dos especies de tortuga terrestre presentes en España. Actualmente es una especie catalogada como vulnerable a nivel nacional, existiendo únicamente tres poblaciones, localizadas en el Parque Nacional de Doñana, en el Sureste peninsular y en la isla de Mallorca.

El Centro de Recuperación de Fauna Silvestre (COFIB) de Mallorca recibe un número elevado de ingresos de esta especie, la mayoría procedentes de cautividad. En estos individuos es frecuente observar un cuadro clínico compatible con el complejo rinitis-estomatitis, una de las principales enfermedades de la tortuga mora, en la que puede estar implicado el género *Mycoplasma* (destacando la especie *Mycoplasma agassizii*), así como otros agentes. Esta patología podría perjudicar a las poblaciones naturales de tortuga mora, reduciendo su población, junto con la degradación y fragmentación del hábitat. Los tratamientos antibióticos no consiguen eliminar a *M. agassizii*, por lo que las tortugas afectadas quedan como portadoras asintomáticas, hecho que pasa desapercibido por la sintomatología clínica intermitente, pero es relevante desde el punto de vista epidemiológico, ya que condiciona los proyectos de reintroducción en el hábitat para reforzar la población natural.

El objetivo de este estudio fue la evaluación de una prueba de diagnóstico rápida y sencilla para determinar la presencia de *M. agassizii* y *M. testudineum* mediante la detección directa del material genético del patógeno, y así facilitar la toma de decisiones informadas sobre el futuro de los animales positivos.

Las muestras se tomaron por hisopado de la cavidad oro-nasal de una selección de animales (muestreo de conveniencia,  $n=31$ ), organizados con fines prácticos en grupos según procedencia (cautividad o silvestre), estado clínico en el momento de la toma de muestras, y contacto previo con individuos con signos clínicos compatibles con rinitis. El trabajo laboratorial consistió en la extracción de ADN directamente de las muestras y la detección por PCRs específicos de género y especie.

*M. agassizii* fue detectado en 26 de los 31 ejemplares muestreados, tanto en animales con cuadro clínico evidente como en individuos asintomáticos, describiendo la alta prevalencia de este patógeno en tortuga mora. Respecto a los animales procedentes de cautividad ( $n=28$ ) se detectó en 8/9 con signos clínicos (secreción nasal en las primeras 48 horas tras su ingreso), y en 15/19 aparentemente sanos, sin signos clínicos, siendo más frecuente en el grupo de tortugas que habían tenido contacto previo con individuos enfermos (9/10), que en tortugas sin este contacto previo (6/9). También se detectó ADN de *M. agassizii* en los tres animales de origen silvestre, aparentemente sanos. No se aprecia asociación respecto al sexo, edad o condición corporal (índice de Jackson), y muy ligera respecto a la procedencia geográfica de los individuos.

Este estudio subraya la necesidad de investigaciones sobre la rinitis crónica, para establecer nuevas recomendaciones aplicables a la gestión y manejo de animales con infección clínica y subclínica (portadores inaparentes) que contribuyan a la conservación de la especie.

Financiación: Departamento de Sanidad Animal (UCM) y COFIB.

### **P36. Estudio de la infección por microsporidios en micromamíferos en España: evidencia de diseminación extraintestinal de *Enterocytozoon bieneusi* y predominio de la infección por genotipos infrecuentes de *Encephalitozoon cuniculi***

Lourdes Castro<sup>1</sup>, Maria Rebollo<sup>1</sup>, Sergio Sánchez<sup>1</sup>, Fátima Vioque<sup>1</sup>, Mónica Santín<sup>2</sup>, Pamela C. Köster<sup>1,3,4</sup>, Jesus T. García<sup>5</sup>, Begoña Bailo<sup>1</sup>, Pedro P. Olea<sup>6,7</sup>, Fernando Arce<sup>8</sup>, Francisco Ruiz-Fons<sup>5</sup>, Javier Viñuela<sup>5</sup>, Carmen Chicharro<sup>1,9</sup>, Javier Nieto<sup>1,9</sup>, David González-Barrio<sup>1</sup>, David Carmena<sup>1,9</sup>, Alejandro Dashti<sup>1</sup>, Guillermo A. Cardona<sup>10\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, España

<sup>2</sup> Environmental Microbial and Food Safety Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Beltsville, Maryland, USA

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Alfonso X El Sabio (UAX), Villanueva de la Cañada, Madrid, España

<sup>4</sup> Fundación Mujeres por África, Madrid, España

<sup>5</sup> Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC), (CSIC-UCLM-JCCM), Ciudad Real, España

<sup>6</sup> Departamento de Ecología, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Campus de Cantoblanco, Madrid, España

<sup>7</sup> Centro de Investigación en Biodiversidad y Cambio Global (CIBC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Campus de Cantoblanco, Madrid, España

<sup>8</sup> School of Natural Sciences, University of Tasmania, Hobart, TAS, Australia.

<sup>9</sup> CIBER Infectious Diseases (CIBERINFEC), Health Institute Carlos III, Madrid, Spain.

<sup>10</sup> Laboratorio Agropecuario, Diputación Foral de Álava, Vitoria-Gasteiz, España

\* gcardona@araba.eus

**Introducción:** Los microsporidios constituyen un grupo diverso de parásitos emergentes, intracelulares y formadores de esporas que infecta a una amplia variedad de hospedadores animales incluyendo al hombre. Aunque es bien conocido el papel de los micromamíferos como reservorios de distintos patógenos zoonóticos, el conocimiento actual de la epidemiología de los microsporidios en particular en micromamíferos silvestres es muy limitado.

**Objetivos:** Determinar la prevalencia, variabilidad molecular, potencial zoonótico y capacidad de diseminación extraintestinal de las especies de microsporidios de mayor relevancia en salud pública y sanidad animal.

**Métodos y Resultados:** Se analizaron muestras de bazo de 398 individuos de 6 especies de micromamíferos procedentes de cinco bioregiones españolas para detectar la presencia de los microsporidios *Enterocytozoon bieneusi* y *Encephalitozoon* spp. utilizando métodos moleculares (PCR y secuenciación de Sanger). Se detectó la presencia de ADN de microsporidios en el 7.0% (28/398; IC del 95%: 4.7–10.0) de las muestras, tratándose de infecciones por *Encephalitozoon* spp. en el 6.0% (24/398; IC del 95%: 3.9–8.8) y *E. bieneusi* en el 0.8% (3/398; IC del 95%: 0.2–2.2) de las muestras. En una muestra adicional se detectó una co-infección por *Encephalitozoon* spp. y *E. bieneusi* (0.3%, 1/398; IC del 95%: 0.01–1.4). Según la especie hospedadora, las infecciones por *Encephalitozoon* spp. se detectaron en *Microtus arvalis* ( $n = 22$ ) y *Apodemus sylvaticus* ( $n = 2$ ), y las infecciones por *E. bieneusi* en *Microtus arvalis* ( $n = 1$ ) y *Apodemus sylvaticus* ( $n = 2$ ). La co-infección por *Encephalitozoon* spp. y *E. bieneusi* se detectó asimismo en la especie *Microtus arvalis*. Los análisis de secuencias permitieron identificar todos los aislados de *Encephalitozoon* spp. como *E. cuniculi*. Entre ellos, se identificó mayoritariamente el genotipo zoonótico IV ( $n = 17$ ), además del genotipo I ( $n = 2$ ) e infecciones mixtas por los genotipos I y IV ( $n = 4$ ) y por el genotipo IV y un posible genotipo nuevo (denominado tentativamente genotipo V;  $n = 2$ ). Por su parte, entre los aislados de *E. bieneusi* sólo se identificó el genotipo zoonótico C ( $n = 2$ ).

**Conclusiones:** Estos resultados indican que los micromamíferos silvestres son reservorios de especies/genotipos de microsporidios zoonóticos. Aunque la capacidad de diseminación extraintestinal de *Encephalitozoon cuniculi* es ampliamente conocida, éste es uno de los pocos estudios basados en técnicas moleculares que demuestra que la infección por *E. bieneusi* también puede alcanzar localizaciones extraintestinales, en concreto el bazo. No obstante, es necesario profundizar en las implicaciones biológicas y clínicas de este hallazgo. Por otro lado, este estudio describe por primera vez la presencia del genotipo IV de *E. cuniculi* en fauna



silvestre, en general, y en micromamíferos, especialmente de la especie *Microtus arvalis*, en particular, donde presenta una elevada tasa de infección. Así mismo, este estudio aporta la primera descripción a nivel mundial del que debe considerarse como genotipo V de *E. cuniculi*.

Financiación: Ministerio de Ciencia e Innovación (CGL2011-30274, CGL2015-71255-P, CGL2017-89866-R y E-RTA-2015-0002- C02-02), Fundación BBVA (TOPIGEPLA convocatoria 2014) e Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Ministerio de Economía y Competitividad (PI19CIII/00029).



### **P37. El lobo gris (*Canis lupus*) es un reservorio natural de parásitos microeucariotas intestinales de relevancia en salud pública en el suroeste de Europa**

Lourdes Castro<sup>1</sup>, Sheila Ortega<sup>1</sup>, Ana M. Figueiredo<sup>2</sup>, Barbara Moroni<sup>3</sup>, Alejandro Dashti<sup>1</sup>, David Cano-Terriza<sup>4,5</sup>, Moisés González<sup>4,6</sup>, Álvaro Oleaga<sup>7</sup>, Carlos Martínez-Carrasco<sup>6</sup>, Roser Velarde<sup>8</sup>, Rita T. Torres<sup>2</sup>, Eduardo Ferreira<sup>2</sup>, Dário Hipólito<sup>2,9</sup>, Tânia Barros<sup>2</sup>, Ana Lino<sup>2</sup>, Serena Robetto<sup>3,10</sup>, Luca Rossi<sup>11</sup>, Ignacio García-Bocanegra<sup>4,5</sup>, David Carmena<sup>1,5</sup>, Guillermo A. Cardona<sup>12\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, España

<sup>2</sup> Departamento de Biología e Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, Aveiro, Portugal

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZSPLV), Torino, Italia

<sup>4</sup> Departamento de Sanidad Animal, Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Zoonosis (GISAZ), Unidad de Investigación Competitiva de Zoonosis y Enfermedades emergentes (ENZOEM), Universidad de Córdoba, Córdoba, España

<sup>5</sup> CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

<sup>6</sup> Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Murcia, Murcia, España

<sup>7</sup> Sociedad de Servicios del Principado de Asturias S.A. (SERPA), Gijón, España

<sup>8</sup> Grup de Recerca en Ecologia y Salut de la Fauna Salvatge (WEH) y Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFaS), Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España

<sup>9</sup> Veterinary Biology Unit, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

<sup>10</sup> Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Animali Selvatici (CeRMAS), Quart (AO), Italia

<sup>11</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Torino, Italia

<sup>12</sup> Laboratorio Agropecuario, Diputación Foral de Álava, Vitoria-Gasteiz, España

\* gcardona@araba.eus

**Introducción:** Las infecciones por parásitos microeucariotas intestinales son causa significativa de morbilidad e incluso mortalidad asociadas a diarrea tanto en el hombre como en animales domésticos, aunque el papel de la fauna silvestre en su epidemiología está comparativamente poco estudiado.

**Objetivos:** Investigar la frecuencia, diversidad genética y potencial zoonótico de las principales especies de microeucariotas de importancia en salud pública y sanidad animal en distintas poblaciones de lobo gris (*Canis lupus*) en libertad en el suroeste de Europa.

**Métodos y Resultados:** En este estudio retrospectivo se analizaron muestras fecales individuales obtenidas a partir de necropsias o en el transcurso de muestreos de campo en España ( $n = 225$ ), Portugal ( $n = 43$ ) e Italia ( $n = 47$ ) durante el período 2011–2023. Todas las muestras analizadas presentaron una apariencia y consistencia normales, descartando con ello la existencia de diarrea en los individuos muestreados. Siempre que fue posible, en la toma de muestras se recopilaron datos epidemiológicos complementarios. La detección de los patógenos de interés (*Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* sp., *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp.) se llevó a cabo mediante métodos moleculares (PCR y secuenciación Sanger). *Giardia duodenalis* fue el microeucariota más frecuentemente encontrado (40.3%, 127/315; IC 95%: 34.9–46.0), seguido de *Cryptosporidium* spp. (3.5%, 11/315; IC 95%: 1.8–6.2), *Enterocytozoon bieneusi* y *Encephalitozoon* spp. (1.6%, 5/315; IC 95%: 0.5–3.7 cada uno). No se detectó la presencia de *Blastocystis* sp. en ninguna de las muestras analizadas. Los análisis de secuencias confirmaron la presencia del genotipo D (adaptado a cánidos) entre las muestras positivas a *G. duodenalis* ( $n = 7$ ). Se identificaron tres especies de *Cryptosporidium*: *C. canis* (adaptada a cánidos,  $n = 9$ ), *C. parvum* (zoonótica,  $n = 1$ ) y *C. hominis* (antroponótica,  $n = 1$ ). Entre los microsporidios, se identificó el genotipo PtEb IX de *E. bieneusi*, adaptado a cánidos. Dos muestras positivas a *Encephalitozoon* spp. fueron identificadas como *Enc. intestinalis* y otras tres como *Enc. cuniculi*, en concreto del genotipo IV. Ésta es la primera referencia a nivel mundial a la presencia de *Enc. intestinalis* y *Enc. cuniculi* en el lobo gris.

**Conclusiones:** Pese a su aparentemente escasa o nula repercusión clínica, las infecciones sub-

clínicas o asintomáticas por microeucariotas intestinales son frecuentes en las poblaciones de lobo gris estudiadas en el suroeste de Europa. Como consecuencia, en estas zonas, los lobos pueden contribuir a la contaminación ambiental por estos patógenos mediante la eliminación fecal de sus estadios transmisibles (quistes, ooquistes, esporas), que son potencialmente infectivos para el hombre. En particular, las personas en contacto cercano con cadáveres de lobos o sus heces, principalmente cazadores, agricultores, ganaderos o veterinarios, conforman un grupo de especial riesgo.

Financiación: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Ministerio de Economía y Competitividad (PI19CIII/00029). Centro de Estudios do Ambiente e do Mar (CESAM), Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) y Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES) (UIDP/50017/2020 + UIDB/50017/2020 + LA/P/0094/2020). CIBER-Consortio Centro de Investigación Biomédica en Red (CB 2021/13/00083), ISCIII, Ministerio de Ciencia e Innovación/European Union-NextGenerationEU.



### **P38. Desarrollo de un método de cromatografía ultrarrápida acoplado a espectrometría de masas (triple cuádruplo) para la determinación de 55 antihelmínticos (Avermectinas y Bencimidazoles)**

Fidel Ortega Gavilán<sup>1\*</sup>, Antonio López Mariscal<sup>1</sup>, Ramón Checa Moreno<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Análisis Químico de Residuos del Laboratorio Central de Sanidad Animal, Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Camino del Jau s/n, 18320, Santa Fe, Granada

\*rcheca@mapa.es

Los antihelmínticos (avermectinas y bencimidazoles) son sustancias ampliamente utilizadas para el tratamiento de infecciones por vermes o helmintos parasitarios en animales destinados a la producción de alimentos. El uso indiscriminado de estas sustancias puede hacer que sus residuos se introduzcan en la cadena alimentaria suponiendo un riesgo para la salud humana. Además, su uso generalizado y prolongado podría dar lugar a la aparición de resistencias por los organismos a combatir. Por todo ello, la Unión Europea (UE) tiene regulado su uso en animales destinados a la producción de alimentos a través del Reglamento 2010/37 en el cual se establecen los límites máximos de residuo aplicables en diferentes especies y matrices.

El Laboratorio Nacional de Referencia de Santa Fe tiene encomendada a través del Real Decreto 1749/1998 entre otras la función del desarrollo de metodologías analíticas susceptibles de poder identificar y confirmar la presencia de cualquier sustancia farmacológicamente activa que pueda estar presente en matrices de origen animal destinadas a la producción de alimentos, así como en el agua de bebida y los piensos.

Los métodos basados en cromatografía permiten la separación de sustancias aprovechando sus diferentes propiedades físico-químicas mientras que la espectrometría de masas permite tanto su identificación inequívoca a nivel molecular como su cuantificación.

En el presente trabajo se ha desarrollado un método analítico basado en cromatografía de líquidos ultrarrápida acoplada a espectrometría de masas para la determinación de 55 antihelmínticos (avermectinas y bencimidazoles). La separación cromatográfica se llevó a cabo en un equipo UPLC EXION LC Series empleando como fase estacionaria una columna de fase inversa C18 (ACQUITY UPLC BEH C18 1.7  $\mu$ m (2.1 mm x 100 mm) y como fase móvil un gradiente variable de formiato amónico 1mM y 0.16% ac. fórmico (fase A) y acetonitrilo con un 0.1 % de ac. fórmico a un caudal de 0.5 ml/min. El sistema se acopló a un espectrómetro de masas SCIEX Triple Quad™ 7500 – QTRAP donde en la fuente de ionización por electrospray se fue alternando el modo positivo y negativo de ionización de acuerdo con el esquema de monitorización de reacción múltiple (MRM).

Con este método se consiguió una separación adecuada de los 55 antihelmínticos en 17 min, lo que permite su aplicación al análisis residuos de este tipo de sustancias en diversas matrices de origen animal con límites de detección en disolución variando entre 1,5 y 200  $\mu$ g/l; para los analitos más sensibles como el triclabendazol y para analitos con menor sensibilidad como el monepantel, respectivamente. Además, la separación conseguida permite cumplir con los requisitos establecidos en el Reglamento 2021/808 en lo referente a la separación cromatográfica, así como con los criterios de confirmación por espectrometría de masas.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). F. Ortega Gavilán fue financiado por una beca de formación práctica para titulados universitarios, en el ámbito de los laboratorios de sanidad animal, de genética molecular y de sanidad vegetal, dependientes de la Dirección General de Sanidad de la Producción Agroalimentaria y Bienestar Animal (Orden APA/1340/2022).

## **P39. Estudio de la prevalencia de endoparásitos en bovinos de la raza autóctona mantequera leonesa**

Cristina Falagán<sup>1</sup>, Julio Benavides<sup>2</sup>, Miguel Fuertes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24007, León

<sup>2</sup> Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-ULE. Grulleros. 24346, León

\* mfuef@unileon.es

Este estudio investiga la prevalencia e intensidad de eliminación de endoparásitos en ganado bovino de la raza autóctona mantequera leonesa, considerando la estación del año, la edad de los animales y el efecto de los tratamientos farmacológicos profilácticos administrados a lo largo del año. Durante el invierno de 2023 y la primavera de 2024, se recogieron 147 muestras de heces de 131 bovinos de la raza mantequera leonesa procedentes de 4 explotaciones de sistema extensivo localizadas en León, España. Los animales se dividieron en 4 grupos según su edad: terneros (hasta 12 meses), jóvenes (de 13 a 36 meses), adultos (de 37 a 72 meses) y viejos (mayores de 72 meses). Se realizó una caracterización cualitativa y cuantitativa de las formas parasitarias encontradas mediante las técnicas coprológicas de flotación, sedimentación y migración larvaria. Todas las granjas fueron positivas a alguna forma parasitaria, con una prevalencia general del 74,15% entre las 147 muestras analizadas. La presencia de huevos en las muestras estudiadas fue más prevalente en los nematodos (55,78%), seguidos por los coccidios (31,97%), trematodos (21,77%) y cestodos (6,12%). Los coccidios presentaron las cifras más altas de excreción, seguidos por los nematodos, trematodos y cestodos. Los hallazgos revelaron variaciones significativas en la intensidad de eliminación de los parásitos, relacionadas con la estación del año y con la edad del hospedador. Además, se observó un escaso efecto de los tratamientos farmacológicos profilácticos sobre de la carga parasitaria y la prevalencia de las diferentes parasitosis, aunque no se pudo concluir si se debió a un fallo en la administración, a la aparición de resistencias parasitarias o a otra causa. No obstante, la baja carga parasitaria de los animales infectados que actúan como portadores puede favorecer el desarrollo de una inmunidad de rebaño, haciendo poco necesarios y rentables los tratamientos profilácticos en esta raza rústica tan adaptada al entorno en el que se cría. En este primer estudio realizado para determinar el estado parasitológico de los bovinos de raza Mantequera Leonesa se destaca la importancia del control regular de los endoparásitos mediante técnicas coprológicas y el manejo racional de los antiparasitarios en función de los resultados de sus resultados, siempre siguiendo un enfoque One Health.

Estudio financiado por el Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Ministerio para la Transición Ecológica y Reto Demográfico. Ref.: 17223013.

## **P40. ¿Interactúan la dopamina y las hormonas esteroideas ováricas durante el periodo luteal en yeguas Pura Raza Española?**

Katy Satué<sup>1\*</sup>, Gemma Velasco<sup>1</sup>, Ester Fazio<sup>2</sup>, Pietro Medica<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad CEU-Cardenal Herrera, Valencia, España

<sup>2</sup> Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias y Experimentales. Universidad Católica de Valencia "San Vicente Mártir"

\*ksatue@uchceu.es

La actividad ovárica, incluido el desarrollo folicular, la ovulación y la esteroidogénesis, está regulada por el sistema nervioso simpático (SNS) (Ojeda y Lara, 1989; Rodovalho-Callegari et al., 2022). Estudios in vitro (Miszkiel y Kotwica, 2001) e in vivo (Blum et al., 2005; Piccinato et al., 2012) documentaron que las catecolaminas y principalmente la noradrenalina (NA) prolongan la vida del cuerpo lúteo (CL) y aumentan la síntesis de progesterona (P4). Esta evidencia ha sido demostrada en ratas sometidas a condiciones de estrés agudo, en las que las catecolaminas amplifican el aumento preovulatorio de la hormona luteinizante (LH) y consecuentemente la producción de P4 (Rodovalho-Callegari et al., 2022). Sin embargo, la posible relación entre NA y P4 en la yegua sigue siendo desconocida. Por este motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar la interrelación entre NA y P4 durante el periodo lúteo en la yegua Pura Raza Española. Este estudio se llevó a cabo en 24 yeguas Pura Raza Española sanas con edades comprendidas entre 4 y 17 años. El ciclo, incluyendo el desarrollo folicular, la ovulación y el posterior desarrollo del CL, se monitorizaron mediante ultrasonido (SonoSite, 180-Plus; SonoSite Inc., EE. UU.). Se extrajeron muestras de sangre el día +5 del diestro. Las concentraciones circulantes de NA se determinaron mediante EIA-Technical 3-CAt EIA (Demeditec Diagnostics GmbH, Alemania) y las concentraciones de P4 mediante un método de radioinmunoensayo (RIA) de I-125 en fase sólida (Coat-a-Count Progesterone, Diagnostic Products Co., Los Ángeles, LA, EE. UU.), ambos específicamente validados para la especie equina. Las concentraciones de NA y P4 fueron  $75,9 \pm 27,7$  ng/ml y  $12,2 \pm 5,53$  ng/ml, respectivamente. Ambos parámetros no se correlacionaron. Los resultados de este estudio muestran que, aunque la NA puede estar implicada en la función ovárica durante el ciclo estral, el periodo de dominancia P4 no representa una etapa presumiblemente caracterizada por la estimulación del SNS en la yegua Pura Raza Española.

## **P41. ¿Afecta la condición corporal al metabolismo lipídico en yeguas gestantes?**

Katy Satué<sup>1\*</sup>, Gemma Velasco<sup>1</sup>, Ester Fazio<sup>2</sup>, Pietro Medica<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Veterinaria. Universidad CEU-Cardenal Herrera, 46115-Alfara del Patriarca, Valencia, España. <sup>2</sup> Departamento de Ciencias Veterinarias, Unidad de Fisiología Veterinaria, Universidad de Messina, Via Palatucci, 98168 Messina, Italia

\*ksatue@uchceu.es

La hiperlipemia es un síndrome metabólico que afecta a la especie equina, si bien, alcanza mayor prevalencia en ponis, caballos miniatura y burros (Firshman and Valberg, 2007). La gestación y la obesidad son factores predisponentes (Mendoza et al., 2018). Recientemente, se han descrito casos de hiperlipemia en yeguas españolas al final de la gestación (Rodríguez et al., 2006). Se analizaron los cambios producidos en las concentraciones de lípidos en sangre y otros parámetros bioquímicos en yeguas Pura Raza Española (PRE) de diferente condición corporal (CC) con la finalidad de valorar si la CC pudiera estar relacionada con el desarrollo de hiperlipemia en yeguas gestantes. Se extrajeron muestras de sangre venosa de 20 yeguas PRE adultas mensualmente durante la gestación, siempre antes de la ingestión de alimentos y en horario de mañana. Los animales fueron sometidos a las mismas prácticas de manejo. La gestación se dividió en tres períodos: los dos primeros de 3 meses de duración cada uno y el último período desde el 7º mes hasta el momento del parto. Basado en la clasificación de la CC en équidos según la bibliografía las yeguas se dividieron en dos grupos: A (CC 5-6/9; N=10) y B (CC 8/9; N=10). Las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (TG), colesterol total (COL), HDL-COL, proteínas totales (PT), albúmina (ALB), urea (BUN) aumentaron significativamente durante el periodo II. En comparación con las yeguas del grupo B, las del grupo A mostraron mayores concentraciones de TG, COL y HDL-COL y menores concentraciones de TP y BUN en el periodo I, mayores concentraciones de COL y menores concentraciones de HDL-COL en el periodo II y menores concentraciones de BUN en el periodo III. En conclusión, aunque se encontró un aumento significativo en las concentraciones circulantes de TG en las yeguas gestantes con los valores superiores en los animales con mayor CC, no se alcanzaron cifras que pudieran informar de hiperlipemia en este grupo de animales.

## **P42. Cuantificación de IgA específicas frente a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en contenido yeyunal en un modelo experimental caprino de paratuberculosis**

Miguel Criado<sup>1,2</sup>, Marta Silva<sup>1,2</sup>, Pedro Mendivil<sup>1,2</sup>, David Zapico<sup>1,2</sup>, Valentín Pérez<sup>1,2</sup>, Julio Benavides<sup>2\*</sup>, Jose Espinosa<sup>1,2</sup>, Natalia Elguezabal<sup>3</sup>, Daniel Gutiérrez-Expósito<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana, 24071, León

<sup>2</sup> Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-ULE. Grulleros. 24346, León

<sup>3</sup> Departamento de Sanidad Animal, NEIKER- Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 48160 Derio, Bizkaia

\* julio.benavides@csic.es

La inmunidad de mucosas tiene especial importancia en enfermedades digestivas o respiratorias, siendo la inmunoglobulina A (IgA) un componente esencial de la misma. Sin embargo, aún existen numerosas incógnitas en el papel que desempeñan en enfermedades tan relevantes como la paratuberculosis de los rumiantes, asociada a la infección oral por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), especialmente en ganado caprino. Además, se desconoce la influencia que pueda tener la vacunación frente a esta enfermedad sobre la producción IgA específicas en intestino. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido cuantificar las IgA frente a Map presentes en el contenido yeyunal de animales vacunados y/o infectados experimentalmente con Map, modificando para ello una prueba ELISA comercial.

En este estudio se emplearon muestras de contenido yeyunal de 28 cabras procedentes de un proyecto de investigación encaminado a evaluar la eficacia de dos vacunas experimentales frente a PTB. Los grupos fueron los siguientes: vacuna intradérmica ( $n = 6$ ), vacuna oral ( $n = 6$ ), vacuna comercial (Gudair®) ( $n = 6$ ) y animales sin vacunar ( $n = 10$ ). Un mes tras la vacunación, 3 animales de cada grupo vacunado y 7 del grupo no vacunado fueron desafiados con Map. Tras 10 meses, todos los animales fueron sacrificados para su estudio *post mortem* y toma de muestras. Con el fin de determinar los niveles de IgA, se analizó contenido yeyunal empleando un kit comercial ELISA (ID Screen® Paratuberculosis Indirect), sustituyendo el anticuerpo secundario anti-IgG de rumiantes, por un anticuerpo anti-IgA de cabra.

Los resultados del estudio muestran que, a los 11 meses post vacunación, y en ausencia de infección, ninguna de las vacunas empleadas inducía un nivel de IgAs específicas yeyunales significativamente diferente del grupo control (no vacunado/no infectado). En los animales infectados, se cuantificaron niveles medios de IgA significativamente elevados ( $p > 0.01$ ) con respecto a los no infectados, sin que se apreciase ningún efecto claro de la vacunación, o ausencia de ella. Dentro de los animales infectados, al agrupar los resultados en función del tipo de lesión que presentaban (independientemente de la vacuna empleada) a nivel de las placas de Peyer del yeyuno distal, el nivel de IgAs fue más elevado en los animales con lesiones más graves (multifocales o difusas). Esta producción podría estar inducida por la abundancia de antígenos de Map en la matriz extracelular, que sería mayor en animales con estas lesiones. En este sentido, se observó una correlación positiva entre los niveles de IgA con la carga bacteriana de Map (cuantificada mediante qPCR) en este tejido y en heces. Esto sugiere que, al igual que ocurre con la respuesta humoral periférica, la producción de IgA en mucosa intestinal parece estar ligada al avance de la infección y, con ello, a la gravedad lesional y carga bacteriana en intestino. Esta sencilla técnica diagnóstica modificada ha permitido profundizar en el estudio de la respuesta inmunitaria local frente a Map.

Financiación: Este trabajo fue financiado por los proyectos RTI2018-099496-B-I00 y PID2021-125807OB-C21 de la "Agencia Estatal de Investigación", del Ministerio de Ciencia e Innovación de España. Miguel Criado Boyero agradece la concesión de una beca predoctoral (PRE2019-087309) del MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y del FSE "El FSE invierte en tu futuro".



# AVEDILA

XXVII Simposio Nacional  
Bilbao, 13-14 noviembre 2024

Organiza:



Patrocina:

