



XXVI

SIMPOSIO AVEDILA

Elche - Orihuela 19 a 21 noviembre 2023

Programa y Resúmenes



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA



Asociación De Especialistas En Diagnóstico Laboratorial Veterinario

<https://simposioavedila2023.com/>



Patrocinadores y Colaboradores	2
Comités	3
Agradecimientos.....	4
Horario del Simposio.....	5
Información General	6
Programa Cultural.....	7
Programa	9
Ponencias Invitadas.....	17
Comunicaciones Orales.....	51
Comunicaciones Póster.....	95
Índice de Autores.....	171
Mención Honorífica.....	174



Patrocinadores y colaboradores





Comité Científico

- Dr. Jose Luis Blanco Cancelo
Universidad Complutense
- Dra. M^a Luz Roche Julián
Unidad Análisis Sanidad Animal
- Dr. Antonio Martínez-Murcia
Universidad Miguel Hernández
- Dr. Joseba Garrido Urkullu
Neiker - Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario
- Dra. Montserrat Agüero
Laboratorio Central de Veterinaria-Sanidad Animal. Algete
- Dra. Beatriz Romero Martínez
Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET)
- Dra. M^a José Cubero Pablo
Universidad de Murcia
- Dr. Tomás Mayoral Ortega
Secretaría General de Universidades Ministerio de Universidades
- Juan Angel Diaz de Tuesta
Laboratorio Regional de Sanidad Animal

Comité Organizador

- Dr. Antonio Martínez Murcia
Universidad Miguel Hernández
- Dr. Aaron Navarro García
genetic PCR solutions™
- Gema Bru Amoraga
genetic PCR solutions™
- Jose Antonio Serrano Canals
genetic PCR Solutions™

La organización de la XXVI edición del Simposio Nacional AVEDILA -*Asociación de Especialistas en Diagnóstico Laboratorial Veterinario*- ha significado una gran satisfacción para nosotros y, por la concesión de esta oportunidad, deseamos expresar gratitud a la Asamblea de AVEDILA celebrada durante el simposio celebrado en Pamplona, el 7 de noviembre de 2019.

Nuestro agradecimiento más destacable se dirige a todos los participantes de este simposio que, aun salvando las dificultades que sufrimos todos, han contribuido con su presencia a hacer posible el proyecto. En particular, a los investigadores más jóvenes que han realizado el esfuerzo para traer sus comunicaciones y llevarán gran parte del peso de las sesiones científicas, otro de nuestros objetivos.

En la elaboración de nuestro plan y logística hemos venido siempre cogidos de la mano de las instituciones anfitrionas, la Universidad Miguel Hernández, el Excmo. Ayuntamiento de Elche y el Excmo. Ayuntamiento de Orihuela, por la prestación de infraestructuras que avalan con garantía la consecución del programa propuesto.

Y fundamental ha sido el haber podido contar con la colaboración de instituciones tan reputadas como el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Laboratorios de Algete, Madrid; y de Santa Fe, Granada); el Centre de Recerca en Sanitat Animal (IRTA-CRESA); y otros miembros de la Red de Investigación en Sanidad Animal (RISA) como NEIKER y SERIDA y también al Colegio Oficial de Veterinarios de Alicante y al Colegio Oficial de Veterinarios de Murcia. Destacamos nuestro agradecimiento al Centro de Congresos Ciudad de Elche por su colaboración y al Colegio Diocesano Santo Domingo de Orihuela por brindarnos la generosa oportunidad de utilizar sus históricas y emblemáticas instalaciones.

El peso de la secretaría y organización del congreso ha recaído sobre nuestra empresa de base tecnológica Genetic Analysis Strategies S.L. (con la marca GPS™, genetic PCR solutions™), a la que el presidente de este comité desea expresar sincera gratitud.

El Comité Organizador

DOMINGO 19

18:30 – 20:00	Entrega de documentación
20:00 – 20:30	Inauguración Oficial
20:30 – 21:00	Comunicación Inaugural y Premio Avedila
21:00	Coctel de Bienvenida

LUNES 20

08:30 – 10:00	Sesión I – Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación - MAPA
10:00 – 11:00	Comunicaciones Orales
11:00 – 11:30	Pausa – Café, Presentación de posters con presencia de autores
11:30 – 12:30	Sesión II – Red de Investigación en Sanidad Animal - RISA
12:30 – 13:30	Presentación de empresas colaboradoras
13:30 – 14:30	Comida de Trabajo
14:30 – 15:30	Asamblea General AVEDILA
15:30 – 16:00	Pausa – Café, Presentación de posters con presencia de autores
16:15	Salida autobuses. Visita Orihuela
21:00	Cena claustro Universidad Histórica (S. XVI)

MARTES 21

08:30 – 09:30	Comunicaciones Orales
09:30 – 10:30	Sesión III – Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria - VISAVET
10:30 – 11:00	Pausa – Café, Presentación de posters con presencia de autores
11:00 – 11:35	Comunicaciones Orales
11:35 – 13:00	Sesión IV – Colegios veterinarios de Alicante y Murcia
13:00 – 13:30	Conferencia de Clausura
13:30 – 14:00	Acto de Clausura: Entrega de Premios y Vino Español



Ciudad de Elche



1. Centro de Congresos Ciudad de Elche
2. Hotel Huerto del Cura
3. Hotel Port Jardín Milenio
4. Hotel Elche Centro Affiliated by Meliá
5. Parada Bus estación AVE

Radio Taxi: 965 42 77 77

Orihuela histórica

Universidad S.XVI. Una de las primeras universidades de España. Fundada por el Cardenal Loazes, Patriarca de Antioquía, cerca de su convento creado por bula del Papa Julio II (1510) y privilegio del rey



Fernando el Católico. En 1569 se le concedió la categoría plena, quedando equiparada con las Universidades de Salamanca, Alcalá de Henares y Valencia. En el siglo XVIII, la Época Dorada en la Universidad de Orihuela, contaba con 24 cátedras (Derecho, Medicina, Filosofía y otras) un claustro de 100 doctores, 300 alumnos, y 117 colegiales en el Seminario.

Catedral de Orihuela. La Santa Iglesia Catedral de El Salvador de Orihuela, capital de la Diócesis Orihuela-Alicante, empezó a construirse a finales del S.XIII sobre restos visigodos, hispano-árabes y



mudéjares, siendo su estilo gótico levantino. En 1281, Alfonso X el Sabio estableció que la iglesia del Salvador y Santa María debía ser la mayor de la Ciudad. Posee un amplio conjunto de rejería (S. XV) de estilo gótico y renacentista. Gran órgano barroco, realizado por Salanova y Userralade en Valencia (1733), con más de 72 registros, cadereta y gran trompetería de batalla, en tubos de estaño. En la cúspide, el escudo cuatribarrado de la Corona de Aragón. El claustro del 1377 fue restaurado en el Renacimiento con arcos carpaneles, transportado aquí en 1942 desde el Convento de la Merced. La torre alberga: una prisión, la maquinaria del reloj (S. XVIII), las campanas litúrgicas, y en la última planta la campana de las horas (S.XVI) y el timbre (S.XVIII).

Palacio Episcopal. Se inició a construir en el siglo XVI y ha sido declarado monumento nacional. Su principal objetivo es difundir la historia del municipio y de la diócesis. Una meta que consigue con cerca de 200 obras, algunas de valor incalculable, entre ellas algunas firmadas por Velázquez o Salzillo y una importante colección de pintura, esculturas y orfebrería datadas entre los siglos XIII y XIX.





XXVI
SIMPOSIO AVEDILA



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Programa

Domingo 19 de noviembre

18:30 *Recepción*

Registro y recogida de documentación

20:00 *Auditorio*

Inauguración Oficial

Presidente del Comité Organizador - Dr. Antonio Martínez-Murcia

Presidente de AVEDILA - Dr. Jose Luis Blanco Cancelo

Universidad Miguel Hernández - Rector Magnífico Juan José Ruiz Martínez

Alcalde de Elche – Ilmo. Sr. Pablo Ruz Villanueva

20:30 *Auditorio*

Conferencia Inaugural y Premio AVEDILA

Una herramienta útil para el diagnóstico y control seguro de las dos principales pandemias del siglo XXI: la COVID-19 y la peste porcina africana

Dra. Sandra Barroso Arévalo

21:00 *Sala de Exposiciones*

Coctel de bienvenida

Lunes 20 de noviembre

08:30 – 10:00 *Auditorio*

Sesión I - Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación - MAPA

Diagnóstico de la Influenza aviar en España durante el período 2020-2023.
Dra. Montserrat Agüero

Diagnóstico de la viruela ovina en España durante el brote de 2022/23. Rubén
Villalba Martínez

Diagnóstico de la enfermedad hemorrágica epizootica en España durante el
brote 2022/23. Marta Valero Lorenzo

Carbunco bacteridiano, diagnóstico y epidemiología molecular de los focos
recientes. María Jesús Ortega

Moderadores:

Dr. Manuel Durán Ferrer
Dra. Montserrat Agüero García
Dr. José Antonio Bouzada Rey
Dra. María José Rico Morales

10:00 – 11:00 *Auditorio*

Comunicaciones Orales

Detección del virus de la peste porcina africana mediante un ensayo de PCR-LAMP
en muestras clínicas, ambientales y no invasivas utilizando el mínimo
equipamiento. Adriana Muñoz (IRTA-CreSA)

Micobacterias ambientales y la erradicación de la Tuberculosis Bovina: mucho
indicio, pero poca prueba. Alberto Gómez-Buendía (VISAVET)

Resistencia antibiótica en aislados de *E. coli* aislado a partir de perros con
infección del tracto urinario. Ana Abad-Fau (UNIZAR)

Validación del kit-GPS™ MTplex dtec-qPCR para el diagnóstico de tuberculosis
en rumiantes y humanos. Gema Bru Amoraga (genetic PCR solutions™)



Estudio de los perfiles de resistencia antimicrobiana en aves salvajes de zonas urbanas de Cataluña. Ana R. Zamora (UDL)

Evaluación de una PCR a tiempo real para la detección del parvovirus canino en el Hospital Clínico Veterinario Complutense. Dra. Beatriz Romero (VISAVET)

Uso de la secuenciación de nueva generación en la investigación de brotes reemergentes de tuberculosis en un contexto multihospedador. Dr. Bernat Pérez de Val (IRTA-CReSA)

¡El diagnóstico de la tuberculosis caprina puede ser la leche! Carlos Velasco (VISAVET)

Moderadores:

Dra. M^a Luz Roche Julián
Gema Bru Amoraga

11:00 – 11:30 *Sala de Exposiciones*

Pausa - Café, Presentación de posters con presencia de autores

11:30 – 12:30 *Auditorio*

Sesión II - Red de Investigación en Sanidad Animal - RISA

El control de las micobacteriosis mediante vacunación y su efecto en el diagnóstico. Dr. Joseba M. Garrido Urkullu (NEIKER)

Diseño y desarrollo de herramientas sencillas, rápidas y económicas para el diagnóstico de enfermedades transfronterizas relevantes para el sector porcino. Dra. Lillianne Ganges (IRTA-CReSA)

Línea de investigación del SERIDA en enfermedades transmitidas por vectores (garrapatas duras - Ixodidae) en Asturias desde un enfoque "One Health"
Dr. Alberto Espí Felgueroso (SERIDA)

Moderadores:

Dr. Joseba Garrido Urkullu
Dra. M^a José Cubero Pablo

12:30 – 13:30 *Auditorio*

Presentación de empresas colaboradoras



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

13:30 – 14:30 *Sala de Exposiciones*
Comida de trabajo

14:30 – 15:30 *Auditorio*
Asamblea General AVEDILA

15:30 – 16:00 *Sala de Exposiciones*
Pausa - Café, Presentación de posters con presencia de autores

16:15 *Exterior Centro de Congresos*
Salida autobuses. Visita Orihuela

20:30 *Colegio Diocesano Santo Domingo*
Recepción
Imposición Insignia Oriol - Prof. Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaíno

Presidente del Comité Organizador - Dr. Antonio Martínez-Murcia
Alcalde de Orihuela - Ilmo. Sr. José Vegara Durá

21:00 *Colegio Diocesano Santo Domingo*
Cena claustro Universidad Histórica (S. XVI)
Patrocinado por el Excmo. Ayuntamiento de Orihuela

Martes 21 de noviembre

08:30 – 09:30 *Auditorio*
Comunicaciones Orales

Estudio de la prevalencia y distribución espacial de la IBR en el marco del programa de control realizado por las ADSG de Galicia. Carmen Calvo (AGACAL-CIAM)

Microplásticos y otras partículas artificiales en aves rapaces. Chloe Wayman (UAH)

Presencia y potencial zoonótico de *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* y *Balantioides coli* en ungulados en libertad y semilibertad en España. Dr. David Carmena (ISCIH)

Empleo de la muestra de leche de tanque en el programa de control de DVB en las ADSG de Galicia. Ignacio Arnaiz (AGACAL-CIAM)

Exploración de la dinámica espacio-temporal del estado sanitario de la cabaña apícola en España (2012-2020). Iratxe Perez-Cobo (LCV)

Estandarización del control de los reactivos de diagnóstico de uso veterinario a nivel europeo. Isabel Gonzalo (LCV)

Metabólica aplicada al diagnóstico de la tuberculosis caprina, ¿funciona? Dr. Javier Bezos (VISAVET)

Relaciones epidemiológicas y dónde encontrarlas: el uso de la secuenciación masiva de genomas para reforzar los estudios epidemiológicos de la TB animal en la Comunidad de Madrid. Víctor Lorente-Leal (VISAVET)

Moderadores:

Dr. Tomás Mayoral Ortega
Juan Ángel Díaz de Tuesta García



09:30 – 10:30 *Auditorio*

Sesión III - Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria - VISAVET

Muestréos no invasivos: ¿está la clave para la detección de patógenos y el análisis de su virulencia y resistencia a antibióticos fuera del animal? Dra. Marta Pérez Sancho

Cómo integrar la secuenciación masiva en el diagnóstico y en la investigación epidemiológica. Dr. Julio Álvarez Sánchez

Diagnóstico de rutina en Veterinaria a través de la Anatomía Patológica.
Dr. Antonio Rodríguez Bertos

Moderadores:

Dra. Beatriz Romero Martínez

Dr. Aaron Navarro García

10:30 – 11:00 *Sala de Exposiciones*

Pausa - Café, Presentación de posters con presencia de autores

11:00 – 11:35 *Auditorio*

Comunicaciones Orales

Un prototipo de vacuna oral frente a PTB no interfiere con el diagnóstico de la tuberculosis bovina y aumenta la actividad de los fagocitos en un modelo caprino.
Dra. Natalia Elguezabal (NEIKER)

Vacunas vectoriales para aves de corral: ensayos serológicos innovadores para el seguimiento de la vacunación y las pruebas DIVA de la gripe aviar A H5.
Alejandra Castillo (Innovative Diagnostics)

Evaluación de la extracción automatizada de ADN del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de tejidos para su detección mediante PCR a tiempo real. Víctor Lorente-Leal (VISAVET)

Presencia y diversidad de subtipos de *Blastocystis* en jabalíes (*Sus scrofa*) de la Península Ibérica. Dr. David Carmena (ISCIII)

Evaluación del rendimiento del ensayo de liberación de IFN- γ en rebaños oficialmente libres de tuberculosis bovina en cinco países europeos. Alberto Gómez-Buendía (VISAVET)

Moderadores:

Dra. Montserrat Agüero García
Gema Bru Amoraga

11:35 – 13:00 *Auditorio*

Sesión IV - Colegios veterinarios de Alicante y Murcia

Pruebas laboratoriales en el diagnóstico del hiperadrenocorticismismo canino. María Dolores Tabar Rodríguez

Actualización en el diagnóstico de las dermatofitosis en animales de compañía. Presente y futuro. David Sanmiguel Poveda

Biopsia líquida en oncología veterinaria. Pachi Clemente

El laboratorio en leishmaniosis canina: avances en diagnóstico y monitorización. Dra. Silvia Martínez Subiela

Moderadores:

Sra. M^a Felicidad Rodríguez Carbajo
Sra. Teresa López Hernández

13:00 – 13:30 *Auditorio*

Conferencia de Clausura

De sueño a una realidad cercana. La vacuna de la PPA.
Prof. Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaíno

Moderadores:

Dr. Lucas Domínguez Rodríguez
Dr. Antonio Martínez-Murcia

13:30 – 14:00 *Auditorio / Sala de Exposiciones*

Acto de Clausura: Entrega de Premios y Vino español

Presidente de AVEDILA - Dr. Jose Luis Blanco Cancelo
Secretaria de AVEDILA - Dra. M^a Luz Roche Julián

Premio Mejor Comunicación Oral patrocinado por IDEXX
Premio Mejor Comunicación Poster patrocinado por GOLDSTANDARD
DIAGNOSTICS



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Ponencias Invitadas

Una herramienta útil para el diagnóstico y control seguro de las dos principales pandemias del siglo XXI: la COVID-19 y la peste porcina africana

Sandra Barroso-Arévalo^{1,2}, Marta Díaz-Frutos^{1,2}, Aleksandra Kosowska^{1,2}, Marta Pérez-Sancho^{1,2}, Lucas Domínguez^{1,2}, José Manuel Sánchez-Vizcaíno^{1,2}

¹Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, AV Puerta del Hierro SN, 28040, Madrid

²Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, AV Puerta del Hierro SN, 28040, Madrid

Email: sandrabarroso@ucm.es

La pandemia COVID-19 y la peste porcina africana (PPA) son actualmente dos de los principales problemas tanto de la salud pública como de la sanidad animal, respectivamente. Estas amenazas, ambas de origen vírico, no solo afectan la salud humana y animal, sino que también exigen un manejo meticuloso bajo estrictas condiciones de bioseguridad. Esto es especialmente importante en el caso de la PPA, ya que se trata de una enfermedad de notificación obligatoria para la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) debido a su alta mortalidad y al estatus del país como territorio libre de la enfermedad. Ante la sospecha de estos virus, la rapidez, sensibilidad y especificidad son esenciales en su diagnóstico. Aunque la vacunación parece ser la herramienta ideal para controlar ambas enfermedades, presenta limitaciones y costes asociados, así como diferencias en la efectividad y variabilidades relacionadas con el individuo. En concreto, en el caso de la PPA, aún no existen vacunas comerciales disponibles para su uso en la Unión Europea. Por lo tanto, la detección temprana del patógeno implicado es esencial para aplicar medidas preventivas y de control. La PCR en tiempo real es la principal técnica utilizada para la detección de ambos virus, la cual requiere un procesamiento previo del material infeccioso en condiciones de alta bioseguridad. En este sentido, la inactivación en el momento de la toma de muestras permitiría llevar a cabo su procesamiento en laboratorios con un nivel de contención biológica inferior, lo que aceleraría el diagnóstico. Esto tendría un impacto positivo en la rapidez con la que se detectan los casos y, por ende, el control de la enfermedad.

Recientemente, el grupo de investigación VISAVET, en colaboración con otros centros como el Instituto de Salud Carlos III o Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC), han desarrollado una nueva metodología para realizar muestreos ambientales y no invasivos utilizando un líquido surfactante que inactiva eficientemente un amplio espectro de patógenos (entre ellos, el complejo *Mycobacterium tuberculosis* y la brucelosis porcina), preservando su material genético. La técnica utiliza esponjas deshidratadas como material de muestreo que se impregnan con el líquido surfactante. Para validar las propiedades del líquido surfactante para COVID-19 y PPA, evaluamos la capacidad del mismo de inactivar ambos virus mediante cultivo celular, así como el tiempo necesario para ello y la eficiencia de la conservación del material genético teniendo en cuenta las variables tiempo y temperatura. Nuestros resultados demostraron que el líquido surfactante inactiva eficazmente el SARS-CoV-2 y el virus de la PPA en tan solo cinco minutos, y permite la conservación del material genético durante largos períodos incluso a altas temperaturas (37°C o temperatura ambiente). Por lo tanto, esta metodología es una herramienta segura y útil para recuperar el ARN/ADN del SARS-CoV-2 y del virus de la PPA de diferentes superficies, tanto vivas como inertes, lo cual tiene una gran relevancia y



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

aplicabilidad en la vigilancia sanitaria de ambas enfermedades. En un mundo donde la rapidez y precisión en el diagnóstico son cruciales para controlar amenazas de origen infeccioso, la metodología desarrollada y validada en el presente trabajo sienta un precedente para contribuir a la detección temprana y segura de la COVID-19 y la PPA, pudiendo ser potencialmente aplicado a otros patógenos.

Notas

De un sueño a una realidad cercana: La vacuna de la PPA

Prof. Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaíno

Coordinador proyecto EU VACDIVA, Universidad Complutense de Madrid

La obtención de una vacuna frente a la peste porcina Africana (PPA) ha sido un sueño desde su descubrimiento por Montgomery en Kenia en 1921. Varios grupos de investigación de diferentes países lo intentaron, incluyendo nuestro querido Prof. Sánchez-Botija y Manso Ribeiro, en Portugal, en los años 60. La técnica más utilizada era la de atenuación del virus tras muchos pases en leucocitos ya que las inactivadas no producían ninguna protección. Estas vacunas atenuadas, acababan generando una respuesta inmune con gran cantidad de inmunocomplejos, lesiones en piel, inflamaciones articulares y degeneración en cuadros crónicos.

Por mucho tiempo y tras diferentes fracasos, se fue aceptando la imposibilidad de conseguir una vacuna para esta enfermedad con los conocimientos y tecnología disponibles. Ha sido con el avance de la biología molecular cuando se ha abierto una nueva esperanza. Hemos pasado de la atenuación a delecciones genéticas y a la producción de mutantes del virus. Esta ha sido la estrategia del proyecto de la EU VACDIVA, partiendo de una cepa naturalmente atenuada en campo Lv17/WB/Rie1, se han obtenidos diferentes mutantes, uno de ellos, el nominado como Delta AB (nombre no real, patente), ha demostrado ser un buen candidato para la protección de jabalíes frente al VPPA. En la actualidad los jabalíes representa la mayor amenaza de transmisión y difusión de la PPA en los cinco continentes y para los que se ha conseguido entre el 92 y el 100% de protección frente al virus virulento (Armenia), sin generar ningún efecto secundario. Además, este candidato de vacuna, no genera significativa transmisión de la vacuna a otros animales que pudieran convivir con los vacunados. Finalmente, se han desarrollado también, en el consorcio VACDIVA, un kit de diagnóstico DIVA que permite diferenciar a los animales vacunados de aquellos que hayan sido infectados, mediante un sencillo test ELISA.

En resumen, se ha obtenido un excelente, seguro y DIVA candidato, para la inmunización oral de jabalíes frente al virus de la PPA, cuyos principales resultados obtenidos hasta la fecha, alta protección frente al vPPA virulento sin efectos secundarios, diferenciación DIVA, etc serán expuestos con más detalle en el congreso.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Ponencias Invitadas

Notas

Diagnóstico de la Influenza aviar en España durante el período 2020-2023

Montserrat Agüero^{1*}, Azucena Sánchez¹, María José Ruano¹, María Teresa Barrios, Cristina Cano¹, Ana López¹ y Rubén Villalba¹

¹Laboratorio Central de Veterinaria (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), Algete, España

*maguerog@mapa.es

La influenza aviar (IA) es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa que afecta tanto a las aves silvestres como domésticas. Está causada por un virus de la familia Orthomyxoviridae, del género Influenzavirus A. Las aves acuáticas forman un reservorio importante de estos virus. Algunas especies de aves silvestres son capaces de portar el virus en sus tractos respiratorios o intestinales, sin padecer la enfermedad, lo que les permite transportar el virus a largas distancias a lo largo de sus rutas migratorias. Los virus de IA se clasifican en subtipos en función de sus antígenos de hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N). En la actualidad se reconocen 16 subtipos de H (H1-H16) y 9 subtipos de N (N1-N9). Los virus de IA son genéticamente y antigénicamente heterogéneos, existen cepas de baja patogenicidad (IABP) y cepas de alta patogenicidad (IAAP). Todas ellas son capaces de infectar y multiplicarse en aves, pero mientras que las de baja patogenicidad apenas afectan a sus huéspedes, las de alta patogenicidad producen una enfermedad letal en un porcentaje muy alto de las aves infectadas. Los subtipos de virus IA capaces de dar lugar a cepas altamente patógenas, pertenecen a los subtipos H5 o H7 y poseen una secuencia de múltiples aminoácidos básicos en el sitio de procesamiento proteolítico de la hemaglutinina (HA0). La IAAP, causa frecuentemente una enfermedad grave de carácter sistémico y muy contagiosa, con una elevada mortalidad. Es una enfermedad de notificación obligatoria inmediata a nivel internacional, a través de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), así como en la Unión Europea, donde está incluida como enfermedad de categoría A para la cual deben tomarse medidas inmediatas de erradicación tan pronto se detecte su existencia. Su aparición acarrea graves consecuencias comerciales y económicas debido tanto a las medidas sanitarias (sacrificios obligatorios de aves), necesarias para erradicar los brotes, como a las restricciones que se adoptan en relación con el comercio de aves y sus productos. En España se viene desarrollando desde hace años un programa de vigilancia de IA que incluye un componente pasivo (comunicación e investigación de sospechas) y un componente activo (muestreos dirigidos a poblaciones de aves de riesgo). Este programa se ha intensificado en los últimos años, debido al aumento de la circulación del virus de influenza aviar de alta patogenicidad H5N1 del clado 2.3.4.4b, observado a nivel global desde julio 2020, tanto en aves silvestres como domésticas. El diagnóstico rápido de la IAAP es fundamental para prevenir la expansión de la enfermedad y permitir el control y erradicación de los brotes rápidamente. No existen síntomas patognómicos de IA, ya que los posibles síntomas son compatibles con otras enfermedades de aves como, por ejemplo, la enfermedad de Newcastle; por otro lado, el cuadro clínico dependerá de la virulencia del virus involucrado y de factores dependientes del huésped (especie, edad, estado inmunológico, presencia de otros agentes infecciosos). Por ello, el diagnóstico laboratorial es una herramienta imprescindible en la vigilancia y control de esta enfermedad. En España el diagnóstico inicial de IA se lleva a cabo en los laboratorios oficiales de las diferentes CCAA, empleando métodos armonizados y coordinados por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para esta enfermedad (Laboratorio Central de Veterinaria



en Algete), que a su vez sigue las directrices del Laboratorio Europeo de Referencia (LRUE) para la IA (IZS delle Venezie). Cualquier resultado positivo obtenido en los laboratorios de CCAA es confirmado en el LNR donde además se realiza la caracterización del subtipo de H y N y, en el caso de detectarse virus de subtipo H5 o H7, se determina por métodos moleculares la patogenicidad. En esta presentación se describe la sistemática actual del diagnóstico laboratorial de IA en España que incluye: pruebas serológicas para demostrar la presencia de anticuerpos específicos frente al virus (ELISA, Inhibición de la hemaglutinación), técnicas de RT-PCR en tiempo real capaces de detectar regiones conservadas en el genoma de todos los virus de Influenza A, métodos de RT-PCR específicos para diferentes subtipos de H y N, secuenciación nucleotídica de la región de procesamiento del gen de la H, en virus de subtipo H5 o H7, y métodos de aislamiento del virus en huevos embrionados. Asimismo, se presentan los resultados de los análisis realizados en el LCV desde junio de 2020 a octubre 2023, que han permitido la detección de numerosos focos de IAAP H5N1 en aves silvestres y domésticas, así como de un brote en una explotación de visón americano. Por último, se mostrarán los análisis filogenéticos de los virus implicados en estos brotes y su relación con los virus circulantes en el resto de Europa, realizados en colaboración con el EURL, donde se ha llevado a cabo la secuenciación genómica completa de los mismos empleando técnicas de NGS.

Notas

Diagnóstico de la viruela ovina en España durante el brote de 2022/23

Rubén Villalba^{1*}, M. Belén Gómez¹, Gema Rojo¹, María José Ruano¹, Ana López¹, Cristina Cano¹ y Montserrat Agüero¹

¹Laboratorio Central de Veterinaria (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), Algete, España

*rvillalba@mapa.es

La viruela ovina es una enfermedad vírica contagiosa causada por un virus DNA de la familia *Poxviridae* y el género *Capripoxvirus*, al que también pertenecen los virus de la Viruela caprina y la Dermatitis nodular contagiosa. Produce un elevado impacto económico en las explotaciones de pequeños rumiantes y, por ello, está incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización mundial de sanidad animal (OMSA) y de la Unión Europea (UE), cuya legislación la considera una enfermedad de categoría A por lo que, en caso de detección en un estado miembro, se requiere la erradicación inmediata. Aunque algunos países en la cuenca mediterránea están infectados de manera endémica con los virus de la viruela ovina y caprina, estas enfermedades se consideran exóticas dentro de la UE, dónde únicamente se han reportado en los últimos 20 años incursiones esporádicas en países del este (Grecia y Bulgaria). En España, después de más de 50 años desde su erradicación en 1968, en septiembre de 2022 la detección de lesiones en ovino compatibles con una infección por un *Capripoxvirus* fue notificada a los Servicios Veterinarios Oficiales (SVO) en Andalucía y confirmada como Viruela ovina por el Laboratorio Nacional de referencia (LNR) en España. En este trabajo se describe el brote de Viruela ovina en España focalizado en las actividades de diagnóstico realizadas en el marco de las medidas de control adoptadas por los SVO para la erradicación de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

La primera detección e identificación del patógeno se realizó sobre muestras de lesiones cutáneas usando PCR en tiempo real para la detección de *Capripoxvirus* (1). La posterior determinación de la especie se realizó mediante PCR convencional (2) y se confirmó por secuenciación parcial (3). Finalmente, se determinó el tipo de cepa (campo o vacunal) mediante una PCR convencional (4). En paralelo, las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Referencia de la UE (EURL) para *Capripoxvirus* (Scienzano, Bélgica), para secuenciación completa y aislamiento en cultivo celular. El seguimiento del brote se realizó por los SVO mediante minuciosas inspecciones clínicas, seguidas de muestreos para análisis de laboratorio, diferenciando un periodo de vigilancia activa, en el que se tomaron muestras únicamente en animales con signos clínicos, de otro periodo de vigilancia activa reforzada, en el que se han tomado muestras incluso en ausencia de signos clínicos, tanto en ovino como en caprino. Las muestras tomadas han sido lesiones en piel, sangre con EDTA, hisopos bucales y leche de tanque, para detección del agente mediante PCR en tiempo real, y suero para análisis serológicos mediante ELISA.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

De acuerdo con la bibliografía, se confirma la muestra de lesión en piel como la muestra de elección para la detección del patógeno y, en animales sin sintomatología clínica, la muestra de hisopo bucal. La serología no ha resultado una herramienta útil debido a la baja tasa de seroconversión y a la tardía aparición de anticuerpos frente al virus detectables por ELISA. En caprino no se han evidenciado signos



clínicos ni se han detectado muestras positivas durante la vigilancia activa reforzada. De acuerdo con los resultados de laboratorio, el análisis mediante PCR de muestras de hisopo bucal tomadas de animales sin sintomatología clínica en explotaciones dentro de la zona de riesgo permite una detección precoz de la enfermedad. No obstante, deberá valorarse su utilidad para el control de la enfermedad, teniendo en cuenta el elevado coste económico y en personal que conlleva.

1. Bowden TR, *et al.* (2008) Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*. 2008 Feb 20;371(2):380-93.
2. Lamien CE, *et al.* (2011) Use of the Capripoxvirus homologue of Vaccinia virus 30kDa RNA polymerase subunit (RPO30) gene as a novel diagnostic and genotyping target: development of a classical PCR method to differentiate GP virus from SP virus. *Vet Microbiol.* 2011 Apr 21;149(1-2):30-9.
3. Menasherow S, *et al.* (2014) Development of an assay to differentiate between virulent and vaccine strains of LSD virus. *Journal of virological methods.* 199. 10.1016/j.jviromet.2013.12.013.
4. Haegeman A, *et al.* (2016) Investigation of a Possible Link Between Vaccination and the 2010 Sheep Pox Epizootic in Morocco. *Transbound Emerg Dis*, 63: e278-e287. 10.1111/tbed.12342.

Notas

Diagnóstico de la enfermedad hemorrágica epizootica en España durante el brote 2022/23

Marta Valero-Lorenzo^{1*}, Rubén Villalba¹, María José Ruano¹, Ana López¹, Cristina Cano¹ y Montserrat Agüero¹

¹Laboratorio Central de Veterinaria (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), Algete, España
*mvalero@mapa.es

La enfermedad hemorrágica epizootica (EHE) es una enfermedad vectorial transmitida por mosquitos del género *Culicoides*, causada por un Orbivirus, del que hasta el momento se han descrito 7 serotipos. Afecta a los rumiantes, principalmente cérvidos y ganado bovino, en los que da lugar a síntomas similares a los de la lengua azul. Nunca había sido notificada en Europa, quedando restringida su presencia a zonas de Norte América, África y Asia, hasta noviembre de 2022, cuando fue notificada por primera vez en explotaciones de ganado bovino en Cerdeña (Italia). Pocos días después, se notificó su presencia en bovino en Andalucía, España. Desde entonces, en España se han notificado 11 brotes en 2022 y más de 190 en 2023, hasta el mes de octubre, afectando a todas las CCAA peninsulares. En este trabajo se describen las actividades de diagnóstico llevadas a cabo por el Laboratorio Central de Veterinaria (LCV) como Laboratorio Nacional de Referencia para la enfermedad sobre muestras procedentes de sospechas clínicas, así como otros estudios planificados con los Servicios veterinarios oficiales para tratar de esclarecer aspectos clave en la transmisión y distribución de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar el método de RT-PCR específica de serogrupo más conveniente para su diagnóstico, se analizaron muestras de sangre con EDTA de bovinos con signos clínicos mediante tres métodos de RT-PCR en tiempo real (1, 2 y un método no publicado, 2007) y un método de RT-PCR convencional (3), pudiendo comparar sus resultados. Además, algunas muestras positivas de los primeros focos fueron tipadas mediante RT-PCRs específicas de serotipo (2,4). Algunas de las muestras de sangre-EDTA positivas se seleccionaron para llevar a cabo el aislamiento en células de las líneas KC y BHK-21, así como secuenciación parcial de los segmentos 2 y 5 del genoma viral. De algunos bovinos con signos clínicos también se tomaron muestras de suero, que fueron analizadas por un método ELISA de competición. En cuanto a los estudios planificados, durante este año se han tomado muestras de suero y sangre-EDTA tanto en explotaciones de bovino afectadas, como en explotaciones de ovino y caprino adyacentes. Además, se analizaron *Culicoides* recogidos en trampas usadas en el Programa de vigilancia y control para la Lengua azul.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Además de aislamiento viral y serología, los primeros brotes fueron confirmados empleando diferentes métodos de RT-PCR, resultando el método de Viarouge et al. (2015), el que mostró los mejores valores de Ct. Todas las muestras positivas fueron confirmadas como serotipo 8 mediante RT-PCR específica. La secuenciación parcial de los segmentos 2 (457 nt) y 5 (348 nt) mostró una identidad superior al 99% con las secuencias obtenidas de las cepas de EHDV8 presentes en Túnez e Italia durante 2021 y 2022, respectivamente.

Los resultados de los estudios planificados demostraron la presencia del genoma vírico en sangre de bovinos afectados durante al menos cinco meses. El porcentaje de animales infectados en una



explotación positiva se ha determinado cercana al 80% por métodos serológicos y no se ha observado la presencia de transmisión transplacentaria en los casos analizados. En explotaciones de ovino y caprino adyacentes a explotaciones de bovino infectadas, no se han observado signos clínicos a pesar de detectarse elevados porcentajes de animales ovinos positivos a RT-PCR y ELISA, en algunas de ellas. Por último, se detectó genoma del virus en *Culicoides* a partir del mes de julio, especialmente en *Culicoides imicola*, la especie mayoritaria en la zona muestreada (Andalucía).

1. Maan NS *et al.* (2017) Development of Real-Time RT-PCR Assays for detection and typing of epizootic haemorrhagic disease virus. *Transbound Emerg Dis.* 2017 Aug;64(4):1120-1132.
2. Viarouge C, *et al.* (2015) Duplex Real-Time RT-PCR assays for the detection and typing of epizootic haemorrhagic disease virus. *PLoS One.* 2015 Jul 10;10(7):e0132540.
3. Aradaib IE, *et al.* (1994) Detection of epizootic hemorrhagic disease virus serotypes 1 and 2 in cell culture and clinical samples using polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 1994 Apr;6(2):143-7.
4. Lorusso A, *et al.* (2022) Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 8, Italy, 2022. *Emerg Infect Dis.* 2023 May;29(5):1063-1065.

Notas

Carbunco bacteridiano: diagnóstico y epidemiología molecular de los focos recientes.

MJ. Ortega¹, B. Diéguez³, I. Notario³, I. Guerrero³, MD. Buitrago², R. Fernández-Rivera³, MJ. Sánchez³, O. Fernández-Navarro³, A. Lucas³, R. Fernández-Oropesa¹, M. Francisco¹, AP. López¹, JA. Bouzada², S. Collado⁴, JL. Sáez-Llorente⁴, MA. Perales¹.

¹Laboratorio Central de Sanidad Animal, 18320, Santa Fe, Granada.

²Laboratorio Central de Veterinaria, 28110, Algete, Madrid.

³Tecnologías y Servicios Agrarios, S.A., 28006, Madrid.

⁴Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad (MAPA), 28014, Madrid.

El Carbunco bacteridiano o ántrax es una zoonosis distribuida a nivel mundial. Existen países en los que se considera una enfermedad endémica, otros en los que se suceden brotes de forma esporádica y algunos en los que nunca se han reportado casos.

El agente etiológico es *Bacillus anthracis*, un bacilo grampositivo, capsulado y con capacidad de formar esporas.

Los hospedadores más sensibles son los animales herbívoros, que se infectan por ingestión de esporas de *B.anthraxis* presentes en los pastos contaminados. La supervivencia de estas esporas en el medio ambiente es muy elevada, alcanzando varias décadas y proporcionándole a esta enfermedad el conocido nombre de "la enfermedad de los campos malditos". Los insectos pueden desempeñar un papel importante como vectores en la difusión de brotes de carbunco al alimentarse de animales infectados.

En España, no se había declarado un caso de carbunco bacteridiano en animales desde el año 2004. Sin embargo, en el año 2021 se sucedieron 24 focos que afectaron principalmente a la especie bovina y de manera secundaria a las especies equina y porcina. El primer foco sucedió en la provincia de Ciudad Real y los 23 restantes en las provincias extremeñas de Cáceres y Badajoz.

El diagnóstico se realizó mediante cultivo microbiológico en los medios indicados de agar sangre con un 5% de sangre de cordero desfibrinada y agar PLET (polimixina B, liozima, EDTA y acetato de talio). La confirmación se realizó por las características del cultivo y mediante PCR dirigida al marcador cromosómico Ba813 y a los genes que codifican para el antígeno protector y la cápsula, presentes en los plásmidos pXO1 y pXO2, respectivamente.

La cercanía temporal y geográfica de estos 24 focos hicieron necesarios estudios adicionales. Para ello, se seleccionaron un total de 29 cepas de *Bacillus anthracis* pertenecientes a 20 de los 24 focos declarados en el año 2021.

La investigación epidemiológica de estos focos se realizó mediante WGS, con la tecnología MiSeq (Illumina), realizando un análisis bioinformático enfocado al tipado y caracterización molecular y análisis de diversidad genética por cgMLST y wgSNPs. Finalmente se realizó la caracterización filogenética de los aislados aplicando los esquemas de clasificación establecidos por Bruce et al., 2019 y Marston et al., 2011.

Todos los aislados presentaron los genes de resistencia frente a la fosfomicina *FosB1* y *FosB2*. Se identificó la presencia de ambos plásmidos pXO1 y pXO2 y los mismos factores de virulencia (*capB*,



capC, capA, depI capD, capE, lef, pagA, cya, BAS3109, nheA, nheB, inhA) en todas las cepas sujetas a estudio.

El análisis de diversidad genética reveló dos eventos epidemiológicos diferenciados, con el aislado de Ciudad Real de un lado y los aislados extremeños del otro.

Por cgMLST las cepas de Extremadura presentaron un máximo de 8 alelos de diferencia entre sí. La cepa de Ciudad Real presentó más de 60 alelos de diferencia con las de Extremadura. Con el análisis por wgSNPs se comprobó que todas las cepas de Extremadura se diferenciaban en un máximo de 6 SNPs. En cambio, la cepa de Ciudad Real presentaba más de 100 SNPs de diferencia con las anteriores. A nivel global, la caracterización filogenética situó al aislado de Ciudad Real próximo a cepas de origen europeo, mientras que los aislados de Extremadura se situaron cercanos a cepas de origen americano. Los nuevos brotes de ántrax acontecidos en 2022, con 2 focos en ovinos de Extremadura y otros dos focos en bovinos de Asturias, se sometieron a estos mismos análisis. Los resultados obtenidos revelaron una gran homología genética de los aislados extremeños con respecto a sus antecesores de 2021. Sin embargo, los aislados de Asturias estaban muy alejados filogenéticamente de los anteriores y del aislado de Ciudad Real, descartando cualquier vinculación entre ellos.

Notas

El control de las micobacteriosis mediante vacunación y su efecto en el diagnóstico

Joseba M. Garrido, Iker A. Sevilla, Leire Fernández, Mariví Gejjo, Elena Molina, Natalia Elguezabal, Ramón Juste

Departamento de Sanidad Animal, NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario

Las dos principales micobacteriosis que afectan a los rumiantes domésticos son la paratuberculosis y la tuberculosis. La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad infecciosa que afecta principalmente a rumiantes domésticos y salvajes y está causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) capaz de desencadenar una enteritis crónica regional. La prevalencia a nivel de rebaño de la infección por Map es superior al 50% en la mayoría de los países con una importante industria láctea. En la actualidad, el control de esta enfermedad en la especie ovina se aborda mediante vacunación. Sin embargo, la principal estrategia de control en ganado bovino, en la mayoría de los países, se basa en la combinación de medidas higiénico-sanitarias y en la detección y eliminación de los animales infectados detectados con pruebas laboratoriales. Estos programas requieren un largo periodo de tiempo hasta que se empieza a ver su efecto, son caros y no son tan eficaces como se esperaba, en parte debido a la dificultad que supone la detección de los animales infectados con formas patológicas focales. En este contexto, la vacunación debería ser una alternativa para el control de la paratuberculosis también en el ganado bovino ya que se ha demostrado su efecto favorable en la reducción del aislamiento de Map en heces y tejidos de animales infectados y en el aumento de la producción de leche y de la vida productiva de las vacas en granjas infectadas. Sin embargo, la posible interferencia de la vacuna con las pruebas utilizadas en los programas de erradicación de la tuberculosis hace que su uso no esté permitido en la mayoría de los países. Además, hay que tener en cuenta que las vacunas actuales son vacunas no marcadas, que interfieren en el diagnóstico de la propia PTB mediante pruebas serológicas como el ELISA, haciendo que el diagnóstico de la PTB en animales vacunados deba basarse en las técnicas microbiológicas y de biología molecular.

Con el fin de analizar las ventajas e inconvenientes de la vacunación, nuestro grupo ha llevado a cabo el único ensayo de campo a largo plazo y gran escala de vacunación contra paratuberculosis. En él se pudo observar que de 12.182 análisis realizados mediante la técnica ELISA en individuos vacunados el 23,82% fueron positivos en alguno de los muestreos anuales, mientras que este porcentaje se redujo hasta el 15,18% en los animales vacunados con menos de 90 días de edad y muestreados a partir de los 24 meses. En cuanto al efecto de la vacunación frente a Map en el diagnóstico de la TB bovina utilizando las técnicas oficiales se pudo ver que de 15.514 animales vacunados a los que se les hizo IDR el 12,23% fueron reaccionantes a la IDR simple, pero sólo el 0,22% lo fueron a la prueba comparada. En el caso de la técnica del IFNy se pudo ver que de 5.740 análisis que se hicieron a animales vacunados el 5,21% fue considerado positivo, pero con esta técnica no se observaron diferencias relacionadas con la edad de vacunación. Esta posible interferencia hizo que uno de nuestros objetivos sea el desarrollo de una nueva vacuna con la que evitar estos problemas. Los avances conseguidos en esta línea serán expuestos en este mismo congreso por otros compañeros.



Por otra parte, la tuberculosis (TB) que es una enfermedad multi-hospedador causada por diferentes especies de bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, y sobre todo en ganado, *M. bovis* y *M. caprae*. Dado su componente zoonótico, a pesar de haberse desarrollado una vacuna que todavía se utiliza en humanos, en ganado vacuno, a mediados del siglo XX se optó por el saneamiento para su erradicación. Por ello, los diferentes programas oficiales se basan en la detección y eliminación de los animales infectados, casi exclusivamente mediante pruebas de inmunidad celular e ignorando las de inmunidad humoral. Aunque algunos países se declaran oficialmente libres de tuberculosis bovina, en los últimos años se viene observando que la infección persiste en especies no diana lo que ha demostrado una mayor complejidad epidemiológica de la tuberculosis. Por ello, se ha vuelto a reconsiderar si la vacunación pudiera llegar a ser una herramienta útil en ciertas situaciones tanto para la fauna silvestre como para el ganado doméstico. En consecuencia, se están llevando a cabo ensayos de vacunas vivas e inactivadas que se muestran tanto eficientes para controlar la infección, como capaces de evitar la interferencia con las técnicas de diagnóstico. Nuestro grupo, por su experiencia con la vacuna de paratuberculosis inactivada, ha optado por esta fórmula y viene demostrando estrategias de uso de gran potencial en ambos aspectos.

Notas

Diseño y desarrollo de herramientas sencillas, rápidas y económicas para el diagnóstico de enfermedades transfronterizas relevantes para el sector porcino

Lilianne Ganges^{1,2,3}

¹WOAH Reference Laboratory for classical swine fever, IRTA-CReSA, Barcelona, España

²Unitat mixta d' Investigació IRTA-UAB en Sanitat Animal. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA). Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Barcelona, España

³IRTA. Programa de Sanitat Animal. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA). Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Barcelona, España

La peste porcina clásica (PPC) y la peste porcina africana (PPA) son enfermedades infecciosas devastadoras causadas por el virus de la peste porcina clásica (VPPC) y el virus de la peste porcina africana (VPPA). Por su elevado impacto sanitario y económico en el sector porcino, ambas son consideradas transfronterizas y de declaración obligatoria a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA). El VPPA representa actualmente la mayor amenaza para la industria porcina en todo el mundo. Se han producido brotes en Europa y Asia y recientemente en la isla La Española, en el Caribe. Por otro lado, a pesar de los extensivos planes de vacunación, el VPPC sigue prevaleciendo en muchísimos países de Asia y América, generando graves consecuencias sanitarias y económicas y poniendo en riesgo a los países libres de PPC, que son solamente 38. El control de la PPC se basa en utilizar vacunas vivas atenuadas. La principal desventaja de estas vacunas es la falta de técnicas serológicas para diferenciar entre animales vacunados de infectados (concepto DIVA). El presente trabajo se centró en el desarrollo de tres herramientas diagnósticas rápidas y sensibles con el fin de facilitar el diagnóstico de estas dos enfermedades. Se desarrollaron dos pruebas de diagnóstico molecular mediante la estrategia LAMP, para la detección rápida y precisa del VPPA y el VPPC, así como un ensayo serológico (FlagDIVA) para el diagnóstico DIVA de animales vacunados con la vacuna viva modificada FLAGT4G. Se diseñaron y validaron dos sets de cebadores LAMP para PPA y PPC. Ambos sets mostraron estabilidad térmica, amplificando el genoma objetivo de los virus a temperaturas entre 60 y 70 °C utilizando métodos fluorométricos y colorimétricos. Los cebadores seleccionados no produjeron resultados falsos positivos ni reacciones cruzadas con otros patógenos porcinos comunes. En la validación del ensayo se utilizaron paneles de diversos tipos de muestras recolectadas de cerdos infectados experimentalmente con VPPA o VPPC, en el que se utilizaron las técnicas de referencia acreditadas por la OMSA para ambos virus. Los resultados mostraron que ambas pruebas LAMP son una herramienta útil para el diagnóstico rápido, altamente sensible e *in situ* de ambas enfermedades, incluso utilizando el mínimo de equipamiento. En el caso del ensayo FlagDIVA, consistió en un ELISA directo basado en la construcción de un péptido dendrimerico utilizado como antígeno. FlagDIVA detectó anticuerpos anti-VPPC en animales infectados y no reconoció la respuesta de anticuerpos de los animales vacunados con la vacuna FlagT4G. Por tanto, este ensayo constituye una valiosa herramienta DIVA accesoria en la implementación de la vacunación con el candidato FlagT4G. Estas tecnologías han sido patentadas, por su elevada sensibilidad y sencillez, estas



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

herramientas podrán ser transferidas fácilmente a otros laboratorios, mejorando la capacidad de diagnóstica de la PPA y la PPC.

Notas

Línea de investigación del SERIDA en enfermedades transmitidas por vectores (garrapatas duras - Ixodidae) en Asturias desde un enfoque "One Health"

Alberto Espí¹

¹Área de Sanidad Animal of Animal, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), 33394 Gijón, España

aespi@serida.org

El Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) es un organismo público del Principado de Asturias que tiene por finalidad contribuir a la modernización y mejora de las capacidades del sector agroalimentario regional mediante el impulso y ejecución de la investigación y el desarrollo tecnológico agroalimentario. El Área de Sanidad Animal está ubicada en el Centro de Biotecnología Animal de Deva en Gijón y centra su actividad en el estudio de las enfermedades de los animales domésticos y silvestres.

En 2010, decidimos iniciar una línea de estudio de vectores y enfermedades que transmiten, ya que éstas según la OMS representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas y provocan cada año más de 700.000 muertes. De la variedad de vectores existentes, elegimos comenzar con las garrapatas duras (Familia Ixodidae) debido a las características de Asturias en cuanto a clima y vegetación, abundancia y variedad de fauna doméstica y silvestre y elevada casuística de enfermedades humanas (Lyme, ...) y animales (piroplasmosis, ...) constatada en la región.

Tras obtener financiación con diversos proyectos (RTA2011-00008-C02-01; RTA2013-00013-C04-04 y RTA2017-00055-C02-02) y combinando técnicas de captura de garrapatas de la vegetación con la recogida de las mismas en animales domésticos y silvestres a lo largo de todo el año y durante varios años pudimos establecer los géneros y especies presentes en Asturias, su abundancia en diversas zonas y su dinámica estacional. Como, además, la mayoría de estos proyectos han sido coordinados con el Neiker de País Vasco, hemos podido comparar los resultados obtenidos en dos zonas que, pese a estar situadas en la Cornisa Cantábrica, presentan diferencias en cuanto a climatología, hábitat y composición faunística.

En base a los estudios realizados, se han identificado en Asturias 12 especies de garrapatas pertenecientes a 4 géneros: *Ixodes* (*I. ricinus*, *I. inopinatus*, *I. hexagonus*, *I. frontalis*, *I. acuminatus*, *I. canisuga*), *Haemaphysalis* (*H. concinna*, *H. punctata* e *H. inermis*), *Dermacentor* (*D. reticulatus* y *D. marginatus*) y *Rhipicephalus* (*R. bursa*). *I. ricinus* es con gran diferencia la especie más abundante en la vegetación de nuestra región aportando el 87%, el 95% y el 60% de los totales de larvas, ninfas y adultos capturados en el estudio realizado en la Sierra de Sueve en los años 2012 a 2014.

En cuanto a los patógenos investigados, comenzamos con piroplasmas y anaplasmas, le prestamos especial atención a la borreliosis de Lyme, estudiamos *Coxiella burnetii* en el ciclo silvestre de la Fiebre Q y la asociación de determinadas rickettsiosis con garrapatas del Género *Dermacentor* que actúan no solo como vector sino también como reservorio de éstas bacterias. Dado que la mayoría de estos patógenos son de difícil crecimiento en condiciones de laboratorio, el desarrollo en las últimas décadas de técnicas moleculares ha facilitado enormemente su estudio.

Se sabe que las aves pueden verse infestadas por ectoparásitos como ácaros, garrapatas, pulgas y piojos. Estos ectoparásitos, especialmente las garrapatas, pueden portar varios patógenos, y tanto las



garrapatas como los patógenos pueden ser dispersados por las aves a distancias cortas, medias y largas, lo que representa un riesgo para las poblaciones locales de huéspedes en diferentes regiones geográficas. Por esa razón, uno de los estudios más recientes que hemos realizado es la recogida de garrapatas de 1.698 aves anilladas en Asturias por el Grupo Torquilla durante el periodo 2021-2023 detectando una prevalencia de parasitación por garrapatas del 2,5% e identificando las especies *I. ricinus*, *I. frontalis* e *H. concinna*.

En cuanto a la prevención y el control de estas enfermedades hay dos posibles estrategias, una dirigida a combatir los diferentes patógenos y otra enfocada a la lucha contra el vector. En este sentido, el desarrollo de una vacuna contra las garrapatas es un potencial enfoque para proteger a las personas de múltiples enfermedades transmitidas por garrapatas. El gran reto es desarrollar una vacuna que sea suficientemente eficaz frente a la mayoría de las especies de garrapatas.

Notas

Muestreos no invasivos: ¿está la clave para la detección de patógenos y el análisis de su virulencia y resistencia a antibióticos fuera del animal?

Marta Pérez-Sancho^{1,2}, Teresa García-Seco¹, Carmen Herranz¹, Antonio Martínez-Murcia³ Alberto Díez-Guerrier^{2,4}, Lucas Domínguez^{1,2}.

¹Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET-UCM. 28040-Madrid, España.

²Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. 28040-Madrid, España

³Departamento de Microbiología, Universidad Miguel Hernández; y genetic PCR solutions™, 03300 Orihuela, Alicante, España

⁴MAEVA SERVET S.L., 28749-Alameda del Valle, España.

maperezs@visavet.ucm.es

Los muestreos que proponemos, aplicados en la sanidad animal, conllevan la obtención de material genético del ambiente (suelo, superficies, agua, etc.) de manera no invasiva. Dentro de este amplio concepto, incluimos también muestras que se puedan tomar sobre la superficie (piel, pelo, lana) del animal que suponen un mínimo manejo de este. Los resultados obtenidos a partir de las muestras en principio no tienen valor diagnóstico sobre el individuo si bien permiten recabar información importante de interés epidemiológico. Así, por ejemplo, permiten conocer la presencia y circulación de patógenos de interés y algunas de sus características que puedan ser relevantes, determinar puntos críticos de contaminación/fuente de infección, o evaluar la eficacia de las medidas de control implementadas velando por el bienestar animal. La posibilidad de repetir los muestreos no invasivos tantas veces como sea necesario y los mínimos requerimientos técnicos necesarios para su ejecución convierten a esta aproximación metodológica en una medida complementaria de gran interés para la vigilancia y control de patógenos y otros factores relevantes de interés veterinario.

El éxito de los muestreos no invasivos reside, entre otros, en un diseño correcto (para obtener muestras representativas), un adecuado protocolo de toma de muestras (para evitar contaminaciones cruzadas) y una correcta conservación de la muestra (en nuestro diseño basado en la detección de ADN/ARN, que preserve la integridad del material genético). Respecto a este último punto, el desarrollo de una composición que permite la inactivación de microorganismos y la preservación de ácidos nucleicos de muestras ambientales ha supuesto un salto cualitativo en las posibilidades que ofrecen los muestreos no invasivos tanto para la detección como para la caracterización de microorganismos de interés.

Nuestro grupo de investigación ha explorado la utilidad de esta aproximación para la vigilancia de importantes patologías de relevancia en sanidad animal y/o salud pública (Fiebre Q, tuberculosis, COVID-19 o PPA). Nuestra línea de investigación ha permitido avanzar más allá de la detección explorando, hasta la fecha, de manera exitosa la aplicación de los muestreos no invasivos para i) la cuantificación de patógenos (que permita determinar cambios en la carga microbiana ambiental, por ejemplo, para optimizar medidas de intervención) y ii) la caracterización de patógenos (que permita, por ejemplo, determinar la presencia de genes asociados a antibiorresistencias o factores de virulencia).



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

La posibilidad de aplicar técnicas de secuenciación/detección masiva en muestras no invasivas abre una nueva línea de investigación integrando información epidemiológica para el control holístico de patógenos y otras amenazas en las explotaciones ganaderas y otros ámbitos de interés.

Notas

Cómo integrar la secuenciación masiva en el diagnóstico y en la investigación epidemiológica

Julio Álvarez^{1,2}, Laura Torre¹, Carlos Serna², Ana Isabel Vela^{1,2}, Álvaro Aguarón³, Dolores Cid²

¹Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

²Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

³Servicios Técnicos Veterinarios de Porcino, Laboratorios SYVA

El uso de herramientas que permitan la identificación y caracterización de microorganismos patógenos mediante el análisis de su material genético ha sido uno de los pilares que han hecho posible el estudio en profundidad de su epidemiología molecular, permitiendo valorar el grado de similitud entre cepas de virus o bacterias potencialmente relacionadas, establecer posibles fuentes de infección y reconstruir cadenas de transmisión entre individuos. Sin embargo, hasta hace poco estas herramientas estaban normalmente basadas en protocolos de laboratorio más o menos largos, requerían el uso de un equipamiento específico y una formación especializada para llevarlas a cabo, y tenían un grado de resolución limitado, especialmente en el caso de cepas muy prevalentes en ciertas poblaciones y/o de microorganismos con escasa heterogeneidad genética, como ciertos géneros bacterianos. Sin embargo, la creciente disponibilidad de tecnologías que permiten la secuenciación del genoma completo de los microorganismos ha incrementado exponencialmente nuestra capacidad para analizar su material genético. Así, la aplicación de técnicas de secuenciación masiva ha permitido trazar el origen de brotes de enfermedades sometidas a programas de erradicación como la tuberculosis o la brucelosis bovina, identificar clones particularmente prevalentes de patógenos animales como *Pasteurella multocida* o *Mannheimia haemolytica*, o establecer el grado de similitud existente entre cepas de patógenos zoonóticos como *Salmonella enterica* presentes en distintas especies hospedadoras (incluyendo al ser humano). Igualmente, la tecnología de secuenciación del genoma completo ha permitido la identificación de un número cada vez mayor de factores genéticos que explican fenotipos particularmente problemáticos, tales como cepas hipervirulentas o resistentes a tratamientos antimicrobianos, aspecto éste de enorme relevancia en nuestros días. En esta comunicación se presentarán ejemplos de cómo el uso de la secuenciación masiva como técnica complementaria a otras pruebas diagnósticas ha permitido esclarecer diferentes aspectos de la epidemiología de patógenos animales como los mencionados anteriormente en rumiantes y suidos.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Ponencias Invitadas

Notas

Diagnóstico de rutina en Veterinaria a través de la Anatomía Patológica.

Antonio Rodríguez Bertos

Profesor Titular. Dpto. Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria & Jefe del Servicio Anatomía Patológica y Veterinaria Forense. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET). Universidad Complutense. Madrid – 28040, España
arbertos@ucm.es

La Anatomía Patológica o anatomopatología es una rama de la Medicina que estudia las alteraciones estructurales (lesiones anatómicas) del cuerpo y sus órganos y tejidos, y cómo esto se relaciona con la función y contribuye al desarrollo de la enfermedad. Abarca el estudio de la morfología normal y anormal del organismo a niveles macroscópicos y microscópicos (histológicos y citológicos). El énfasis en la anatomía está en entender cómo la estructura se relaciona con la función en el organismo; mientras que en patología se trata de desarrollar una comprensión de las causas, los mecanismos de desarrollo y las consecuencias de la enfermedad.

La Anatomía Patológica Veterinaria (APV) constituye una de las herramientas más sencillas y prácticas que un veterinario puede utilizar para llegar a un diagnóstico de enfermedad en los animales de compañía y abasto, especialmente aquellas enfermedades zoonóticas de posible transmisión al hombre. El propósito último de esta especialidad es el diagnóstico correcto de biopsias, piezas quirúrgicas, citologías y autopsias/necropsias. Mediante el examen macroscópico tras la realización de una necropsia, hoy en día “autopsia” por la introducción del concepto “One health” (Una sola salud, que recoge una visión integradora de la salud humana y animal), permite analizar los hallazgos patológicos, así como la toma de muestras. De esta forma, tras la fijación en formol y su procesado rutinario en un laboratorio de histología se obtienen unas secciones de tejido que tras su tinción pueden ser observadas al microscopio. Estos estudios histopatológicos, pueden conllevar técnicas tisulares adicionales específicas tales como histoquímicas y/o inmunocitoquímicas, a través de cuya observación al microscopio se puede llegar a determinar la causa de muerte de los animales.

Nuestro centro VISAVET ha procesado más de 17722 muestras (2016-2023) procedentes de diferentes especies tanto de animales de producción como de compañía lo que supone el diagnóstico aproximadamente de 2215 muestras al año. De ellas el 40% de las muestras (7088) corresponden con diferentes proyectos de investigación destacando los relacionados con Peste Porcina Africana. El 60% restante (10634) corresponden con diagnóstico rutinario, así 7630 muestras (43%) pertenecen a acuicultura, principalmente para el diagnóstico de enfermedades en peces tanto continentales como marinos. Le sigue el diagnóstico de tuberculosis en diferentes facetas con 1017 casos; vigilancia epidemiológica de Leishmaniosis con 375 casos en liebres y conejos y diagnóstico de rabia en colaboración con el Centro Carlos III (n=85).

Por la singularidad de nuestro Servicio de Patología y Veterinaria Forense y la sensibilización de la sociedad, hemos realizado la autopsia de 274 casos de perros y gatos con sospecha de abuso animal cuyos datos han sido publicados en diferentes artículos y comunicaciones (Rebollada-Merino et al., 2020: *Forensic Sci Int.* 2020 doi: 10.1016/j.forsciint.2020.110522; Rabanal-Soto y Aradilla-Macias, 2023). Estos estudios ponen de manifiesto un mayor maltrato animal en perros que en gatos, siendo estos últimos, procedentes de colonias felinas más susceptibles a las enfermedades víricas sistémicas que



azotan a esta especie (Leucemia, Inmunodeficiencia y Coronavirus felinos). Además, se ha puesto de manifiesto la utilidad del diagnóstico histopatológico para dirimir el posible ataque de aves necrófagas en el medio rural (n=64), mediante una correcta toma de muestras y un análisis de los hallazgos macro y microscópicos. Todo lo expuesto anteriormente, realzan el valor que el estudio anatomopatológico tiene como técnica diagnóstica en el ámbito de la Medicina Veterinaria.

Notas

Pruebas laboratoriales en el diagnóstico del hiperadrenocorticismismo canino

María Dolores Tabar Rodríguez

DVM, Dip ECVIM-CA, Acred. AVEPA Medicina Interna, AniCura San Vicente Hospital Veterinario, Alicante, España

En el diagnóstico de enfermedades endocrinas es fundamental conocer la fisiopatología de la enfermedad para posteriormente poder elegir la prueba que más se adapte al caso y poder interpretar correctamente los resultados. Prácticamente ninguna prueba es 100% sensible y específica, por lo que es fundamental la selección del paciente para ampliar el valor predictivo de las pruebas que realizamos, y evitar la aparición de resultados contradictorios o inesperados.

La comunicación con el laboratorio es otro punto crítico, puesto que el manejo de las muestras, los rangos de referencia y otros factores, pueden variar en función del laboratorio y/o técnica empleada, siendo especialmente importante el empleo de técnicas validadas para la especie en cuestión (gato/perro). Asimismo, muchos fármacos administrados previamente y enfermedades concurrentes pueden influir en los resultados, por lo que son imprescindibles una buena historia clínica y examen físico.

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA HAC

La primera premisa fundamental es realizar una buena selección del paciente: EL SÍNDROME DE CUSHING ES UN DIAGNÓSTICO CLÍNICO, sólo deben de realizarse pruebas diagnósticas endocrinas cuando exista una sospecha clínica de que ese paciente tenga HAC, en base a la historia clínica y examen físico, y tras una valoración analítica general.

Otra premisa primordial es evitar realizar pruebas diagnósticas para HAC en un paciente enfermo, siempre que sea posible es mejor esperar a que el paciente se haya estabilizado o recuperado de esa otra enfermedad, y entonces, si continúa la sospecha clínica de HAC, realizar las pruebas pertinentes. La única excepción a esta premisa es el paciente diabético no controlado con sospecha de HAC como causa de la resistencia a la insulina.

En aquellos pacientes en los que se encuentren indicadores para proseguir con el protocolo diagnóstico realizaremos inicialmente *pruebas de screening* (supresión con dexametasona a dosis bajas, estimulación con ACTH, ratio cortisol/creatinina en orina) y en segundo lugar y cuando las primeras hayan sido positivas, *pruebas diferenciadoras* para conocer la etiología del HAC (concentración de ACTH endógena, pruebas de imagen, supresión con dexametasona a dosis altas). Se revisarán detalles de estas pruebas en la conferencia.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Ponencias Invitadas

Notas

Actualización en el diagnóstico de las dermatofitosis en animales de compañía. Presente y futuro

David Sanmiguel Poveda

Clínica Wecan De Carreres, 03550-Sant Joan d' Alacant

Fénix Hospital Veterinario, 03202-Elche

dermvetsanmiguel@gmail.com

Las dermatofitosis son enfermedades cutáneas causadas por la infección fúngica de las estructuras queratinizadas de la piel. Están producidas por hongos antropílicos, geofílicos y zoofílicos, siendo los más comunes, *Microsporum canis*, *Nannizzia gypsea* (antes *Microsporum gypseum*) y *Trichophyton mentagrophytes*. Debido a la variabilidad de sus signos clínicos y a su naturaleza infectocontagiosa, siendo agentes potencialmente zoonóticos, es de suma importancia la realización de diagnósticos precisos y precoces que permitan implementar cuanto antes el correspondiente tratamiento etiológico, así como las necesarias medidas de prevención y seguridad ambiental.

Los signos clínicos característicos de las dermatofitosis guardan relación con la invasión de estructuras cutáneas queratinizadas, como la piel y el pelo, e incluyen presencia de eritema, pápulas, descamación, costras, taponamiento folicular, cambios en la pigmentación de la piel alteraciones de las uñas. En algunos casos se pueden producir micosis profundas (pseudomicetomas) que se manifiestan como nódulos dérmicos o subcutáneos.

El diagnóstico debe ir enfocado inicialmente hacia la confirmación de la existencia de una infección activa por dermatofitos. Posteriormente, tras la aplicación del tratamiento preceptivo, las pruebas diagnósticas deben ser capaces de confirmar la ausencia de esta infección activa.

Para poder llegar a estas conclusiones suele ser necesario realizar diferentes pruebas, consideradas complementarias.

Estas pruebas diagnósticas históricamente han incluido la observación directa del pelo y epidermis afectada mediante el uso de microscopía óptica, el examen del manto con la lámpara de Wood, los cultivos fúngicos y, en el caso de lesiones nodulares, la toma de biopsia y el estudio histopatológico de las lesiones.

Recientemente se ha documentado la utilidad diagnóstica de la dermatoscopia y la detección de ADN de dermatofitos mediante el uso de la PCR.

El fracaso de estas pruebas, que implica la aparición de resultados falsos positivos y falsos negativos suele deberse a la mala elección de las pruebas diagnósticas, el uso de un equipo inadecuado y una técnica deficiente debido a la falta de capacitación del operador.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Ponencias Invitadas

Notas

Biopsia líquida en Oncología Veterinaria

Pachi Clemente Vicario, Veterinario, Dip. ACVIM (Onco)
La Merced Veterinary Specialists. Calp (Alicante)

El cáncer es la causa principal de muerte en perros y gatos, y en muchos casos el diagnóstico se hace en fases avanzadas de la enfermedad. Un mejor conocimiento de los perfiles genéticos de diferentes tumores, junto al avance de las técnicas de estudio genético, ofrecen nuevas oportunidades en el diagnóstico de las enfermedades neoplásicas en perros.

El cáncer es una enfermedad genética y las alteraciones genéticas pueden ser somáticas (adquiridas tras el nacimiento y presentes solo en algunas células) o germinales (heredadas y presentes en cada célula del cuerpo). Las mutaciones en células somáticas afectan a oncogenes o a genes supresores de tumores. Estas alteraciones pueden ser puntuales (variante de un nucleótido), pequeñas inserciones o faltas de algunos nucleótidos, o cambios estructurales como variaciones en el número de copias (que afectan de miles a millones de bases) o como translocaciones.

La biopsia líquida se refiere al análisis de muestras líquidas, principalmente sangre, pero también otros como orina, líquido cefalorraquídeo o saliva, que se pueden obtener por métodos mínimamente invasivos. Un biomarcador de cáncer debería permitir el diagnóstico temprano, específico, y ofrecer información sobre pronóstico y tratamiento. En oncología veterinaria se han investigado algunas proteínas como la proteína C reactiva, histonas o timidina quinasa 1. Adicionalmente se puede usar la detección de células tumorales cancerígenas o bien fragmentos del ADN de las células tumorales (cfDNA por sus iniciales en inglés, cell free DNA; ctDNA de Circulating Tumor DNA). Este ADN puede ser detectado con técnicas como la secuenciación de próxima generación (NGS por sus siglas en inglés).

Los escenarios clínicos donde la biopsia líquida puede ser de ayuda en la clínica incluyen como cribado para un diagnóstico precoz, para confirmar sospechas de cáncer cuando no se pueden tener muestras para biopsias, un tras el diagnóstico para identificar potenciales dianas terapéuticas o monitorización de la respuesta al tratamiento¹.

Actualmente hay al menos tres tipos de biopsias líquidas en uso en casos oncológicos de perros, que incluyen los tests genéticos amplios como PetDx, la presencia de mutaciones puntuales como *BRAF* en orina para el diagnóstico de carcinoma de células transicionales de vejiga de la orina, o el test de nucleosomas² para el diagnóstico de linfomas, hemangiosarcomas o sarcomas histiocíticos. La sensibilidad del test de nucleosomas para la detección de 4 de los tumores más comunes en perros es del 49,8%, con una especificidad del 97%³. La sensibilidad y especificidad reportadas para PetDx en la detección de cáncer son 61,5 y 97,5% respectivamente⁴. La mutación *BRAFV595E* está presente en el 85% de los tumores uroteliales y su presencia tiene una especificidad del 100%⁵.

1. Chibuk J, Flory A, Kruglyak KM, et al. Horizons in Veterinary Precision Oncology: Fundamentals of Cancer Genomics and Applications of Liquid Biopsy for the Detection, Characterization, and Management of Cancer in Dogs. *Front Vet Sci.* 2021;8:664718. doi:10.3389/fvets.2021.664718

2. Dolan C, Miller T, Jill J, et al. Characterizing Circulating Nucleosomes in the Plasma of Dogs with Lymphoma. Published online 2021. doi:10.21203/rs.3.rs-318227/v1



3. Wilson-Robles H, Bygott T, Kelly TK, et al. Evaluation of Plasma Nucleosome Concentrations In Healthy Dogs And Dogs With A Variety of Common Cancers. Published online 2021. doi:10.21203/rs.3.rs-1193590/v1
4. O' Kell AL, Lytle KM, Cohen TA, et al. Clinical experience with next-generation sequencing–based liquid biopsy testing for cancer detection in dogs: a review of 1,500 consecutive clinical cases. *J Am Vet Méd Assoc.* 2023;261(6):1-10. doi:10.2460/javma.22.11.0526
5. Decker B, Parker HG, Dhawan D, et al. Homologous Mutation to Human BRAF V600E Is Common in Naturally Occurring Canine Bladder Cancer—Evidence for a Relevant Model System and Urine-Based Diagnostic Test. *Mol Cancer Res.* 2015;13(6):993-1002. doi:10.1158/1541-7786.mcr-14-0689

Notas

El laboratorio en leishmaniosis canina: avances en diagnóstico y monitorización

Silvia Martínez-Subiela¹, Luis Pardo-Marín¹

¹Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis (Interlab-UMU), Veterinary School, Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

La leishmaniosis canina (*L. infantum*) es una importante enfermedad a nivel mundial, endémica en muchos países entre los que se encuentran los de la cuenca mediterránea, pudiendo acabar con la muerte del animal si no se realiza un tratamiento adecuado a tiempo. La enfermedad además de afectar al perro es una zoonosis, por lo que cobra una gran importancia dentro del concepto "One-Health" .

El diagnóstico de la leishmaniosis canina supone un reto en muchas ocasiones debido a: (1) la gran variedad de signos clínicos y anomalías clínico-patológicas con las que se manifiesta, (2) la presencia de infecciones subclínicas, ya que estos animales pueden permanecer infectados subclínicamente durante largos períodos de tiempo o desarrollar cambios clinicopatológicos gradualmente a medida que avanzan hacia la enfermedad clínica (Baneth y Solano-Gallego., 2022). Además, es muy difícil predecir cuantos perros de los infectados desarrollarán finalmente la enfermedad y necesitarán tratamiento.

Pero las dificultades no terminan una vez que se ha establecido el diagnóstico, sino que otro de los principales problemas relacionados con la enfermedad se debe a que los protocolos usados para el tratamiento, normalmente, inducen una remisión clínica, pero en muy pocos casos se consigue una cura parasitológica; por lo que las recaídas son muy frecuentes, necesitándose en la mayoría de los casos varios ciclos de tratamiento (Slapendel y Ferrer, 1998).

Estas circunstancias hacen muy difícil decidir cuándo puede ser suspendida la terapia y muestran la necesidad de métodos que permitan, tanto un diagnóstico precoz de la enfermedad como una monitorización adecuada de la respuesta al tratamiento.

En esta presentación, describiremos la utilidad y posibles ventajas de nuevos sistemas que permiten evaluar la actividad de la enfermedad y monitorizar el tratamiento de la leishmaniosis canina de una forma sensible centrándonos en 3 puntos principales:

- a) Uso de Cuantileish: método de alta sensibilidad para el diagnóstico de Leishmaniosis canina tanto en suero como en saliva (Cantos-Barreda et al., 2017a,b).
- b) Uso de proteínas de fase aguda para ayudar en la caracterización clínica y el manejo de la enfermedad (Ceron et al., 2018).
- c) Uso de LCM® (Leishmania Control Marker): nuevo biomarcador para evaluar la actividad de la leishmaniosis canina y monitorizar su tratamiento.

Referencias

Baneth y Solano-Gallego, 2022. Leishmaniasis. *Vet Clin Small Anim* 52:1359–1375

Cantos-Barreda et al.,2017a. New wide dynamic range assays for quantification of anti-Leishmania IgG2 and IgA antibodies in canine serum. *Vet Immunol Immunopathol* 189:11-16.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Cantos-Barreda et al., 2017b. Quantification of anti-Leishmania antibodies in saliva of dogs. *Vet Parasitol* 15:242:54-58.

Ceron et al., 2018. Use of acute phase proteins for the clinical assessment and management of canine leishmaniosis: general recommendations. *BMC Vet Res* 14: 196.

Slapendel y Ferrer, 1998. Leishmaniasis. In: Green C.E., (ed.): *Infectious Diseases of the Dog and the Cat*. WB Saunders Co, Philadelphia.

Notas



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Comunicaciones Orales

Detección del virus de la peste porcina africana mediante un ensayo de PCR-LAMP en muestras clínicas, ambientales y no invasivas utilizando el mínimo equipamiento

Adriana Muñoz^{1, 2, 3, 4}, Liani Coronado^{1, 2, 3}, Monica Alberch^{1, 2, 3}, Jose Alejandro Bohórquez⁵, Saraswathi Lanka⁵, Carol W Maddox⁵, Alex Cobos^{1, 2, 3}, Fernando Rodríguez^{1, 2, 3} and Llilianne Ganges^{*1, 2, 3}

¹WOAH Reference Laboratory for classical swine fever, IRTA-CReSA, Barcelona, España

²Unitat mixta d' Investigació IRTA-UAB en Sanitat Animal. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA). Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Barcelona, España

³IRTA. Programa de Sanitat Animal. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA). Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Barcelona, España

⁴Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Bogotá, Colombia

⁵Veterinary Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, United States

Actualmente el virus de la peste porcina africana (VPPA) representa la mayor amenaza para la industria porcina mundial, con un alto impacto económico y graves problemas de salud y bienestar animal. En los últimos años se han producido numerosos brotes en Europa y Asia y después de 40 años de ausencia de la enfermedad el VPPA se reintrodujo en el continente americano (2021). Dada la falta de una estrategia de vacunación global contra el VPPA, el control se basa en la vigilancia a través del diagnóstico molecular. En este trabajo, utilizamos el ensayo LAMP en formato colorimétrico desarrollado recientemente, con el fin de determinar la cinética de detección de la cepa Georgia del VPPA tras la infección en 20 cerdos domésticos. Se colectó un amplio panel de muestras clínicas y tejidos, incluyendo la colección de muestras ambientales. Para la validación, todas las muestras se evaluaron previamente utilizando la técnica qPCR recomendada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA). A partir del día 3 post infección (dpi) en ausencia de signos clínicos se detectó la presencia de ADN del VPPA en sangre, suero, hisopos orales, así como diferentes tejidos, incluyendo médula ósea (de gran relevancia en el diagnóstico de virus en jabalíes). En el día 5 dpi, se detectó una fuerte carga de ADN de VPPA en las heces, así como en el aire y en las paredes del corral. La detección del ADN del VPPA se mantuvo con una alta carga en las paredes y en el aire hasta 7 dpi. Además, a los 7 dpi se detectó una carga viral muy alta en todas las muestras, exceptuando las heces fecales. Durante la presentación se discutirá sobre la aplicación de esta técnica de diagnóstico y se presentarán los niveles de detección por muestra. Finalmente, se hará énfasis en el tipo de muestras que se puede coleccionar de forma no invasiva en los animales infectados, así como en el protocolo de toma de muestras ambientales y su relevancia en el diagnóstico del VPPA.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Micobacterias ambientales y la erradicación de la Tuberculosis Bovina: mucho indicio, pero poca prueba

Alberto Gómez-Buendía^{1,2}, Javier Ortega^{1,2}, Alberto Díez-Guerrier^{2,3}, Cristina Viñolo¹, Laura Sánchez¹, Javier Bezos^{1,2}, Beatriz Romero^{1,2} y Julio Álvarez^{1,2}

¹VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

²Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

³MAEVA SERVET S.L, Alameda del Valle, Madrid, España
agbuendia@ucm.es

Las limitaciones en el rendimiento de las pruebas diagnósticas son uno de los mayores desafíos que dificultan la erradicación de la tuberculosis bovina (bTB). Las micobacterias no tuberculosas (MNT) han sido descritas como una de las principales causas de reacciones falso-positivas a la prueba oficial de erradicación de la bTB, la intradermotuberculinización (IDTB).

Con el objetivo de determinar el verdadero rol de las MNT, primero se llevó a cabo la identificación de las especies más prevalentes aisladas de animales positivos a la IDTB procedentes de explotaciones libres de bTB, para posteriormente realizar un estudio experimental en cobayas y bovinos.

Se identificaron un total de 64 especies diferentes de MNT de una muestra de 373 animales, de las que se seleccionaron las 6 especies aisladas con mayor frecuencia: *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH), *M. nonchromogenicum* (MNC), *M. avium* subsp. *avium* (MAA), *M. bourgelatii* (MB), *M. intermedium* (MI) y *M. kansasii* (MK). Estas especies se utilizaron para sensibilizar 40 cobayas, y a las 6 semanas se les inocularon intradérmicamente cuatro antígenos (PPD-bovina, PPD-aviar, P22 y ESAT6-CFP10). En general se observaron reacciones eritematosas de gran diámetro en las cobayas inoculadas con MAH, MAA y MK.

Posteriormente, se repitió el proceso de sensibilización en un modelo bovino. A los 6 meses post-inoculación se realizó la IDTB con los mismos antígenos, detectándose reacciones positivas a la PPD-bovina y aviar en bovinos sensibilizados con MAH, MAA, MI y MK. Estos resultados demuestran que ciertas especies de MNT desempeñan un papel más significativo en la interferencia del diagnóstico de la bTB, y también ponen de manifiesto que los resultados obtenidos en los modelos de cobaya y bovino no siempre coinciden.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Resistencia antibiótica en aislados de *E. coli* aislado a partir de perros con infección del tracto urinario

Ana Abad-Fau¹, Eloísa Sevilla¹, Ainara Oro, Inmaculada Martín-Burriel⁴, Bernardino Moreno^{1,2}, Mariano Morales^{1,3} y Rosa Bolea^{1,2}

¹Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2 – (Universidad de Zaragoza–CITA), Zaragoza, 50013, España

²Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes (CEETE), Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España

³Laboratorio Albéitar, Zaragoza, España

⁴Laboratorio de Genética Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2 – (Universidad de Zaragoza–CITA), Zaragoza, España

rbolea@unizar.es

E. coli es un patógeno frecuentemente aislado en casos de infección del tracto urinario, tanto en animales como en seres humanos. Además de su importancia clínica como uropatógeno, recientemente ha habido un incremento de los casos de resistencia antibiótica. Este estudio se centra en el análisis de la resistencia antibiótica y la presencia de genes de virulencia seleccionados en una población de perros con patología urinaria asociada a *E. coli*. Además, las 10 cepas con mayor número de resistencia fueron estudiadas por secuenciación completa (WGS). La identificación y resistencia antibiótica fue determinada con VITEK, mientras que los factores de virulencia fueron determinados por medio de PCR convencional. En las cepas se encontró elevada resistencia a las cefalosporinas de 1^a-3^a generación, seguido por penicilinas, fluoroquinolonas y anfenicoles. Además de ello, el 13.46 % de ellos se clasificaron como productores de beta lactamasas de espectro extendido. La mayoría de los aislados se clasificó como *E. coli* extraintestinal (ExEC), y dos aislados tuvieron genes de virulencias asociados a *E. coli* enteropatógena (EPEC). Se encontró una relación negativa estadísticamente significativa entre la presencia elevada tasa de resistencia antibiótica y la presencia de factores de virulencia. La detección de altos niveles de resistencia a antibióticos utilizados como primera elección pone de manifiesto la necesidad de una constante vigilancia de resistencia, así como una continua revisión de las guías terapéuticas para adaptarse a los rápidos cambios en los patrones de resistencia antibiótica.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Validación del kit-GPS™ MTplex dtec-qPCR para el diagnóstico de tuberculosis en rumiantes y humanos

Gema Bru¹, Aaron Navarro¹, Beatriz Romero^{3,4}, Lucía de Juan^{3,4}, Víctor Lorente-Leal³ y Antonio Martínez-Murcia^{1,2 *}

¹Genetic PCR Solutions™, 03300-Orihuela

²Universidad Miguel Hernández, 03300-Orihuela, Alicante, España.

³Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid

⁴Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid

*ammurcia@umh.es

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa zoonótica y de notificación obligatoria que continúa siendo un problema en Salud Pública y Sanidad Animal a nivel global, estando causada por las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). Hasta la fecha se han descrito dentro del CMTB varias especies filogenéticamente muy emparentadas, siendo *M. tuberculosis* el agente etiológico principal de la TB en humanos, y *M. bovis* y *M. caprae* los agentes principales de la TB en animales. Debido a la gravedad de esta enfermedad infecciosa, y con el fin de minimizar el riesgo de transmisión en y entre las distintas poblaciones diana, se está priorizando el desarrollo de sistemas de detección rápidos y precisos del CMTB, como son los basados en la PCR a tiempo real (qPCR) directamente sobre muestras clínicas. Para ello, es fundamental que estos ensayos se sometan a rigurosos ejercicios de validación analítica y diagnóstica.

El kit MTplex dtec-qPCR GPS™ contiene una serie de reactivos diseñados para la detección del CMTB. En su formato MONODOSE (tubos de PCR con reactivos deshidratados, específicos para la diana, y listos para añadir la muestra de DNA), la preparación de las reacciones de qPCR resulta una tarea simple y rápida. En el presente estudio, el kit se sometió a una validación analítica de los parámetros recomendados por la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. Los términos evaluados incluyeron la especificidad analítica (inclusividad/exclusividad), el análisis de la fase cuantitativa utilizando la calibración mediante curva estándar (10⁶-10 copias de DNA estándar), fiabilidad (repetibilidad/reproducibilidad) y sensibilidad (límites de detección/cuantificación). El ensayo con el kit MTplex dtec-qPCR superó la validación para un mínimo de 10 repeticiones con estrictos criterios de aceptación. Otros parámetros analíticos como la eficiencia, linealidad, límite de detección, los valores predictivos y razón de verosimilitud fueron validados mediante un servicio del Instituto de Salud Carlos III. La especificidad analítica *in vitro* fue testada usando material de referencia perteneciente a especies diferentes de micobacterias tuberculosas [*M. tuberculosis* H37Rv (n=1), *M. africanum* (n=1), *M. bovis* (n = 13) *M. bovis*-BCG (n=1) y *M. caprae* (n=1) y no tuberculosas *M. avium* (n = 15), *M. bourgelatti* (n = 2), *M. goodii* (n = 1), *M. intermedium* (n = 8) y *M. palustre* (n = 1)]. Los parámetros diagnósticos fueron evaluados frente a 197 muestras clínicas, de las cuales 71 correspondieron con linfonodos de origen bovino o caprino y 126 con muestras de origen humano; esputo, líquido de lavado broncoalveolar y material quirúrgico. La evaluación de la sensibilidad y especificidad diagnósticas se realizó empleando diferentes métodos como referencia. En el caso de las muestras clínicas humanas, estas fueron evaluadas por el Instituto de Salud



Carlos III (ISCIII) y el Central Tuberculosis Research Institute of Russian Academy of Medical Sciences (CTRI), este último en el marco del proyecto ARREST-TB (H2020), empleando el cultivo a partir del crecimiento en medio sólido Löwenstein-Jensen y el kit qPCR comercial AmpliTube RV kit (LLC Syntol, Rusia) como método de referencia, respectivamente. Los resultados de las muestras de origen animal se compararon con los obtenidos empleando los protocolos de cultivo microbiológico y la qPCR de referencia descritos por el EU-RL para la tuberculosis bovina (VISAVET-UCM). La capacidad diagnóstica del ensayo fue muy elevada, con valores de sensibilidad y especificidad diagnósticas del 98 % y 100 %, para las muestras clínicas humanas y del 100% para las muestras de origen animal. Finalmente, estos resultados permitieron el marcado CE/IVD del kit MTplex dtec-qPCR GPS™ para el diagnóstico clínico humano y el registro en el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España para el diagnóstico animal.

Genetic Analysis Strategies S.L. y el kit GPS™ *Mycobacterium tuberculosis* complex dtec-qPCR están registrados en el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España (MAPA) con números de autorización R-10046 y 11998-RD, respectivamente. El kit posee el marcado CE/IVD para el diagnóstico clínico en muestras humanas con N° de Licencia Sanitaria 7722-PS de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS).

Notas

Estudio de los perfiles de resistencia antimicrobiana en aves salvajes de zonas urbanas de Cataluña

Ana R. Zamora¹, Mercedes Fernández², Rafael A. Molina-López³, Gregorio Mentaberre¹, Laila Darwich²

¹Departamento de Ciencia Animal, Universidad de Lérida, 25198- Lérida, Lérida.

²Departamento de Sanidad y Anatomía Animal, Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), 08193- Cerdanyola del Vallès, Barcelona.

³Servicio de Fauna de Cataluña, Centro de recuperación de fauna de Torreferrussa, 08130- Santa Perpètua de Mogoda, Barcelona.

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una de las amenazas más importantes tanto para la salud humana como animal. La presencia de bacterias multirresistentes (MDR) se ha descrito en el ámbito de la medicina humana y de los animales domésticos, aunque hay cada vez más estudios que han demostrado la presencia de RAM en la fauna salvaje, lo que enfatiza la importancia del enfoque *One Health*. La principal causa de RAM es el uso indebido y excesivo de antibióticos, por lo que es de gran interés la realización de estudios para aumentar la concienciación de la problemática y encontrar las medidas más efectivas para prevenir la aparición de nuevas resistencias y evitar la transmisión humano-animal, y viceversa. El objetivo de este estudio es determinar la prevalencia de resistencias antimicrobianas en aves de vida libre que habitan en zonas urbanas. Los resultados preliminares de este estudio se basan en el análisis microbiológico y fenotípico de 68 muestras cloacales de diversas especies de aves urbanas que fueron atendidas en el centro de recuperación de fauna de Torreferrussa, en la provincia de Barcelona, durante el verano del 2023. Las especies más representadas entre las muestreadas fueron: *Apus spp.*, *Pica pica*, *Myopsitta monachus*, *Passer spp.*, *Hirundo rustica* y *Chloris chloris*. La selección de bacterias BMR se realizó en medio de cultivo McConkey suplementado con ceftriaxona (1 mg/mL). La identificación bacteriana se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales y el fenotipado mediante el método de Kirby-Bauer. De las 68 muestras analizadas, 45 crecieron en el medio selectivo, representando un 66% de los animales testados. Las especies bacterianas identificadas fueron: 40% *Escherichia coli*, 27% *Pseudomonas aeruginosa*, 9% *Citrobacter freundii*, 9% *Proteus spp.*, 4% *Enterobacter agglomerans*, 4% *Klebsiella pneumoniae*, 2% *Serratia marcescens*, 2% *Providencia stuartii*. El estudio de RAM mostró que el 100% de las cepas de *K. pneumoniae* y *E. agglomerans*, el 78% de las cepas de *E. coli*, y el 50% de los *Proteus spp* aislados presentaban un perfil de MDR. La mayoría de los aislados presentaron resistencia frente a las aminopenicilinas, macrólidos, fenicoles, lincosamidas y sulfonamida + trimetoprim. Además, el 80% de las cepas de *K. pneumoniae* y *E. agglomerans* presentaron resistencia a las fluoroquinolonas. En cambio, no se detectaron RAM a los carbapenemos. Este estudio demuestra (1) la importancia de tener en consideración el papel de las aves urbanas en la lucha contra la RAM y pone de manifiesto la importancia del enfoque *One Health* y (2) la necesidad de la colaboración entre profesionales de la salud humana y de la salud animal para hacer frente a este desafío, pues la presencia de bacterias BMR representa un riesgo para la salud pública, ya que puede contaminar áreas consideradas inocuas como las zonas infantiles.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Evaluación de una PCR a tiempo real para la detección del parvovirus canino en el Hospital Clínico Veterinario Complutense

Laura Leal^{1,2}, José Luis Blanco^{1,2}, Silvia Penelo³, Gustavo Ortiz-Díez⁴, Manuel Fuertes⁵, Sergio Quevedo^{1,2}, Marta E. García^{1,2}, Antonio Martínez-Murcia⁶, Beatriz Romero^{1,2,7}

¹Laboratorio de Microbiología y Parasitología. Hospital Clínico Veterinario Complutense. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid. España.

²Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid. España.

³Servicio de Urgencias y Hospitalización. Hospital Clínico Veterinario Complutense. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid. España.

⁴Departamento de Medicina Animal y Cirugía. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid. España.

⁵Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid. España.

⁶Departamento de Microbiología, Universidad Miguel Hernández, y *genetic PCR solutions™*, 03300 Orihuela, Spain

⁷Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET). Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid. España.

bromerom@ucm.es

El parvovirus canino (CPV) es una de las mayores causas de diarrea hemorrágica y mortalidad en cachorros en todo el mundo. A lo largo de los años se han desarrollado diferentes métodos diagnósticos para detectar CPV, entre los que podemos distinguir las técnicas inmunológicas como la inmunocromatografía de flujo lateral y las técnicas basadas en biología molecular, destacando la PCR a tiempo real (qPCR). Los objetivos de este estudio son la evaluación de una qPCR de CPV en heces en el Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Veterinario Complutense, y la detección de la excreción del virus vacunal, así como su posible interferencia con el diagnóstico en pacientes con sintomatología compatible con parvovirus.

Se recogieron muestras de heces de perros de distintos centros veterinarios y asociaciones, y se clasificaron en tres grupos: 1) animales sanos sin vacunar (n=30), 2) animales sanos vacunados (n=60), y 3) animales enfermos o con sintomatología clínica (n=51). Entre los animales sanos se incluyeron animales de distintas edades (< 1 año, 1-2 años, y > 2 años), y se recogieron heces el mismo día de la vacunación previamente a la misma, a las 2 semanas y a las 4 semanas post-vacunación. Para evaluar la sensibilidad de la técnica se emplearon muestras positivas mediante inmunocromatografía lateral y PCR convencional de un estudio anterior. Se realizó la extracción de ADN mediante dos kits comerciales y la PCR a tiempo real con el kit "CPV-2-FPLV MONODOSE dtec-qPCR" de genetic PCR solutions™ (GPS™). La sensibilidad diagnóstica de la qPCR para la detección de parvovirus, evaluada en los animales con sintomatología clínica (n=51), fue del 100%, observando ciclos de amplificación bajos (Cts 6,84 – 22,2). Los resultados iniciales de la qPCR para la detección de parvovirus en perros sanos sin vacunar (n=13) fueron negativos, lo que sugiere que no ha habido contacto con el virus de campo en estos animales ni se está excretando.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Atendiendo a estos resultados iniciales podemos concluir que este kit de detección de CPV presenta una buena sensibilidad y especificidad diagnóstica, por lo que podría ser utilizada como técnica de elección para el diagnóstico de esta infección.

Laura Leal es beneficiaria de un contrato financiado por la Unión Europea- Next Generation EU dentro del Programa Investigo.

Notas

Uso de la secuenciación de nueva generación en la investigación de brotes reemergentes de tuberculosis en un contexto multihospedador

Bernat Pérez de Val^{1,2*}, Carles Riera³, Albert Sanz³, Enric Vidal^{1,2}

¹ Unitat mixta d' investigació IRTA-UAB en Sanitat Animal. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), 08174-Bellaterra, Barcelona.

² IRTA. Programa de Sanitat Animal. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), 08174-Bellaterra, Barcelona.

³ Departament d' Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural (DACC) de la Generalitat de Catalunya, 08007-Barcelona.

bernat.perez@irta.cat

La tuberculosis animal es una enfermedad infecciosa causada por las bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) en diferentes especies de mamíferos domésticos y silvestres, ocasionando graves pérdidas al sector ganadero y suponiendo un riesgo de infección para las personas. Se trata de una enfermedad con una epidemiología compleja, de modo que su control y prevención requieren la implementación de medidas basadas en el conocimiento exhaustivo de las dinámicas de transmisión de CMTB y del contexto epidemiológico a nivel local y regional. En los últimos años se han desarrollado nuevas plataformas de secuenciación de nueva generación, como la secuenciación del genoma completo (SGC), con una cobertura aproximada del 99% del genoma de CMTB, que permiten investigar de forma precisa las relaciones filogenéticas entre los distintos aislados causantes de brotes de tuberculosis.

En 2017, se detectó un brote de tuberculosis por *M. bovis* en cuatro explotaciones bovinas que aprovechaban unos pastos comunales del Pirineo de Lleida. Posteriormente, el brote se extendió a 6 explotaciones más de los valles colindantes y también se aisló el mismo espigotipo (SB1337) en jabalíes y ciervos de la misma área. A pesar de que, tras un intenso testeo y sacrificio de animales positivos, en 2018 todas las explotaciones ya volvían a ser negativas, en 2021 volvió a reemerger un nuevo brote de *M. bovis* SB1337 afectando a ocho nuevas explotaciones entre 2021-2023. El análisis filogenético permitió determinar que, con muy alta probabilidad, el brote se originó en los pastos comunales donde se habrían producido múltiples eventos de transmisión y excreción de micobacterias al medio, infectando jabalíes de esa área de pastos y generando la aparición de diferentes linajes filogenéticos. A partir de aquí, tal y como sugieren los datos filogenéticos, espaciales y temporales, las explotaciones se habrían ido infectado, o bien a través del contacto directo con otras explotaciones bovinas o, en algunos casos, a través de jabalíes infectados que se habrían desplazado a los valles colindantes. Además, en una de las áreas afectadas también se produjo la infección de algunos ciervos, probablemente a través de jabalíes. Estos resultados indican que se ha establecido una comunidad de mantenimiento de tuberculosis en esta área del Pirineo, formada por bovinos y jabalíes, y que estos últimos serían los causantes de la reemergencia del brote en 2021. Finalmente, se incluyeron en el análisis cepas de un brote anterior de *M. bovis* SB1337 ocurrido en 6 explotaciones bovinas entre 2004-2006 en el Pirineo de Lleida. Se observó que los aislados de una explotación de ese brote anterior y que también estuvo implicada en el de 2017, mantenían una relación muy estrecha con los aislados recientes de esa misma explotación (ancestro común separado solamente por 7 sustituciones de



nucleótido único en once años de diferencia), sugiriendo que esta explotación podría ser el origen del brote reemergente en 2017.

El uso combinado de la epidemiología espaciotemporal y la SGC a partir de los aislados de CMTB de animales domésticos y de fauna silvestre supone un salto cualitativo en el seguimiento de los brotes de la tuberculosis animal, contribuyendo enormemente a la toma de decisiones para el control y erradicación de la enfermedad.

Estudios financiados por el *Departament d' Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural* (DACCC) de la *Generalitat de Catalunya* y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) del Gobierno de España.

Notas

¡El diagnóstico de la tuberculosis caprina puede ser la leche!

Javier Ortega^{1,2}, Carlos Velasco¹, Cristina Sanz³, José Carlos Moreno³, Lucas Domínguez^{1,2}, Mercedes Domínguez⁴, Inmaculada Moreno⁴, Julio Álvarez^{1,2}, Beatriz Romero^{1,2}, Javier Bezos^{1,2}

¹Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

²Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

³Servicio de Sanidad Animal, Junta de Extremadura, Mérida, España

⁴Unidad de Inmunología Microbiana, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, España.

La tuberculosis (TB) caprina es una zoonosis provocada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, principalmente *M. bovis* y *M. caprae*. Debido a su impacto económico y sanitario, se encuentra sometida a programas de control y erradicación. Estos programas emplean para el diagnóstico *ante-mortem* pruebas de base celular, principalmente la intradermotuberculinización simple (IDTBs) y comparada (IDTBc). En los últimos años han emergido diferentes técnicas de base humoral que permiten usar tanto muestras de suero como leche y que podrían erigirse como una herramienta diagnóstica complementaria a la IDTBs e IDTBc en el futuro. En particular, el ELISA P22 es una técnica experimental que detecta anticuerpos frente al complejo P22, obtenido a partir de la inmunopurificación de la PPD bovina. El objetivo del estudio fue la evaluación del uso del ELISA P22 como herramienta diagnóstica en muestras de suero y leche en el contexto de un programa de erradicación regional de TB caprina.

El presente estudio se realizó en el marco del programa de control y erradicación de la TB caprina iniciado en el año 2017 en la Comunidad Autónoma de Extremadura, con alta prevalencia aparente de rebaño (6% en 2017 empleando la IDTBc). Durante la campaña de saneamiento transcurrida entre 2018 y 2019, se tomaron muestras de suero y leche de un grupo representativo de caprinos de cada uno de los rebaños incluidos en el estudio (n=55) y sometidos a saneamiento (IDTBc), que fueron analizadas utilizando el ELISA P22. Previamente, los rebaños incluidos en el estudio se clasificaron en dos grupos en función a su historial epidemiológico: grupo A o de rebaños reactivos a la IDTBc (n=17) y grupo B o de rebaños no reactivos (n=38). También se recogieron muestras de tanque de leche para evaluar la capacidad diagnóstica del ELISA P22 empleando este tipo de muestras en rebaños con diferente situación epidemiológica. Una vez analizadas las muestras, se determinó el porcentaje de rebaños con muestras positivas en el grupo A y B, y se estableció el grado de acuerdo entre pruebas utilizando el índice Kappa (k).

En el grupo A, en el 41,2% (intervalo de confianza del 95%: 21,6-64,0) de los rebaños se encontraron animales positivos a la IDTBc, mientras que en el 93,7% (73,0-98,9) y 82,3% (58,9-93,8) de los rebaños se encontraron reactivos al ELISA P22 empleando muestras de suero y leche, respectivamente. En el grupo B, en el 2,6% (0,4-13,4) de rebaños se identificaron reactivos a la prueba de la IDTBc comparado con el 57,8% (42,1-72,1) y 50% (34,8-65,1) de rebaños con reactivos al ELISA P22 en muestras de suero y leche, respectivamente. El grado de concordancia entre el ELISA P22 en muestras de suero y leche fue bueno en rebaños del grupo A (k = 0,62) y moderado en rebaños del grupo B (k = 0,47), mientras que el grado concordancia entre la IDTBc y el ELISA P22 para cualquier tipo de muestra y grupo de



rebaño fue pobre ($k < 0,15$). Con respecto a los resultados del ELISA P22 en muestras del tanque de leche, la prevalencia aparente de rebaño en el grupo A fue del 46,6% (24,8-69,8) mientras que ninguno de los rebaños del grupo B reaccionaron a esta técnica. A su vez, entre los rebaños reactivos al ELISA P22 en muestras de tanque se observó una prevalencia individual de entre el 6% (2,0-15,9) y el 44% (30,9-58,8) al ELISA P22 en muestras de leche.

Los resultados del estudio pusieron de manifiesto una mayor reactividad a nivel de rebaño del ELISA P22 en muestras de suero y leche con respecto a la IDTBc, tanto en rebaños con historial previo de positivos a IDTBc como en negativos. Los datos sugieren una mayor sensibilidad y una menor especificidad del ELISA P22 en suero y leche respecto a la IDTBc, aunque la falta de resultados de lesiones y/o bacteriología no permiten de momento confirmar este hecho. No obstante, estos resultados podrían variar al compararlos con la prueba de la IDTBs, una técnica más sensible y menos específica que la IDTBc. Los resultados del ELISA P22 en muestras de tanque de leche sugieren que podría convertirse en una herramienta complementaria de vigilancia de TB caprina, aunque son necesarios estudios adicionales.

Notas

Estudio de la prevalencia y distribución espacial de la IBR en el marco del programa de control realizado por las ADSG de Galicia

C. Calvo¹, M.I. Carnero², C. Eiras², S. Martínez³, M. López¹, V. Rubinos², M.S. Polina², I. Arnaiz²

¹AGACAL-CIAM. Consellería do Medio Rural. Xunta de Galicia. Estrada de Betanzos a Mesón do Vento, km 7. Abegondo. A Coruña

²Laboratorio de Sanidade e Producción Animal de Galicia. Subdirección Xeral de Gandaría. Dirección Xeral de Gandaría, Agricultura e Industrias Agroalimentarias. Consellería do Medio Rural. Xunta de Galicia. Avda. de Madrid 77. Lugo

³Servizo de Sanidade Animal. Subdirección Xeral de Gandaría. Dirección Xeral de Gandaría, Agricultura e Industrias Agroalimentarias. Consellería do Medio Rural. Xunta de Galicia. San Caetano s/n. Santiago de Compostela. A Coruña

El objetivo del programa anual de control de IBR realizado en Galicia por las ADSG de vacuno es la disminución de la prevalencia de la enfermedad mediante la detección y eliminación progresiva de animales seropositivos con el fin de conseguir la cualificación de “explotación indemne” u “oficialmente indemne” de IBR. El programa nacional de control y erradicación de esta enfermedad establece, además, la realización de un mapa epidemiológico según las cualificaciones establecidas. Los objetivos de este trabajo fueron estudiar, en la Comunidad Autónoma de Galicia, la prevalencia de la enfermedad y su distribución espacial mediante herramientas de análisis geográfico. Para realizar el estudio se utilizaron los resultados obtenidos sobre muestras de suero mediante un ELISA para detección de anticuerpos anti-glucoproteína E del BHV-1 (IDEXX IBR gE Ab Test, IDEXX Laboratories, U.S.A.). Este enzimoimmunoensayo permite distinguir los animales infectados de los vacunados. Las analíticas se realizaron en los laboratorios de Sanidad y Producción Animal de Galicia durante los años 2019 a 2022. Una granja se consideró positiva cuando tenía al menos un animal con un resultado positivo o no concluyente en dicho ELISA. Las coordenadas geográficas y aptitud de las granjas se recogieron de las bases de datos de la Consellería do Medio Rural de la Xunta de Galicia. Los datos fueron procesados mediante los programas: IBM® SPSS® Statistic 26, ClusterSeer® v2.5 (Biomedware Inc.) y SaTScan™ v9.6 (Kulldorf, 2018). Con el programa ClusterSeer® se realizó el análisis estadístico para determinar la probabilidad de existencia de conglomerados globales mediante el método de Cuzick y Edward' s. Con el programa SaTScan™ v 9.6 se realizó el análisis puramente espacial de los resultados de cada año para detectar clústeres locales mediante el método estadístico de Bernouille. Un cluster se consideró significativo estadísticamente si $p < 0.05$. Los clústeres locales reportados son los que tienen el coeficiente de desigualdad de Gini más alto. Este coeficiente varía entre 0 y 1, un valor de 1 indica la máxima desigualdad. La prevalencia media de granjas positivas en Galicia durante los años del estudio, osciló entre el 15 y el 19%, si bien el porcentaje de positividad por animales analizados fue inferior (en torno al 3%). Los resultados obtenidos mediante el test de Cuzick y Edward's indicaron la existencia de conglomerados globales. En cuanto al análisis de clústeres Gini locales, en general, los resultados muestran la detección de clústeres con prevalencia alta en el norte y en el este de la Comunidad



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Autónoma. En las zonas donde se detectaron los clústeres Gini con una prevalencia mayor que la media, la clasificación zootécnica de las granjas es mayoritariamente de aptitud cárnica.

ClusterSeer® software for the detection and analysis of event clusters. V. 2.5.2. Copyright © 2001-2015 BioMedware INC.

IBM® SPSS® Statistic 26. Copyright IBM Corporation

SaTScan™ v 9.6: Software for the spatial and space-time scan statistics. <http://www.satscan.org/>. Kulldorf M. and Information Management Services, Inc. 2018.

Notas

Microplásticos y otras partículas artificiales en aves rapaces.

Chloe Wayman¹, Miguel González-Pleiter², Francisca Fernández-Piñas^{2,3}, Irene López-Marquez⁴, Fernando González-González⁴, Roberto Rosal^{1,*}

¹Department of Chemical Engineering, Universidad de Alcalá, E-28871 Alcalá de Henares, Madrid, España

²Department of Biology, Faculty of Science, Universidad Autónoma de Madrid, E-28049, Madrid, España

³Centro de Investigación en Biodiversidad y Cambio Global (CIBC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid. C Darwin 2, 28049 Madrid, España

⁴Group of Rehabilitation of the Autochthonous Fauna and Their Habitat (GREFA), Monte del Pilar, Majadahonda, 28220, Madrid, España

En las últimas décadas, la contaminación de microplásticos (MPs) ha incrementado exponencialmente convirtiéndose en una seria amenaza para el medio ambiente y la fauna, incluyendo las aves. El objetivo de este estudio fue investigar la presencia de MPs y partículas artificiales no plásticas (ANPPs) en los sistema digestivo y respiratorio de cuatro aves rapaces. Abarcando a dos especies urbanas, el Ratónero (*Buteo buteo*) y el Milano Negro (*Milvus migrans*); y dos especies rurales, el Gavilán (*Accipiter nisus*) y el Azor (*Accipiter gentilis*). Los datos revelaron una contaminación generalizada en todas las especies, con un promedio de 6.8 ± 1.2 de MPs y 8.4 ± 1.0 de ANPPs por individuo, destacando que todos los sistemas digestivos analizados contenían al menos un MP. Además, por primera vez, se demostró una alta incidencia de MPs en el sistema respiratorio, señalando claramente la inhalación como una vía adicional de contaminación. A pesar de que se esperaba una mayor contaminación en las aves rapaces urbanas, no se observaron diferencias significativas entre las especies urbanas y rurales. La morfología predominante de las partículas eran fibras de pequeño tamaño (>98%), compuestas mayoritariamente de poliéster, materiales acrílicos y celulosas sintéticas. Estos resultados subrayan la urgencia en profundizar en las investigaciones sobre el impacto de la contaminación por microplásticos y otros materiales antropogénicos en las aves, y en la necesidad de adoptar estrategias efectivas para mitigar la contaminación de los plásticos.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Presencia y potencial zoonótico de *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* y *Balantioides coli* en ungulados en libertad y semilibertad en España

Alejandro Dashti¹, Pamela C Köster¹, Begoña Bailo¹, Ana Sánchez de Las Matas¹, Miguel Ángel Habela², Antonio Rivero-Juarez³, Joaquín Vicente⁴, Emmanuel Serrano⁵, María C Arnal⁶, Daniel Fernández de Luco⁶, Patrocinio Morrondo⁷, José A Armenteros⁸, Ana Balseiro⁹, Guillermo A Cardona¹⁰, Carlos Martínez-Carrasco¹¹, José Antonio Ortiz¹², Antonio José Carpio¹³, Rafael Calero-Bernal¹⁴, David González-Barrio¹, David Carmena¹

¹Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.

²Departamento de Salud Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres.

³Unidad de Enfermedades Infecciosas, IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Universidad de Córdoba, Córdoba.

⁴SaBio, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC) UCLM-CSIC-JCCM, Ciudad Real.

⁵WE&H y SEFaS, Departamento de Medicina y Cirugía, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra.

⁶Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza.

⁷INVESAGA, Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo.

⁸Consejería de Desarrollo, Planificación Territorial y Medioambiente del Principado de Asturias, Oviedo.

⁹Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, León.

¹⁰Laboratorio Agropecuario, Diputación Foral de Álava, Vitoria-Gasteiz.

¹¹Departamento de Salud Animal, Facultad de Veterinaria, Campus de Excelencia Internacional de la Universidad de Murcia, Espinardo, Murcia.

¹²Medianilla S.L., Departamento de Veterinaria e Investigación, Benalup-Casas Viejas.

¹³Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC) UCLM-CSIC-JCCM, Ciudad Real.

¹⁴SALUVET, Departamento de Salud Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

La información actualmente disponible sobre la ocurrencia y diversidad molecular de los protozoos enteroparásitos *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* y *Balantioides coli* en ungulados salvajes y su papel como fuentes de contaminación medioambiental y de potencial infección humana es muy escasa. En este trabajo investigamos la presencia de estos 3 patógenos en las 8 especies de ungulados salvajes presentes en España (géneros *Ammotragus*, *Capra*, *Capreolus*, *Cervus*, *Dama*, *Ovis*, *Rupicapra* y *Sus*) obtenidos mediante métodos moleculares. Para ello se analizaron retrospectivamente muestras fecales de ungulados salvajes en libertad ($n = 1.058$) y semilibertad ($n = 324$) provenientes de las 5 bioregiones españolas. Las tasas de infección globales obtenidas fueron de 3,0% (42/1.382; IC 95%: 2,1–3,9%) para *Cryptosporidium* spp., 5,4% (74/1.382; IC 95%: 4,2–6,5%) para *G. duodenalis* y 0,7% (9/1.382; IC 95%: 0,3–1,2%) para *B. coli*. Las infecciones por *Cryptosporidium* fueron detectadas en corzos (7,5%), jabalíes (7,0%) y ciervos (1,5%), mientras que *G. duodenalis* fue hallada en rebecos, (12,9%), muflones (10,0%), cabras montés (9,0%), corzos (7,5%), jabalíes (5,6%), gamos (5,2%) y ciervos (3,8%). *Balantioides coli* solo se encontró en jabalíes (2,5%, 9/359). Los análisis moleculares revelaron



la presencia de 6 especies de *Cryptosporidium*: *C. ryanae* en ciervos, corzos y jabalíes; *C. parvum* en ciervos y jabalíes; *C. ubiquitum* en corzos; *C. scrofarum* en jabalíes; *C. canis* en corzos y *C. suis* en ciervos. Los *assemblages* zoonóticos A y B de *G. duodenalis* fueron detectados en jabalíes y ciervos, respectivamente, mientras que el *assemblage* E (particularmente adaptado a infectar ungulados) fue identificado en ciervos, muflones y rebecos. Ninguna de las muestras positivas a *B. coli* pudieron ser caracterizadas a nivel de genotipo. La presencia esporádica de variantes genéticas particularmente adaptadas a infectar cánidos (p.e., *C. canis*) y suinos (p.e., *C. suis*) en ungulados salvajes puede ser indicativo de transmisión entre diferentes especies hospedadoras, aunque las infecciones espúreas no son completamente descartables. En conclusión, los ungulados salvajes no juegan un papel significativo como reservorio de enfermedad humana por protistas enteroparásitos. Tampoco parecen ser reservorios adecuados para *B. coli*.

Notas

Empleo de la muestra de leche de tanque en el programa de control de DVB en las ADSG de Galicia

C. Calvo¹, C. Viña¹, S. Martínez³, M. López¹, V. Rubinos², C. Eiras², I. Arnaiz²

¹AGACAL-CIAM. Consellería do Medio Rural. Xunta de Galicia. Estrada de Betanzos a Mesón do Vento, km 7. Abegondo. A Coruña

²Laboratorio de Sanidade e Producción Animal de Galicia. Subdirección Xeral de Gandaría. Dirección Xeral de Gandaría, Agricultura e Industrias Agroalimentarias. Consellería do Medio Rural. Xunta de Galicia. Avda. de Madrid 77. Lugo

³Servizo de Sanidade Animal. Subdirección Xeral de Gandaría. Dirección Xeral de Gandaría, Agricultura e Industrias Agroalimentarias. Consellería do Medio Rural. Xunta de Galicia. San Caetano s/n. Santiago de Compostela. A Coruña

INTRODUCCIÓN

La determinación de anticuerpos y antígenos de la diarrea vírica bovina (DVB) en leche del tanque es una herramienta ampliamente utilizada en los programas de control. El programa voluntario de control implementado en las ADSG de Galicia forma parte, junto con el muestro de los animales jóvenes y de los incorporados, de las prácticas utilizadas para determinar el estado de la enfermedad en las explotaciones. Todas las explotaciones de aptitud láctea incluidas en el programa de DVB deben realizar como mínimo dos muestreos en leche del tanque separados seis meses para la determinación de los niveles de anticuerpos frente a la enfermedad. En las explotaciones vacunadas con vacunas vivas, este control se realiza mediante la detección de antígenos con la técnica de PCR. Este muestreo puede ampliarse en función de los riesgos sanitarios de cada explotación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos utilizados fueron los obtenidos a partir de los ensayos inmunoenzimáticos realizados sobre muestras procedentes de explotaciones lecheras incluidas en el programa de control de DVB llevado a cabo por las ADSG de Galicia. Para la determinación de la presencia de anticuerpos se utilizó un ELISA comercial para la detección de anticuerpos frente a la glucoproteína p80 (IDEXX BVDV/MD/BDV antibody test kit) que correlaciona los valores de densidad óptica corregida con la prevalencia estimada de la enfermedad. La presencia de animales con antígenos, tanto en suero como en muesca de oreja, se determinó con un kit comercial para la detección de antígenos del virus de la DVB (IDEXX BVDV Ag/Serum Plus).

RESULTADOS

En este estudio se muestran los resultados obtenidos en la monitorización de la leche del tanque en las explotaciones de aptitud láctea pertenecientes a las ADSG de Galicia. Estos resultados deben ser interpretados en función de la situación epidemiológica de la explotación, por lo que en el estudio se tienen en cuenta diferentes situaciones:

1. Explotaciones negativas, sin circulación vírica durante todo el periodo de muestreo.
2. Explotaciones con brotes recientes.
3. Explotaciones vacunadas con vacunas inactivadas.
4. Explotaciones vacunadas con vacunas vivas.



CONCLUSIÓN

La monitorización de los niveles de anticuerpos en la leche del tanque constituye una buena herramienta para determinar el estatus de la enfermedad.

Los resultados indican la necesidad de estudiar la influencia del manejo en la variación y evolución de los niveles de anticuerpos observados en la monitorización de la leche del tanque.

Notas

Exploración de la dinámica espacio-temporal del estado sanitario de la cabaña apícola en España (2012-2020)

Iratxe Perez-Cobo¹, Pilar Fernández Somalo¹, Ignacio de Blas Giral², Irene Iglesias Martín³.

¹Laboratorio Central de Veterinaria (LCV). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

²Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria de Zaragoza (Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2)). España

³Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA, INIA-CSIC). España

iperezco@mapa.es

España es uno de los principales países del sector apícola de la Unión Europea, representando aproximadamente el 16 % del total de colmenas. La producción de miel, cera y polen es una importante fuente económica, generando alrededor de 62 M€ anuales. Además, su actividad polinizadora juega un papel crucial en el mantenimiento de la biodiversidad de nuestro ecosistema y la producción agrícola, por lo que garantizar la salud y bienestar de las colonias de abejas resulta de gran relevancia. Desde el año 2012, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, a través del Programa nacional de vigilancia sobre las pérdidas de colonias de abejas, lleva a cabo evaluaciones sanitarias anuales en apiarios seleccionados al azar de toda España, empleando protocolos armonizados de recogida de datos epidemiológicos y análisis de muestras.

Este estudio se enfoca en el análisis espaciotemporal de la dinámica sanitaria apícola en España entre 2012 y 2020, con el objetivo de identificar los factores de riesgo críticos para comprender y estimar las tasas de mortalidad y vigor de las colmenas, así como determinar factores asociados, tanto de origen infeccioso, como las tasas de parasitación de *Varroa* spp. y *Nosema* spp. o loque americana, como de etiología tóxica la presencia de residuos de sustancias activas (fitosanitarios y medicamentos veterinarios). Para ello se han inspeccionado 1.143 apiarios en 2.478 visitas distribuidas en el otoño, primavera y verano, lo que ha supuesto la evaluación de 27.533 colonias seleccionadas al azar y 45.502 análisis laboratoriales.

El análisis incluyó el estudio de la distribución direccional de las tasas de mortalidad y vigor utilizando la Elipse de Desviación Estándar (SDE) con el programa ArcGIS. Además, para el estudio de agrupaciones espaciotemporales de casos y controles durante todo el periodo de estudio se aplicó el modelo Bernoulli mediante el programa SatScan.

Los principales resultados del estudio de SatScan revelaron a lo largo de este periodo agrupaciones estadísticamente significativas de apiarios con: 1) Mortalidades invernales elevadas, superior el 10%, en el Centro y oeste y noroeste de España durante la primera mitad de 2020; 2) Valores bajos de vigor (<2 en una escala del 1 al 5) otoñal en el suroeste peninsular desde 2017 hasta 2020 y primaverales en 2018 en la mitad norte peninsular. 3) Elevadas tasas de *Varroa* spp (>5%) en el valle del Ebro y zonas adyacentes, entre el otoño de 2013 y 2017 y en el Suroeste peninsular entre la primavera de 2019 y 2020 que podrían estar relacionadas con la agrupación de bajo vigor registrada para ese mismo periodo; 4) Tratamientos otoñales incorrectos en el control de *Varroa* spp. en la mitad este peninsular entre 2012 y 2014 que podría estar relacionado con la agrupación de elevadas tasas de *Varroa* spp. en el Valle del Ebro registrado en ese periodo; 5) Tasas moderadas de parasitación de *Nosema* spp. (>1.000.000 esporos/abeja) en norte de Extremadura, sur de Castilla y León y Comunidad de Madrid



entre el otoño de 2014 y 2019 que podría estar relacionado con el clúster de elevada mortalidad invernal del centro-oeste peninsular registrado en 2020; 6) Riesgo de intoxicación moderada en la mitad este peninsular en el otoño de 2012; 7) Clínica de loque americana en el norte peninsular entre el otoño de 2012 y 2016.

La información obtenida en este estudio resulta de utilidad para diseñar medidas de prevención y control de enfermedades en las poblaciones de abejas melíferas, así como para comprender los factores geográficos y estacionales que pueden afectar su salud y supervivencia.

Palabras clave: epidemiología espacial, sanidad apícola, abejas, análisis espaciotemporal, *Varroa*, *Nosema*, fitosanitarios.

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/apicola/default.aspx>

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/otras-enfermedades-abejas/otras-enf-abejas.aspx>

Notas

Estandarización del control de los reactivos de diagnóstico de uso veterinario a nivel europeo.

Isabel Gonzalo¹, Paula Macías², Rubén Villalba¹, Montserrat Agüero¹.

¹Laboratorio Central de Veterinaria (LCV). 28110 Algete. Madrid. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).

²Laboratorio Central de Sanidad Animal (LCSA) Camino del Jau s/n 18320 Santa Fe. Granada. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).

igonzalo@mapa.es

Para un correcto desarrollo de los programas de vigilancia, control y erradicación de enfermedades animales es necesario disponer de reactivos de diagnóstico fiables que hayan sido previamente validados, controlados su calidad y certificados. En este sentido, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) en mayo de 2003 aprobó la necesidad de validar y certificar las pruebas de diagnóstico de las enfermedades animales infecciosas mediante el empleo de estándares de referencia elaborados por Laboratorios de Referencia de la OMSA con el fin de avanzar hacia la armonización de las pruebas de diagnóstico. Es necesario, por tanto, el establecimiento de unas directrices que regulen de manera apropiada la autorización, fabricación, distribución y el correcto uso de dichos kits de diagnóstico veterinario.

Cada país ha regulado este ámbito de actividad dentro de sus competencias. Aunque la primera reseña legislativa en España data de 1981 (Real Decreto 183/1981), es a partir de la publicación de la Ley 8/2003, de sanidad animal, cuando se establecen las bases para la autorización y registro de los reactivos de diagnóstico antes de su puesta en el mercado, así como del control de sus lotes de producción en el caso de enfermedades objeto de programas de control y erradicación. Actualmente, el Real Decreto 867/2020 desarrolla y concreta los preceptos de esta Ley respecto a los reactivos de diagnóstico.

En Europa, ante la ausencia de metodologías comunes entre países para el control de la calidad de los reactivos de diagnóstico de uso veterinario, AFNOR, la entidad francesa de normalización impulsó a principios del 2021 la creación de un comité técnico en el seno del Comité Europeo de Normalización (CEN) para el desarrollo de normas en el ámbito de la sanidad animal, que incluyera el control de calidad de los reactivos de diagnóstico con el fin de facilitar el comercio a nivel europeo e internacional de reactivos de diagnóstico de calidad. Esta propuesta está siendo formulada a través del comité técnico europeo CEN/TC 469 "Animal Health Diagnosis", en el que participan representantes sectoriales de los diferentes países europeos, entre ellos España.

La presente comunicación está orientada a describir los trabajos desarrollados en el seno de dicho comité, y evaluar las repercusiones que las normas que surjan del mismo pueden tener a medio y largo plazo en el ámbito de la autorización y registro de los reactivos de diagnóstico a nivel europeo.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Metabolómica aplicada al diagnóstico de la tuberculosis caprina, ¿funciona?

Pilar Alonso-Moreno¹, Javier Ortega^{2,3}, Carlos Velasco², Alba López¹, Jose L. Izquierdo-García^{1,4,5}, Javier Bezos^{2,3}

¹Instituto Pluridisciplinar, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, España

²Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), UCM

³Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, UCM

⁴Departamento de Química en CC. Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, UCM

⁵CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

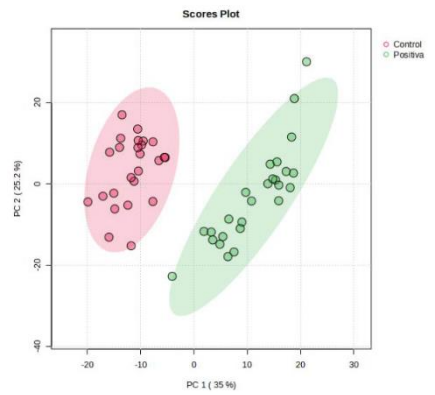
El diagnóstico ante-mortem de la tuberculosis (TB) en animales, especialmente en rumiantes domésticos (ganado bovino y caprino), sigue siendo un desafío significativo. Esta dificultad, junto con otros factores, influye en la complejidad de controlar y erradicar esta grave enfermedad en numerosos países. El ganado bovino y caprino se considera el principal reservorio doméstico de la tuberculosis animal y la principal fuente de casos de tuberculosis TB humana de origen animal (zoonosis). Por tanto, se continúa investigando intensamente para mejorar las técnicas de diagnóstico existentes y desarrollar nuevas herramientas que contribuyan a la erradicación de esta enfermedad. En esta línea, previamente validamos con éxito un enfoque metabolómico que emplea la resonancia magnética nuclear (RMN) para el diagnóstico de la TB en ganado bovino. El presente estudio tuvo como objetivo establecer y evaluar el análisis metabolómico mediante RMN para el diagnóstico de la tuberculosis caprina.

Para ello, recolectamos muestras de suero de 51 cabras de una granja que mantenía dos rebaños independientes, uno infectado de TB, del cual se recogieron 26 muestras de animales positivos, y otro libre (control), del que se tomaron 25 muestras de animales negativos. Las muestras positivas y negativas se seleccionaron con base a análisis previos mediante la prueba de la intradermotuberculina simple (IDTBs) y la prueba de detección de interferón-gamma. Las muestras se sometieron a un proceso de filtración por ultracentrifugación para eliminar las señales de macromoléculas, como lípidos y proteínas, y posteriormente se analizaron mediante un espectrómetro de RMN Bruker AVIII de 700 MHz. Las señales espectrales se analizaron en primer lugar mediante un análisis multivariante no supervisado (Análisis de Componentes Principales, PCA) y, a continuación, un análisis multivariante supervisado (Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales, PLS), utilizando la aplicación web Metaboanalyst para identificar las diferencias entre los grupos.

El análisis no supervisado PCA reveló una discriminación clara entre el grupo con TB y el grupo de control (ver Figura 1). El análisis supervisado corroboró esta separación con una tasa de acierto del 100% en la validación cruzada ($R^2=0.95$; $Q^2=0.93$). Asimismo, logramos identificar 15 metabolitos endógenos que mostraron diferencias significativas entre los animales con TB y los animales de control. Estos resultados, sumados a los obtenidos previamente en ganado bovino, respaldan nuestra aproximación metabolómica como una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico ante-mortem de esta enfermedad en diversas especies animales.



Figura 1: Análisis de Componentes Principales (PCA) de espectros de plasma sanguíneo medidos mediante Espectroscopía de RMN. La gráfica de "scores" claramente separa el grupo TB (verde, positivo) del grupo control (rojo, negativo). El PC1 y el PC2 son capaces de explicar el 60% de la varianza total entre muestras.



Notas

Relaciones epidemiológicas y dónde encontrarlas: el uso de la secuenciación masiva de genomas para reforzar los estudios epidemiológicos de la TB animal en la Comunidad de Madrid

Víctor Lorente-Leal¹, Pilar Pozo Piñol², Alexandra Gutiérrez Tobaruela¹, Cristina Viñolo Águeda¹, José Luis Sáez Llorente³, Javier Bezos Garrido^{1,4}, Lucía de Juan Ferré^{1,4}, Julio Álvarez Sánchez^{1,4} y Beatriz Romero Martínez^{1,4}.

¹Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid.

²Grupo SaBio, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas & Universidad de Castilla-La Mancha, 13005-Ciudad Real

³Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 28071-Madrid

⁴Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid.

vicloren@ucm.es

La tuberculosis (TB) animal es una enfermedad infectocontagiosa producida por micobacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) que afecta principalmente a los mamíferos. Además de su relevancia en sanidad pública debido a su carácter zoonótico, esta enfermedad tiene un gran impacto en la ecología, el bienestar y la producción animal. Por ello, su control y erradicación en el ganado bovino, la especie doméstica más afectada, han sido objetivos importantes en la Unión Europea y España en las últimas décadas. Una piedra angular de la erradicación consiste en identificar y diferenciar los brotes de TB, lo cual se fundamenta en el uso de técnicas genéticas y estudios de epidemiología molecular. Tradicionalmente, las técnicas empleadas para tal cometido, el espigotipado y los MIRU-VNTR, se basan en una pequeña porción del genoma micobacteriano. A pesar de su uso extendido y gran utilidad, estas técnicas presentan una baja resolución debido a la naturaleza clonal de los miembros del CMTB, por lo que su aplicación en estudios de brotes se ve limitada en determinados contextos epidemiológicos. En los últimos años ha aumentado el interés por el uso de la secuenciación masiva de genomas (WGS por sus siglas en inglés), debido a su gran capacidad de análisis y resolución al nivel de nucleótido.

El objetivo de este estudio fue evaluar el uso de la WGS para determinar la diversidad genética de *M. bovis*, el agente etiológico principal de la TB animal en nuestro país, en la Comunidad de Madrid (CM), con el fin de generar mapas genéticos que puedan ser de utilidad en el estudio de brotes de TB animal en el futuro. Se seleccionaron 248 aislados de *M. bovis*, procedentes en su mayoría de ganado bovino (86,69%; n = 215), obtenidos entre los años 2015 y 2022. Los aislados procedieron de 135 unidades epidemiológicas (U.E.) (mediana: 1 aislado por localización [rango intercuartílico: 1-2]), incluyendo 118 explotaciones ganaderas, en 43 municipios de la CM. Los aislados fueron secuenciados mediante tecnología Illumina y se identificaron los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) presentes en las secuencias obtenidas frente a un genoma de referencia empleando la herramienta bioinformática vSNP 2.0. Se realizó un análisis de conglomerados mediante BAPS para identificar y definir posibles clados y subclados genéticos.



Se identificaron cuatro clados genéticos con una elevada diversidad intra-clado (distancia mediana: 51-563 SNPs) que corresponde con la gran diversidad de espilogotipos muestreados y podría reflejar el largo historial de endemidad de la TB animal en la CM y el resto de España. Se detectó una elevada diversidad intra-rebaño, donde el 76,5% de las U.E. presentó una distancia genética máxima > 5 SNPs, lo cual sugiere múltiples introducciones de la infección y/o una fuente de infección con una elevada diversidad. Por otro lado, la similitud genética aumentó entre pares de aislados procedentes de U.E. distintas a medida que la distancia geográfica disminuyó, lo cual podría sugerir que las U.E. con aislados muy similares podrían estar relacionadas por cercanía y/o compartir factores de riesgo tales como pastos comunales, movimientos de animales infectados no detectados mediante las técnicas diagnósticas *ante mortem* o la presencia de fauna salvaje infectada.

Este estudio refleja el gran valor añadido que ofrece la WGS para el estudio epidemiológico de la TB animal en la CM, y por extensión, al resto de España. La detección de posibles agrupaciones geográficas en determinados aislados de *M. bovis* sugiere la presencia de vínculos entre U.E., lo cual podría ser de ayuda para identificar factores de riesgo e implementar medidas de contingencia con las que limitar la extensión de la enfermedad.

Notas

Un prototipo de vacuna oral frente a PTB no interfiere con el diagnóstico de la tuberculosis bovina y aumenta la actividad de los fagocitos en un modelo caprino

Elena Molina, Mariví Geijo, Maitane Múgica, Maddi Oyanguren, Joseba M Garrido, Natalia Elguezabal
Departamento de Sanidad Animal, NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario-BRTA

La paratuberculosis bovina (PTB) es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). Se trata de una enfermedad lenta que cursa con una enteritis granulomatosa que causa grandes problemas económicos en las granjas de rumiantes a nivel mundial. Además, Map impacta en la Salud Pública debido a su controvertida aunque cada más aceptada relación con la Enfermedad de Crohn en humanos.

Hasta la fecha, la vacunación ha sido definida como el mejor método de control en relación al costo/beneficio. Sin embargo, las vacunas disponibles en la actualidad muestran interferencia con las técnicas de diagnóstico utilizadas en los Programas Oficiales de Erradicación de la Tuberculosis Bovina (bTB) por lo que su uso está restringido en ganado bovino en la mayor parte del mundo.

Por ello, se planteó el desarrollo de un prototipo vacunal frente a PTB (Vk1c) que no causara interferencia con las pruebas oficiales de diagnóstico de bTB y que mostrase al menos el mismo nivel de protección que las vacunas actuales. Este prototipo en estudios iniciales mostró ausencia de interferencia con las técnicas de rutina utilizadas en los programas Oficiales de Erradicación de la bTB ofreciendo los mismos niveles de protección que Silirum®, basados en carga de Map en tejidos (reducción del 75%) en un modelo de infección en conejos. Además, en este modelo, la administración de VK1c fue capaz de aumentar la actividad de las funciones antibacterianas de los neutrófilos y la respuesta inmunitaria de mucosas.

En este estudio se ha utilizado el prototipo Vk1c en la especie caprina como modelo previo al bovino, la especie de destino de la vacuna. Se ha evaluado una pauta de vacunación de dos dosis separadas por 4 semanas utilizando tanto la vía oral (n=3), como la vía intradérmica (n=3). A los 76 dpv de la primera dosis se realizó la intradermorreacción con los antígenos PPD av y PPD bov para evaluar la posible interferencia del prototipo en el diagnóstico de la TB. Con el fin de evaluar la producción de IFN-gamma, la actividad fagocítica y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) frente a Map se realizaron extracciones de sangre a antes de la vacunación (tiempo 0), 28 días post-vacunación (dpv) de la primera dosis y 56 dpv de la primera dosis.

La vía intradérmica mostró interferencia con ambos antígenos (PPD av: 3,3 +/- 2,5 mm, PPD bov: 10,6 +/- 7,2 mm), mientras que la vía oral presentó una ausencia absoluta de interferencia. VK1c ha mostrado una activación de la fagocitosis y de la producción de ROS frente a Map que ha ido en aumento a través del tiempo, tanto en neutrófilos como en monocitos sin diferencias significativas entre ambas vías de aplicación. A falta de aumentar el tamaño de la muestra y realizar un desafío con Map para demostrar la protección *in vivo*, los resultados obtenidos indican que el prototipo Vk1c por vía oral puede activar los fagocitos de forma similar a la vía intradérmica sin comprometer el diagnóstico de rutina utilizado en los programas oficiales de erradicación de la bTB.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Vacunas vectoriales para aves de corral: ensayos serológicos innovadores para el seguimiento de la vacunación y las pruebas DIVA de la gripe aviar A H5

S. Lesceu¹, M. Gaimard^{1*}, C. Redal¹, J.E. Drus¹, C. Lefebvre¹, I. Garcia-Pastor², A. Castillo¹ y P. Pourquier¹

¹Innovative Diagnostics, Grabels, Francia

²Innovative Diagnostics, Madrid, España

* e-mail: marina.gaimard@innovative-diagnostics.com

Los virus de la gripe pertenecen a la familia Orthomyxoviridae. Existen cuatro tipos de virus de la gripe: A, B, C y D, que se definen por la naturaleza de su antígeno interno de la nucleocápside. El tipo A es el género más conservado y puede dividirse a su vez en subtipos basados en sus antígenos Hemaglutinina y Neuraminidasa. Algunos subtipos que contienen H5 o H7 están asociados a formas altamente patógenas de la enfermedad y a una elevada tasa de mortalidad. Un linaje actual de Influenza Aviar Alta Patogenicidad (IA AP) H5 circula por todo el mundo desde 2004, y ha sido responsable de importantes pérdidas de aves de corral. Para controlar las enfermedades aviarias se recurre cada vez más a la vacunación, especialmente con la tecnología de vacunas recombinantes. En los últimos 5 años, las sucesivas oleadas de gripe H5 en Europa empujaron a las autoridades sanitarias a revisar su estrategia de vacunación contra este virus. Dada la necesidad de herramientas serológicas rápidas y fiables para la monitorización de la vacunación, IDvet ha desarrollado ELISAs indirectos únicos: uno, basado en la proteína recombinante H5, para la monitorización de vacunas recombinantes, y otro, basado en la proteína NP, para la estrategia DIVA (animales infectados diferenciados de los vacunados). Se analizaron bandadas de ponedoras y pollos de engorde vacunados con diferentes tecnologías de vacunas (ARN H5, r-HVT-AI(H5) o vacunas inactivadas de subunidades AIV-H5). Los títulos de anticuerpos contra H5 se evaluaron mediante el iELISA H5. También se analizaron muestras con la prueba NP iELISA para controlar el desafío de campo. Para cada lote analizado, se midieron los siguientes parámetros: títulos medios, mínimos, máximos y CV%. Todas las muestras con títulos superiores a 732 para H5 iELISA, y superiores a 668 para NP iELISA, se consideraron positivas. Todas las bandadas vacunadas con vacunas H5 dieron positivo en la prueba H5 iELISA. Algunas de ellas también dieron positivo en la prueba de la nucleoproteína. Por consiguiente, la positividad de la iELISA H5, perteneciente a bandadas negativas con la iELISA NP, demostró la detección de seroconversión inducida por vacunas. La positividad del ELISA NP en algunos lotes puso de manifiesto la presencia de desafío con una cepa HxNy. El ELISA indirecto H5 presentado es la única prueba cuantitativa para la detección específica de anticuerpos H5 que permite el seguimiento de la vacunación H5. El ELISA indirecto NP es una excelente herramienta para la detección del virus salvaje en poblaciones vacunadas con la vacuna recombinante H5.

Palabras clave: vacunas vectoriales; seguimiento de la vacunación; ELISA innovador



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Evaluación de la extracción automatizada de ADN del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de tejidos para su detección mediante PCR a tiempo real

Víctor Lorente-Leal¹, Laura Sánchez Martín¹, Tatiana Alende García¹, Francisco Javier Lozano Barrilero¹, José Luis Sáez Llorente², Javier Bezos Garrido^{1,3}, Lucía de Juan Ferré^{1,3} y Beatriz Romero Martínez^{1,3}.

¹Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid.

²Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 28071-Madrid

³Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid.

vicloren@ucm.es

La Directiva 2016/429 (Ley de Sanidad Animal) autoriza a los Países Miembro de la Unión Europea (UE) el empleo de la detección de ácido nucleico mediante PCR a tiempo real (qPCR directa) para confirmar los casos sospechosos de la infección por los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), en el marco de los programas de erradicación de la tuberculosis bovina. Aunque la qPCR es una técnica con una mayor sensibilidad y rapidez que el cultivo microbiológico, comúnmente considerada la técnica de referencia, su rendimiento viene determinado en gran medida por el método de extracción empleado para aislar el material genético del CMTB en tejidos frescos. Tradicionalmente, las extracciones de ADN a partir de tejido se han realizado empleando columnas de sílice. Sin embargo, estos métodos son difícilmente escalables y su éxito radica en el pH de los tampones y el mantenimiento de la integridad de las columnas empleadas durante el proceso. En los últimos años ha aumentado el interés por los protocolos de extracción basados en cuentas magnéticas como una alternativa fácilmente automatizable y con una mayor capacidad de muestras.

El objetivo de este estudio fue evaluar el rendimiento del kit MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit y el sistema KingFisher™ Flex de ThermoFisher Scientific (MgMx-KF) para la extracción de ADN del CMTB en muestras de animales. Para ello, se seleccionaron 96 muestras de tejido procedentes de ganado bovino (n = 75) y caprino (n = 21) que habían dado positivo (n = 47) o negativo (n = 49) al aislamiento de miembros del CMTB por cultivo microbiológico. Se procedió a la extracción del ADN a partir de los homogeneizados de tejido empleando el protocolo MgMx-KF y se detectó el ADN del CMTB empleando el kit de qPCR VetMAX™ *M. tuberculosis* Complex (ThermoFisher) (VM-TF) y una qPCR basada en la detección de la IS6110 y el kit QuantiFast Pathogen + IC (Qiagen) (qPCR EU-RL) [1]. Los resultados se compararon con aquellos obtenidos empleando sendas qPCRs con ADN extraído mediante el kit basado en columnas DNEasy Blood & Tissue (Qiagen).

Se detectó ADN del CMTB mediante ambos protocolos de extracción en 46 muestras cultivo positivas, y ninguna de las muestras negativas al cultivo dio positivo a ambas qPCRs, obteniéndose así una sensibilidad y especificidad diagnóstica del 97,87% [95% IC: 88,71-99,95%] y 100,00% [92,75-100,00%], respectivamente. La concordancia entre qPCRs fue elevada [$\kappa = 0,96$; 95% IC: 0,90-1,00], detectándose tan sólo una discordancia entre qPCRs y entre métodos de extracción. Se detectó un mayor número (10,4%; n = 10) de inhibiciones al emplear la qPCR EU-RL en las extracciones MgMx-KF, todas ellas en muestras negativas. Los resultados de esta evaluación reflejan un elevado rendimiento del kit MgMx-



KF para la extracción de ADN del CMTB, así como de las qPCRs analizadas para detectarlo. Esto sugiere que el kit MgMx-KF puede ser una buena alternativa para escalar y automatizar los procesos de extracción de ADN en tejidos animales. La detección de un mayor número de inhibiciones en la qPCR EU-RL podría estar relacionada con una mayor concentración de ADN del hospedador, debido al mayor volumen de muestra procesado. Esto podría sugerir la necesidad de adaptar este protocolo a la hora de analizar extractos obtenidos mediante el MgMx-KF.

[1] Lorente-Leal, V., Liandris, E., Pacciarini, M., Botelho, A., Kenny, K., Loyo, B., Fernández, R., Bezos, J., Domínguez, L., de Juan, L., Romero, B., 2021. Direct PCR on Tissue Samples To Detect *Mycobacterium tuberculosis* Complex: an Alternative to the Bacteriological Culture. *Journal of Clinical Microbiology* 59, 16.

Notas

Presencia y diversidad de subtipos de *Blastocystis* en jabalíes (*Sus scrofa*) de la Península Ibérica

Pamela C. Köster¹, Ana Figueiredo², Jenny G. Maloney³, Alejandro Dashti¹, Aleksey Molokin³, Nadja George³, Begoña Bailo¹, Rita T. Torres², Carlos Fonseca², Atle Mysterud⁴, Miguel Á. Habel⁵, Antonio Rivero-Juarez⁶, Joaquín Vicente⁷, Emmanuel Serrano⁸, Arnal MC⁹, Daniel Fernández de Luco⁹, José A. Armenteros¹⁰, Ana Balseiro¹¹, Guillermo A. Cardona¹², João Carvalho², Dário Hipólito², Joana Fernandes², Josman D. Palmeira², David González-Barrio¹, Monica Santin³, David Carmena¹

¹Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España.

²Departamento de Biología - CESAM, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

³Environmental Microbial and Food Safety Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Beltsville, Maryland, USA

⁴Centre for Ecological and Evolutionary Synthesis, Department of Bioscience, University of Oslo, Oslo, Norway

⁵Departamento de Salud Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres.

⁶Unidad de Enfermedades Infecciosas, IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Universidad de Córdoba, Córdoba, España.

⁷SaBio, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC) UCLM-CSIC-JCCM, Ciudad Real, España.

⁸WE&H y SEFaS, Departamento de Medicina y Cirugía, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, España.

⁹Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza.

¹⁰Consejería de Desarrollo, Planificación Territorial y Medioambiente del Principado de Asturias, Oviedo, España.

¹¹Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, León, España.

¹²Laboratorio Agropecuario, Diputación Foral de Álava, Vitoria-Gasteiz, España.

La creciente expansión y sobreabundancia de las poblaciones de jabalíes en toda Europa han aumentado los conflictos entre humanos y estos animales de vida libre, incluyendo la transmisión de patógenos emergentes de relevancia zoonótica. *Blastocystis* (Stramenopile) es un protista ubicuo de transmisión fecal-oral que puede causar enfermedad gastrointestinal en una gran diversidad de mamíferos (incluyendo al hombre), aves y reptiles. Actualmente no se comprende suficientemente el papel de la fauna salvaje en la epidemiología de *Blastocystis*. En un intento de paliar este déficit de conocimiento, en este trabajo hemos investigado la presencia y diversidad de subtipos de *Blastocystis* en jabalíes de la Península Ibérica utilizando métodos moleculares incluyendo PCR convencional y secuenciación de nueva generación del gen *ssu* rRNA del protista. Para ello se recogieron un total de 464 muestras fecales de jabalíes en diferentes regiones de España ($n = 360$) y Portugal ($n = 104$) entre 2014–2021. De forma global, *Blastocystis* fue detectado en el 16,2% (75/464; IC 95%: 12,9–19,8) de los jabalíes ibéricos analizados, siendo su presencia significativamente más frecuente en animales provenientes de Portugal (37,1%, 39/104; IC 95%: 28,5–46,7) que de España (10,0%, 36/360; IC 95%: 7,1–13,6). Un total de 13 subtipos (ST) de *Blastocystis* fueron identificados en las



poblaciones de jabalíes investigadas, incluyendo ST5, ST10a/b, ST13–15, ST21, ST23, ST24a/b/c, ST25, ST26, ST30, ST43 y ST44. Independientemente de su origen, ST5 fue el subtipo más prevalentemente hallado (92–100%), indicando que esta variante genética está particularmente adaptada a infectar jabalíes. Comparadas con sus homónimas españolas, las poblaciones de jabalíes portugueses presentaban una mayor diversidad de subtipos (13 vs. 2, respectivamente) y de co-infecciones por dos o más STs de *Blastocystis* (33,3% vs. 4,5%, respectivamente). Estos resultados indican que los jabalíes ibéricos son reservorio adecuado para una gran diversidad de ST de *Blastocystis*, incluyendo variantes genéticas con potencial zoonótico (ST5, ST10, ST14 y ST23). La mayor variabilidad de STs detectada en las poblaciones de jabalíes procedentes de Portugal puede ser debida a eventos de transmisión inter-especies (particularmente bovinos, ovinos y caprinos) compartiendo hábitat.

Notas

Evaluación del rendimiento del ensayo de liberación de IFN- γ en rebaños oficialmente libres de tuberculosis bovina en cinco países europeos

Alberto Gómez-Buendía^{1,2}, Beatriz Romero^{1,2}, Javier Bezos^{1,2}, Francisco Lozano¹, Cristina Viñolo¹, José Luis Sáez³, Ivonne Archetti⁴, María Laura Boschiroli⁵, Emanuela Gutu⁶, Ourania Karaoulani⁷, Lucía de Juan^{1,2} y Julio Álvarez^{1,2}

¹VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

²Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

³Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, Dirección General de la Producción Agraria, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España

⁴National Reference Centre for Bovine Tuberculosis, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italia

⁵National University Paris-Est, Laboratory for Animal Health, Tuberculosis National Reference Laboratory, ANSES, Maisons-Alfort, Francia

⁶Institute for Diagnosis and Animal Health, Bucarest, Rumanía

⁷National Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Directorate of Veterinary Centre of Athens, Ministry of Rural Development and Food, Atenas, Grecia

agbuendia@ucm.es

Los métodos utilizados para diagnosticar y mantener el estatus oficial de libre de tuberculosis (OTF) en el ganado bovino y para permitir su movimiento intracomunitario son la intradermotuberculinización (simple o comparada) y el ensayo de liberación de interferón (IFN)- γ (IGRA). Hasta ahora, los IGRA se han empleado principalmente en explotaciones infectadas, junto con las pruebas cutáneas, para detectar la mayor cantidad de animales infectados posible. Sin embargo, es necesario evaluar el desempeño de los IGRA en rebaños OTF para garantizar que su especificidad sea igual o superior a la de las pruebas cutáneas, sin reducir su sensibilidad. Para este propósito, se recolectaron 4,365 muestras de plasma de 84 rebaños OTF en seis regiones europeas (cinco países) y se analizaron utilizando dos kits IGRA: ID Screen[®] Ruminant IFN-g (IDvet) y Bovigam[™] TB Kit (Bovigam). Los resultados se evaluaron utilizando diferentes criterios de corte, y se investigó el impacto de diversos factores a nivel de rebaño y de animal en la probabilidad de obtener un resultado positivo en la prueba. Esto se realizó mediante modelos de regresión logística multivariable jerárquica bayesiana. La prevalencia de animales reactivos osciló entre el 1,7% y el 21,0% (usando el criterio de corte $S/P \geq 35\%$ para IDvet) y entre el 2,1% y el 26,3% (usando el criterio de corte $OD_{bovis} - OD_{PBS} \geq 0,1$ & $OD_{bovis} - OD_{avium} \geq 0,1$ para Bovigam), dependiendo de la región. Se observó un mayor número de animales reactivos en todas las regiones al utilizar el kit Bovigam. Los resultados sugieren que la especificidad de los IGRA puede verse influenciada por el tipo de producción, la edad y la región de origen de los animales. Al ajustar los criterios de corte, se podrían obtener valores de especificidad superiores al 98-99% en ciertas poblaciones de rebaños OTF. Sin embargo, no se identificó ningún punto de corte que resultara en una especificidad lo suficientemente alta (igual o superior a la de las pruebas cutáneas) en todas las poblaciones. Por lo tanto, realizar un análisis exploratorio de la reactividad basal al IFN- γ



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

en las poblaciones de rebaños OTF podría ser útil para evaluar la utilidad de esta técnica en el mantenimiento del estatus de OTF.

Notas



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Comunicaciones Póster

Primer caso reportado: aislamiento de *Escherichia coli* y *Pseudomonas* sp. en un pollo de buitres negro (*Aegypius monachus*) con celomitis bacteriana.

Alberto Alvarado¹, Alicia Carrero¹, Irene López¹, Laura Suárez^{1,2}, Virginia Moraleda¹, Natalia Pastor¹, Sonsoles Maestro¹, Carles Juan-Sallés³, Fernando González^{1,4}.

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

²Universidad Complutense, Facultad de Veterinaria, Departamento de Anatomía y embriología veterinaria. Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid. España

³Noah's Path. C/Arquitecto Santiago Pérez Aracil, 30 bajo, 03203 Elche, Alicante. España.

⁴Universidad Complutense, Facultad de Veterinaria, Departamento de Farmacología y Toxicología veterinaria. Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid. España

alberto@grefa.org

Tanto *Escherichia coli* como *Pseudomonas* spp. son bacterias causantes de colibacilosis¹ y neumonías² en neonatos aviares. Ambos agentes, cuya patogenicidad puede ser favorecida por la inmadurez del sistema inmune en pollos, pueden contribuir a mortalidad neonatal en aves. El fracaso reproductor es un gran condicionante de la dinámica de las poblaciones silvestres aviares³, especialmente si se sostiene en el tiempo. En el caso del buitres negro (*Aegypius monachus*), por su estado de conservación, es de vital importancia conocer las causas de mortalidad de los neonatos para poder mejorar el estado de las poblaciones salvajes.

Se describe por primera vez el hallazgo de *E. coli* y *Pseudomonas* sp. en un pollo de buitres negro nacido en las instalaciones de GREFA. Tras una semana de vida, el paciente comenzó a presentar decaimiento, tras lo cual recibió tratamiento veterinario. Ese mismo día se encuentra muerto en la incubadora. Se realiza el examen microscópico con toma de muestras para cultivo microbiológico de distintos órganos y tejidos, y estudio anatomopatológico para esclarecer la causa de la muerte. Macroscópicamente, se observó hepatomegalia y enrojecimiento pulmonar.

El estudio anatomopatológico reveló una celomitis fibrinosa y atelectasia pulmonar con parabrónquitis leve; tanto en la celomitis como en la parabrónquitis se observaron bacilos. Se aisló *E. coli* en vitelo e hígado y *Pseudomonas* sp. en pulmón. Ambas bacterias aisladas pudieron causar estas lesiones y, en este sentido, se trata de patógenos importantes en aves jóvenes, aunque la cepa de *E. coli* no fue tipificada. *Pseudomonas aeruginosa* puede causar brotes de enfermedad en nurserías aviares.²

1 - Lutful Kabir SM. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. Int J Environ Res Public Health. 2010 Jan;7(1):89-114. doi: 10.3390/ijerph7010089. Epub 2010 Jan 12. PMID: 20195435; PMCID: PMC2819778.

2 - Rosas-Rosas AG, Pérez JG, Parás A, Benítez MA, Juan-Sallés C, et al: Diagnostic investigation of *Pseudomonas aeruginosa* infection in chicks of golden eagle (*Aquila chrysaetos*), scarlet macaw (*Ara macao*) and horned guan (*Oreophaps derbianus*) in captivity. Proc AAZV AAWV Joint Conference 2009, pág 34.

3 - De la Puente, Javier. Fracaso reproductor en una población de buitres negros *Aegypius monachus* del centro de España. En: Arenas, R. M. y Dobado, P. M. (coords.). The Black Vulture: Status, Conservation and Studies. Diputación de Córdoba. Córdoba.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

https://www.researchgate.net/publication/271644784_Fracaso_reproductor_en_una_poblacion_de_buitres_negros_Aegyptius_monachus_del_centro_de_Espana_En_Arenas_R_M_y_Dobado_P_M_coords_The_Black_Vulture_Status_Conservation_and_Studies_Diputacion_de_Cordoba_

Notas

Análisis de Sensibilidad Antibiótica en *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* Aislados de Muestras de Orina Canina

Ana Abad-Fau¹, Bernardino Moreno^{1,2}, Rosa Bolea^{1,2} y Mariano Morales^{1,3*}

¹Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2 – (Universidad de Zaragoza–CITA), Zaragoza, 50013, España

²Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes (CEETE), Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España

³Laboratorio Albéitar, Zaragoza, España

*mariano@albeitar.com

Las infecciones del tracto urinario (ITU) en perros son un problema de salud común que requiere un tratamiento efectivo. Aunque *E. coli* es la principal bacteria aislada, los enterococos son uno de los patógenos más frecuentes en infecciones recurrentes. Además, existe una preocupación creciente sobre los enterococos como transmisores de resistencias antibióticas a la especie humana, debido a su intrínseca resistencia a múltiples antibióticos.

En este estudio, se aislaron dos especies de bacterias, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*, a partir de muestras de orina de perros con ITU, en las cuales se habían descartado otros patógenos. En todos los aislados se realizaron análisis de sensibilidad antibiótica utilizando el sistema VITEK.

Los resultados revelaron diferencias significativas en la resistencia a los antibióticos, en particular en el grupo de estreptogramina ($p = 0.004$), entre *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*. *E. faecium* mostró resistencia en todos los aislados ($n = 6$) cuando se evaluaron antibióticos de este grupo, mientras que en *E. faecalis* se encontró un solo caso resistente y siete susceptibles.

Además, se observó que las cefalosporinas (desde la primera hasta la quinta generación) y la oxacilina (del grupo de las penicilinas) presentaron altos niveles de resistencia en ambas especies, incluso cuando otras penicilinas eran sensibles. En cuanto a la prevalencia por grupos de antibióticos, se destacaron las fluoroquinolonas (con un 93% de resistencia), las cefalosporinas (con un 100% de resistencia) y las penicilinas (con un 96% de resistencia). Por otro lado, todas las cepas estudiadas mostraron susceptibilidad a los anfenícolos, en particular al cloranfenicol.

Estos hallazgos resaltan la importancia de una selección de antibióticos cuidadosa y basada en pruebas de sensibilidad al enfrentar infecciones del tracto urinario en perros. La identificación de diferencias significativas en la resistencia a antibióticos específicos entre *E. faecium* y *E. faecalis* resalta la importancia de un enfoque individualizado en el tratamiento de infecciones urinarias en perros. La selección adecuada de antibióticos basada en pruebas de sensibilidad es crucial para reducir la resistencia bacteriana y mejorar la eficacia de los tratamientos. Además, la potencial interacción entre patógenos de origen animal y las cepas humanas plantea la posibilidad de que la presencia de altos niveles de resistencia en la población canina pueda representar una amenaza latente para la salud pública.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

GPS™ LAMP-MONODOSE® , nuevo formato innovador para la detección genética de patógenos

Antonio Martínez-Murcia^{1,2 *}, Adrián García-Sirera², Aaron Navarro², Laura Pérez², Paloma Romero², Caridad Miró-Pina²

¹Universidad Miguel Hernández, 03300-Orihuela, Alicante, España.

²genetic PCR solutions™, 03300-Orihuela

*ammurcia@umh.es

A pesar de que en la actualidad existen ensayos genéticos eficaces para la detección de patógenos de interés, estas metodologías requieren de un laboratorio, equipo especializado y son lentos en la obtención de resultados. Con el fin de satisfacer las necesidades de análisis in situ requeridas durante la aparición de alarmas sanitarias, se ha puesto a punto un formato sencillo y rápido, dosificado en tubos listos para usar, que permite su transporte a temperatura ambiente y puede ser ejecutado en un equipamiento simple y de bajo coste.

El formato innovador LAMP-MONODOSE desarrollado por GPS™ consiste en microtubos que contienen todos los reactivos necesarios deshidratados y preparados para únicamente tener que añadir la muestra y correr la reacción. El formato se ha puesto a punto para la detección genética de microorganismos mediante la técnica de amplificación isoterma LAMP (Loop-mediated isothermal amplification), que permite obtener resultados rápidos sin necesidad de termociclador. Los diseños LAMP elaborados han sido ensayados para su aplicación en el formato MONODOSE, cuyo desarrollo requiere de aditivos y un protocolo específico optimizado por GPS™. Las reacciones in vitro realizadas en los laboratorios de GPS™ respaldan la reproducibilidad y repetitividad de este formato, así como la detección de, al menos, 10 copias en tiempos inferiores a 10 minutos. En consecuencia, el formato GPS™ LAMP-MONODOSE® muestra un potencial prometedor para la monitorización rápida de patógenos directamente en campo sin la necesidad de infraestructuras especiales.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Mecanismo de respuesta frente a una alerta sanitaria de EFSA-ECDC por un brote multinacional de infecciones por *Salmonella* Mbandaka relacionado con el consumo de carne de pollo en la UE en 2022

B. Diéguez-Roda¹, C. De Frutos², D. Buitrago², M. Durán², J. Bouzada², M. Agüero²

¹Tecnología y Servicios Agrarios (Tragsatec). Julián Camarillo, 5. 28037. Madrid. España.

²Laboratorio Central de Veterinaria (LCV). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ctra. M-106, pk 1,4. 28110. Algete (Madrid). España.

Los estándares de seguridad de los alimentos y los piensos en la UE se encuentran entre los más altos del mundo. A pesar de ello, en la UE se reportan cada año miles de toxoinfecciones alimentarias con casos de hospitalización y, en menor medida, de muertes. El control de las enfermedades transmitidas por los alimentos, por tanto, supone un desafío de salud pública para los estados miembros. Cuando se identifican alimentos específicos como causas de brotes nacionales o multinacionales y son necesarias medidas de control, la Comisión Europea, a través del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), juega un papel fundamental en el intercambio de información y en la coordinación entre las autoridades alimentarias de los diferentes estados, encaminado a la identificación de la(s) fuente(s) origen de la toxoinfección. En este contexto, recientemente, la EFSA ha desarrollado la plataforma web “EFSA One Health WGS System” para compartir información de secuenciación de genomas completos (WGS), una herramienta clave para el estudio e investigación de brotes.

El 14 de julio de 2022 la EFSA, a petición del ECDC, alertó sobre la existencia de un brote multinacional por *Salmonella* Mbandaka ST413 potencialmente relacionado con el consumo de productos procesados de carne de pollo que terminó afectando a diferentes estados miembros (República Checa, Estonia, Finlandia, Francia, Alemania, Irlanda y Países Bajos), Israel y el Reino Unido. Hasta noviembre de 2022 hubo 196 casos reportados, 23 hospitalizaciones, 10 casos de septicemia y un fallecido (Reino Unido). Las cepas del brote presentaban el gen de resistencia frente a aminoglucósidos *aac(6′)-Iaa* y la mutación *parC*[57:T-S], que podría inducir resistencia frente a fluoroquinolonas. Además, tenían el perfil cgMLST HC5 286156 de Enterobase. Las secuencias brutas de dos cepas representativas del brote del Reino Unido se compartieron en la base de datos SRA del NCBI (SRR16920742 y SRR19087024).

Para dar respuesta a la alerta y estudiar posibles vínculos epidemiológicos entre cepas españolas con el origen del brote, se secuenció con tecnología Illumina (MiSeq) el genoma completo de una selección de 18 cepas de *S. Mbandaka* aisladas de pollos de engorde y pienso aviar procedentes del muestreo llevado a cabo en el marco de los Programas Nacionales de Control de *Salmonella* en el período 2021-2022. Se realizó un análisis de calidad de las lecturas secuenciadas con FastQC (v0.11.9) y se eliminaron los adaptadores y bases de baja calidad con Trimmomatic (v0.39). Los genomas se ensamblaron con SPAdes (v3.15.4) y se optimizaron con Pilon (v1.24). Se utilizó SISTR (v1.1.1) y mlst (v2.23.0) para identificar el serotipo y el perfil ST de cada aislado, respectivamente. Se caracterizó el perfil cgMLST HC5 con la plataforma Enterobase y se realizó un análisis de diversidad genética por cgMLST y *clustering* entre los aislados españoles y las cepas representativas del brote con chewBBACA (v.2.1.3) usando el esquema cgMLST para *Salmonella enterica* de Enterobase (3002 locus).



Todos los aislados secuenciados tenían el gen de resistencia frente a aminoglucósidos *aac(6')-Iaa* y la mutación *parC*[57:T-S]. Sin embargo, solo uno de los aislados (pienso aviar, 2021) tenía el perfil ST 413, pero presentaba 28 alelos cgMLST de diferencia con las cepas del brote. El resto de aislados, muy cercanos entre sí (máx. de 2 alelos cgMLST de diferencia), estaban más alejados aún de las cepas del brote (más de 50 alelos cgMLST de diferencia). Ninguno de los aislados presentaba el perfil cgMLST HC5 286156 de Enterobase característico del brote. Así, se descartó el vínculo de los aislados españoles con el origen de estas toxoinfecciones. Finalmente, las secuencias brutas de los aislados secuenciados se compartieron a través de la plataforma “EFSA One Health WGS System” para continuar con la investigación. De acuerdo con las últimas informaciones publicadas, se encontraron evidencias que vinculaban el brote con productos de pollo distribuidos desde Ucrania.

Notas

Comparación de técnicas para evaluar la sensibilidad antimicrobiana en *Escherichia coli* y *Enterococcus cecorum*.

Carlos Martínez, María Bravo, Javier Blanco, Irene Simón, Casandra Martín, Verónica Arenas, Rosario Cerrato

INGULADOS—Innovación en Gestión y Conservación de Ungulados SL, C. Miguel Servet, 11, 10004 Cáceres, España

carlos@ingulados.com

La utilización de antibióticos ha actuado como un salvavidas en la lucha contra las infecciones bacterianas tanto en humanos como en animales. Sin embargo, el uso indiscriminado de antibióticos ha favorecido la diseminación de resistencias antimicrobianas, desencadenado un problema de salud global, el cual trasciende los límites entre la salud humana, animal y ambiental. Una forma de evitar el uso descontrolado de los antibióticos pasa por emplear técnicas para evaluar *in vitro* la sensibilidad de determinados antibióticos frente a los agentes patógenos. Para la limitación de los antibióticos a su uso clínico, así como para la optimización de los tratamientos, es importante realizar una determinación de la sensibilidad antimicrobiana de los patógenos de forma rápida y eficaz. Entre las técnicas más empleadas en laboratorios de diagnóstico veterinario se encuentran el método de antibiograma o difusión de discos en agar (Kirby-Bauer), el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante microdilución en caldo y la epsilometría (E test), que es una técnica que combina ambos métodos mencionados anteriormente. El objetivo general de este estudio es comparar los resultados de las tres técnicas de determinación de susceptibilidad antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* y *Enterococcus cecorum* aisladas de casos clínicos de avicultura. El objetivo específico de este trabajo es analizar las ventajas y desventajas de cada técnica para facilitar su elección. Para ello, se seleccionaron 10 cepas de *Escherichia coli* y *Enterococcus cecorum* aisladas de casos clínicos de pollos de engorde que presentaban lesiones compatibles con colibacilosis y osteoartritis. Los microorganismos patógenos fueron sometidos a las mencionadas pruebas de sensibilidad frente a cuatro antibióticos de uso clínico: tetraciclina, amoxicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y enrofloxacina. Para establecer los puntos de corte se utiliza la información proporcionada por el Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST). El método Kirby-Bauer (antibiograma) consiste en colocar discos impregnados una concentración estandarizada de diferentes antibióticos en una placa con medio de cultivo en agar previamente inoculada con un agente bacteriano. El cálculo de la CMI mediante microdilución permite analizar diferentes concentraciones de un antibiótico frente a una bacteria inoculada en pocillos con medio de cultivo líquido. Por último, la epsilometría (también llamada E test) consiste en depositar una tira con un gradiente de hasta 15 concentraciones de un mismo antibiótico en medio sólido inoculado con la bacteria patógena. En todos los casos se debe realizar un periodo de incubación previo a la lectura de resultados. Los resultados indican en líneas generales una concordancia entre las tres técnicas empleadas, si bien el método de microdilución en caldo muestra una mayor sensibilidad a la hora de determinar el perfil de resistencia a los antibióticos. Asimismo, el método de difusión en discos, tradicionalmente utilizado en diagnóstico, permite una determinación rápida y directa de la



sensibilidad antimicrobiana, pero tiene ciertas limitaciones como su menor sensibilidad y la imposibilidad de analizar diferentes concentraciones de antibióticos. Estas limitaciones las suple la determinación de la CMI mediante microdilución en caldo, pero esta técnica tiene la desventaja de requerir personal y equipos de laboratorio especializados para su interpretación. La epsilometría, un método combinado de ambos procedimientos, es útil cuando se necesiten analizar varias concentraciones de antibióticos, pero hay que tener en cuenta el elevado precio de esta técnica. Como conclusión, contar con laboratorios de diagnóstico especializados que determinen qué técnica se ajusta mejor a cada caso, aporta numerosas ventajas tanto a los estudios de casos clínicos como epidemiológicos o de investigación y puede contribuir a frenar el desarrollo de resistencias antimicrobianas.

Notas

Estudio de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en *Listeria monocytogenes* aislada de productos alimentarios, un patógeno en alza.

Antonio Romero-Salmoral¹, Francisco Luis Jurado-Martos², Fernando Cardoso-Toset², Rafael Jesus Astorga Márquez¹, Carmen Tarradas¹, Inmaculada Luque¹.

¹Departamento de Sanidad Animal, UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, Campus de Excelencia Internacional en Agroalimentación ceiA3, Universidad de Córdoba, España.

²CICAP- Centro de investigación agroalimentaria, Pozoblanco, Córdoba, España.

Listeria monocytogenes es una bacteria responsable de la listeriosis, enfermedad que afecta a los rumiantes y considerada en la actualidad una de las zoonosis alimentarias de mayor impacto por su gravedad en individuos inmunodeprimidos y mujeres embarazadas. Entre los alimentos responsables de la transmisión, ocupan un lugar prioritario aquellos denominados listos para consumo (*ready to eat*). Esta enfermedad está sometida a un protocolo de vigilancia en la industria alimentaria, sin embargo, no existen sistemas de monitorización de resistencias antimicrobianas, por tanto, se desconoce el comportamiento de la bacteria frente a los antimicrobianos más utilizados para su control.

En este trabajo se ha realizado un estudio para conocer la sensibilidad *in vitro* de 67 cepas de *L. monocytogenes* aisladas e identificadas siguiendo la norma ISO 11290 a partir de productos lácteos y cárnicos de rumiantes y cerdos. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI, CMI50 y CMI90), mediante la técnica de microdilución en caldo, frente a ocho antibióticos, Gentamicina (GEN), Cefotaxima (CTX), Penicilina (P), Ampicilina (AMP), Tetraciclina (TE), Sulfametoxazol-Trimetoprim (SXT), Eritromicina (E) y Vancomicina (VAN), siguiendo la metodología propuesta por el *Clinical and Laboratory Standards Institute for fastidious organisms* (CLSI, 2019).

El análisis de CMI90 muestra valores más altos para CTX y E (64 µg/mL), en comparación con los obtenidos para SXT, P y AMP (2 µg/mL), TE (1 µg/mL), VAN (0,5 µg/mL) y GEN (0,25 µg/mL). Se han comparado los valores de CMI90 teniendo en cuenta el origen de las cepas, agrupándolas en productos cárnicos y lácteos, encontrando diferencias significativas ($P < 0,05$) para los antimicrobianos Cefotaxima, Sulfametoxazol-Trimetoprim, Ampicilina y Vancomicina, que pudieran explicar los fracasos en el tratamiento de la listeriosis en el hombre.

Para los antimicrobianos con puntos de corte publicados por el EUCAST (2023), observamos elevados niveles de resistencias antimicrobianas frente a SXT (100%), Eritromicina (47,8%), Ampicilina (43,3%) y Penicilina (20,9%). Asimismo, 18 cepas (26,87%) cepas fueron multirresistentes.

Estos resultados sugieren la necesidad de implantar sistemas de vigilancia y monitorización de resistencias, adoptar buenas prácticas ganaderas y técnicas de procesado de alimentos para evitar el desarrollo de resistencias antimicrobianas en *Listeria monocytogenes*. Todo ello, unido al empleo de herramientas de microbiología predictiva, permitirá detectar con rapidez cualquier cambio en la susceptibilidad de la bacteria frente a los antibióticos, con el fin de adoptar medidas eficaces y obtener alimentos con ausencia total de *Listeria monocytogenes*.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* aislados en colonias felinas de Benalmádena (Málaga)

C. Mangas Solano¹, B. Huerta Lorenzo¹, M.A. Mena Rodríguez¹, E. Molina Guillén², M. Lozano Alvarado², C. Tarradas¹, R. Astorga¹

¹Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.

²Centro Veterinario Fénix (Benalmádena, Málaga).

Los gatos ferales suponen un riesgo evidente para la salud humana y animal debido a las escasas medidas sanitarias existentes en las colonias felinas, el estrecho contacto con hospedadores intermediarios, como ratas y pájaros, y la libertad para moverse por lugares públicos, como parques y zonas de recreo. Aprovechando el sistema de gestión integral de las colonias realizado por el ayuntamiento de Benalmádena (Málaga), basado en la captura, esterilización y retorno (CER), se ha llevado a cabo un estudio transversal para determinar la prevalencia de portadores y el perfil de resistencia antimicrobiana de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Klebsiella pneumoniae*, patógenos zoonóticos causantes de infecciones nosocomiales considerados un indicador de la evolución de la RAM en la población.

Participaron un total de 118 animales, de los que se obtuvieron, mediante torunda estéril, muestras rectales y oro-nasales para el aislamiento en medios selectivos e identificación mediante pruebas bioquímicas, PCR y MALDI-TOF de las cepas compatibles (Sensibilidad del método 77,3-99%; Especificidad 99,9%) (Díaz Pérez et al., 2014; Rodrigues et al., 2021; Singh et al., 2012). Posteriormente, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), mediante el sistema automatizado y software Thermo Scientific™ Sensititre™, y los resultados se interpretaron en base a los criterios de sensibilidad/resistencia del EUCAST y CLSI (2023).

Mediante el programa Winepi, se estimó una prevalencia real de portadores del 25,6% (IC95: 22,1%-29,1%) para *E. faecium*, 7,6% (IC95: 5,5%-9,7%) para *E. faecalis* y 3,2 % (IC95: 1,8%-4,6%) para *K. pneumoniae*.

En el caso de *E. faecalis* y *E. faecium*, los valores de CMI₅₀ oscilaron entre 0,5 µg/mL (amoxicilina/clavulánico, ampicilina y pradofloxacina) y 64 µg/mL (nitrofurantoína) y la CMI₉₀ entre 0,5 µg/mL (amoxicilina/clavulánico) y > 64 µg/mL (nitrofurantoína). El 97-100% de las cepas obtenidas (9 *E. faecalis* y 30 *E. faecium*) fueron sensibles a amoxicilina-clavulánico, ampicilina, penicilina, cloranfenicol y vancomicina. Por el contrario, todas fueron resistentes a los aminoglucósidos, cefalosporinas, lincosámidas y sulfonamidas testadas, lo que supone un porcentaje de multiresistencia del 100%.

Frente a *Klebsiella pneumoniae*, los antimicrobianos con menor CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron las fluoroquinolonas: ≤ 0,12 µg/mL enrofloxacina y marbofloxacina y ≤ 0,25 µg/mL pradofloxacina. En el extremo opuesto, se encontraron ampicilina (CMI₅₀ y CMI₉₀ >8 µg/mL) y tetraciclina (CMI₅₀ ≤ 4 µg/mL y CMI₉₀ >16 µg/mL). Todas las cepas aisladas (n = 3) resultaron sensibles a amikacina, gentamicina, amoxicilina/clavulánico, cefpodoxima, cefalexina, cloranfenicol, imipenem y sulfametoxazol/trimetoprim. El antimicrobiano con mayor nivel de resistencia (100%) fue la ampicilina,



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

seguido de ceftazidima y doxiciclina (33,33%), lo que supone un porcentaje de multirresistencia del 33,3%.

Este estudio, el primero realizado en España en gatos ferales, pone de manifiesto la circulación de los tres patógenos zoonóticos en esta población animal, con un notable nivel de multirresistencia, lo que confirma su implicación en Salud Pública y la necesidad de acciones integrales por parte de los servicios veterinarios responsables de su cuidado y control.

Notas

Estudio de nuevas posiciones polimórficas del gen PRNP en ovinos positivos a Scrapie

C. López-Maroto¹, V. de la Cruz², E. García², T. Huélamo², L. Moraga² y J.A. Bouzada¹

¹Laboratorio Central de Veterinaria (LCV). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ctra. M-106, pk 1,4. 28110. Algete (Madrid). España.

²Tecnología y Servicios Agrarios (Tragsatec). Julián Camarillo, 5. 28037. Madrid. España.

clmaroto@mapa.es

El Scrapie o tembladera es una de las enfermedades clasificadas dentro de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) que afecta principalmente al ganado ovino y caprino. Los principales estudios realizados sobre la susceptibilidad al Scrapie en ovino lo asocian con los polimorfismos que aparecen en los codones A136V [alanina(A) o valina(V)], R154H [arginina(R) o histidina(H)] y Q171RH [glutamina(G), arginina(R) o histidina(H)] del gen PRNP.

Basándose en esto, diferentes programas de selección genética se han desarrollado, tanto en la Unión Europa como en Estados Unidos, enfocados a incrementar la frecuencia del alelo resistente, alelo ARR, en los rebaños de ovino, así como a disminuir la presencia de los más sensibles, alelo VRQ. Sin embargo, las posiciones polimórficas en dicho gen son algunas más y estas han dado lugar a un gran número de variaciones alélicas que podrían influir en su susceptibilidad. Un ejemplo de ellos es el del codón L141F [leucina (L) o fenilalanina (F)] que aporta mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad en ovinos que sufren Scrapie atípico y que la EFSA incorporó a sus recomendaciones de vigilancia en 2005. En otros estudios se asegura que la revisión exclusiva de los tres codones antes descritos no es suficiente para realizar una predicción completa de la susceptibilidad de los animales a padecer Scrapie.

En este estudio se analiza la relación entre seis nuevas posiciones polimórficas y la resistencia o sensibilidad a padecer Scrapie analizando muestras negativas y positivas a esta enfermedad en su variante típica o atípica, recibidas durante en el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete en Madrid. Las muestras proceden de diferentes razas, distribuidas por todo el ámbito nacional y obtenido de animales que presentan Scrapie clásico, Scrapie atípico y animales sanos. Las posiciones polimórficas analizadas corresponden a los codones: M112T [metionina (M) o treonina (T)]; M137T [metionina (M) o treonina (T)]; H143R [histidina (H) o arginina (R)]; Y172D [tirosina (Y) o ácido aspártico (D)]; N176K [asparagina (N) o lisina (K)] y R211K [arginina (R) o lisina (K)].

El Dpto. de Genotipado del LCV ha desarrollado un método para la determinación estos seis polimorfismos nucleotídicos responsables mediante la técnica denominada "primer extensión". Los cebadores usados en la PCR de amplificación del fragmento de 786 pb fueron: Forward: 5'-GTC ATC ATG GTG AAA AGC CAC ATA GG-3' Reverse:5'-GCC CCT ATC CTA CTA TGA GCC CCT G-3'. En cuanto a los nuevos codones, los cebadores usados han sido: para el M112T: 5'-CCC AGTA AGC CAA AAA CCA ACA-3', para el M137T: 5'-CTA CAT GCT GGG AAG TRY CA-3', para el H143R: 5'-TGT CCT CAT AGT CAT TGC CAA AA-3', para el Y172D: 5'-GTA CTA CAG ACC AGT GGA TCR K-3', para el N176K: 5'TGA CAC AGT CAT GCA CAA AGT T-3'y para el R211K: 5'-AAA CTG ACA TCA AGA TAA TGG AGC-3'.



Los fragmentos obtenidos se han analizado por electroforesis capilar en un Genetic Analyzer 3730xl de Applied Biosystems. La interpretación de los resultados se llevó a cabo mediante el software GeneMapper 6.0 de Applied Biosystems. El estudio de estos nuevos polimorfismos permitirá aumentar el conocimiento de la relación entre la secuencia del gen PRNP y la distinta susceptibilidad a padecer las distintas variantes de Scrapie de los ovinos explotados en España y en un futuro diseñar nuevas estrategias para conseguir una mayor protección frente a la enfermedad con las menores pérdidas en patrimonio genético posible.

Notas

La infección experimental de cabras con *Mycobacterium microti* induce una infección subclínica asociada con reacciones leves a las pruebas de intradermotuberculinización

Cristian Melgarejo^{1,2*}, Alex Cobos^{1,2,3}, Mariano Domingo^{1,2,3}, Guillermo Cantero^{1,2}, Xavier Moll^{4,5}, Iker A. Sevilla⁶, Joseba M. Garrido⁶, Lorraine Michelet⁷, Maria Laura Boschirolí⁷, Enric Vidal^{1,2}, Bernat Pérez de Val^{1,2}

¹Unitat mixta d' investigació IRTA-UAB en Sanitat Animal. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA). Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Catalonia, Spain.

²IRTA. Programa de Sanitat Animal. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA). Campus de la UAB, Bellaterra, Catalonia, Spain.

³Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Catalonia, Spain.

⁴Fundació Hospital Clínic Veterinari, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Catalonia, Spain

⁵Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Catalonia, Spain.

⁶Animal Health Department, NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA). Derio, Bizkaia, Basque Country, Spain.

⁷Paris-Est University, National Reference Laboratory for Tuberculosis, Animal Health Laboratory, Anses, Maisons-Alfort, France.

*E-mail for correspondence: cristian.melgarejo@irta.cat

Mycobacterium microti es un miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Es la principal causa de tuberculosis en roedores silvestres y, rara vez, causa esta enfermedad en el ganado doméstico y los seres humanos. *M. microti* posee una delección en la región cromosómica RD1 que incluye genes que codifican antígenos relacionados con la virulencia de la infección. Esta característica se señala como la razón de su aparente baja patogenicidad en grandes mamíferos. En el ganado vacuno se han encontrado animales reactivos a la intradermotuberculinización en áreas donde *M. microti* circula en la fauna silvestre, llevando a sugerir una interferencia en el diagnóstico de la tuberculosis por *M. bovis*/*M. caprae* en el ganado que está expuesto a *M. microti* que podría comprometer las campañas de erradicación de la tuberculosis.

En este estudio se evaluaron los efectos sobre el inmunodiagnóstico y los hallazgos patológicos en cabras desafiadas experimentalmente con *M. microti* por diferentes rutas y dosis. En un primer experimento, las cabras fueron inoculadas por vía oral (PO) o intranasal (IN) con 104 ufc. En un segundo experimento, se evaluó la ruta endobronquial, con una dosis baja de 102 ufc (EB-LD) y una dosis alta de 105 ufc (EB-HD), así como por vía subcutánea a 104 ufc (SC). Se controlaron la temperatura, el peso corporal, los signos clínicos y las respuestas inmunológicas durante todo el experimento. A las 6 o 7 semanas tras la infección se realizaron pruebas de intradermoreacción con diferentes antígenos y al final de los experimentos se sacrificaron los animales, se realizó una evaluación patológica y se procesaron muestras para el aislamiento y detección de micobacterias.

Los resultados evidenciaron la inducción de una infección pulmonar subclínica en todos los animales desafiados por la vía EB-HD. La infección también se confirmó en un animal del grupo SC, pero no en



los grupos EB-LD, PO o IN. Dos animales pertenecientes a los grupos EB-HD y SC, respectivamente, mostraron resultados positivos a la prueba de la intradermotuberculinización simple, y otros dos animales de los grupos EB-HD y EB-LD mostraron resultados dudosos. No se observaron resultados positivos cuando se utilizaron antígenos específicos ausentes en *M. microti* (ESAT-6 y CPF-10). Los resultados indican que los animales expuestos a *M. microti* pueden presentar resultados positivos a las pruebas de intradermoreacción realizadas actualmente en las campañas de erradicación de la tuberculosis en el ganado y refuerzan la necesidad de utilizar antígenos específicos en las pruebas ante-mortem para evitar interferencias con el diagnóstico de *M. bovis* y *M. caprae*.

Notas

Armonización del diagnóstico de Salmonelosis en la producción primaria: más de veinte años de pruebas comparativas en España.

Cristina de Frutos¹, Cristina Arnanz¹, Rubén Villalba¹, Montserrat Agüero¹.

¹Laboratorio Central de Veterinaria (LCV). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ctra. M-106, pk 1,4. 28110. Algete (Madrid). España
cdefrutos@mapa.es

La Salmonelosis sigue siendo una de las principales enfermedades transmitidas por alimentos, siendo los productos derivados de las aves uno de los más frecuentemente implicados en esta transmisión. Los Programas Nacionales de Control de Salmonella en avicultura (PNCS) son una herramienta fundamental para la consecución y el mantenimiento en las diferentes poblaciones avícolas de los objetivos de reducción de prevalencia de *Salmonella* establecidos por la Unión Europea. El papel de los laboratorios participantes en estos programas es crucial y, por lo tanto, resulta fundamental la armonización del diagnóstico de laboratorio.

En este contexto, el Laboratorio Central de Veterinaria (LCV) como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para Salmonelosis en animales vivos y productos para alimentación animal, tiene entre sus funciones la organización o coordinación periódica de pruebas comparativas para el diagnóstico de este patógeno. Ya desde el año 2002, con anterioridad a la implantación de los actuales PNCS, el LCV comenzó a organizar de forma periódica ensayos de aptitud para la detección de *Salmonella*, destinados a los laboratorios oficiales implicados en el control de la enfermedad. Más tarde, con la implantación de los PNCS en 2007, se ha ido consolidando una red de laboratorios autorizados por la Autoridad competente para participar en los mismos, constituida, a día de hoy, por 52 laboratorios entre los que se incluyen no solo laboratorios oficiales, sino también otros laboratorios encargados de la monitorización por parte de los operadores (autocontrol).

A lo largo de estos años el Laboratorio Nacional de Referencia ha ido ampliando su actividad en este área organizando actualmente, para toda la red nacional de laboratorios, no sólo ensayos de detección de *Salmonella* en las distintas matrices objeto de control de los Programas, sino también ensayos de detección en pienso, de serotipado de *Salmonella* spp y de diferenciación de cepas campo o vacunales de *Salmonella*, todas ellas actividades de diagnóstico incluidas en el ámbito de los PNCS. Este trabajo pretende dar una visión de la trayectoria seguida por el LCV a lo largo de más de 20 años en la organización de estos ensayos, así como de la importancia de esta labor no sólo de cara a la armonización del diagnóstico, sino también facilitando a los laboratorios de la red el cumplimiento de un requisito imprescindible para el mantenimiento de un sistema de calidad acreditado conforme a la ISO 17025:2017.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Serología y estudio anatomopatológico para el diagnóstico de paratuberculosis caprina en infección natural

Elena Plamenova Stefanova^{1,2*}, Yania Páz-Sánchez^{1,2}, Oscar Quesada-Canales^{1,2}, Antonio Espinosa de los Monteros^{1,2}, Antonio Fernández^{1,2}, Miguel Antonio Rivero^{1,2} y Marisa Andrada^{1,2}

¹Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

²Departamento de Morfología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. elena.plamenova101@alu.ulpgc.es

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) que afecta a rumiantes tanto domésticos, como salvajes ocasionando considerables pérdidas económicas a nivel mundial. El curso de la enfermedad generalmente es crónico y las lesiones histológicas más comunes son la enteritis granulomatosa y linfoadenitis granulomatosa detectadas a nivel de la válvula iliocecal (VIC) y de los linfonodos mesentéricos (LN MS). Las pruebas serológicas, como el ELISA, ofrecen una detección rápida de anticuerpos contra MAP en casos clínicos, sin embargo, tienen distintos grados de sensibilidad y especificidad particularmente en infecciones subclínicas. Se presentan los resultados sobre la eficacia diagnóstica del ELISA y los hallazgos anatomopatológicos en un rebaño de cabras infectadas naturalmente con MAP. En una explotación de caprino de un total de 33 animales, se realizaron muestreos serológicos longitudinales con un kit de ELISA (PARACHECK®) para la detección de anticuerpos frente a MAP. Los animales que fueron bajas, se analizaron utilizando un protocolo de necropsia detallado, y las muestras fueron procesadas para su estudio histológico. Las lesiones microscópicas fueron clasificadas (severidad y distribución) según lo descrito por Krüger *et al.*, 2015, que evalúan la lámina propia (LP) y las placas de Peyer (PP) en la VIC; y la clasificación de Wangoo *et al.*, 2005 para los LN MS que distingue entre 4 grados de evolución de granulomas. Además, se realizaron las técnicas de histoquímica Ziehl-Neelsen (ZN) e inmunohistoquímica (IHQ) utilizando anticuerpo policlonal anti-MAP cedido por Pérez, V. La seropositividad de la granja fue del 24% a lo largo de los 5 muestreos consecutivos. Se produjeron 8 bajas siendo todos los animales seropositivos. Histológicamente, se confirmó linfoadenitis granulomatosa de los LN MS en el 100% (8/8) de las cabras examinadas. En la VIC, 75% (6/8) presentaron enteritis granulomatosa, clasificadas como leves y de distribución multifocal. La identificación de bacilos mediante ZN en LN MS fue positiva en 75% (6/8) de los casos, mientras que la presencia del antígeno frente a MAP fue confirmado mediante IHQ en el 100% de los animales. En la VIC, a nivel de la LP el 75% (6/8) fueron positivos mediante ZN e IHQ. Las PP fueron analizadas en 7 de los animales y en el 71,4% (5/7) fueron ZN e IHQ positivos. Dos animales con lesiones histológicas en LNMS y en VIC fueron negativos con ambas técnicas, siendo éstas las cabras con los niveles de seropositividad más bajos entre las necropsiadas. Por otro lado, los niveles más altos (densidad óptica a 450 nm, DO450 > 2,1/104% de positividad) de anticuerpos frente a MAP coinciden con animales con lesiones histopatológicas compatibles con PTB en los que se pudo identificar antígeno de MAP y agentes ZN positivos. No obstante, se requiere continuar analizando los animales con bajos porcentajes de positividad de anticuerpos y la presencia de lesiones en estadios tempranos de desarrollo de la enfermedad.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

El presente estudio fue financiado por los proyectos FCC-FC-2019-03 y subvención concedida (PROID2020010047) por el Gobierno de Canarias, Consejería de Economía, Conocimiento y Empleo; Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información, destinadas a la realización de proyectos de I+D en las áreas prioritarias de Canarias RIS-3, cofinanciada a través del PO FEDER Canarias 2014 - 2020. EPS* es beneficiaria de contrato predoctoral con referencia FPU20/03693 financiado por el Ministerio de Universidades.

Notas

Clasificación de muestras de leche de vaca según el grupo microbiano mediante modelos predictivos basados en el análisis de espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) y su aplicación para el tratamiento selectivo basado en patógenos de la mastitis subclínica bovina.

Pablo Rodríguez-Hernández¹, Fernando Cardoso-Toset², Silvia Molina-Gay², Nieves Núñez-Sánchez¹

¹Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Campus de Excelencia Internacional ceiA3

²Dpto. I+D+i CICAP, Pozoblanco, Córdoba.

fcardoso@cicap.es

La mastitis bovina supone la enfermedad más importante en el sector lácteo debido a su impacto económico, productivo y sobre el bienestar animal, siendo además la principal causa de uso de antimicrobianos en las explotaciones. Las formas subclínicas de la enfermedad son especialmente problemáticas, ya que la ausencia de síntomas dificulta el diagnóstico e implica que su repercusión se vea subestimada. Las mastitis causadas por microorganismos Gram positivos habitualmente requieren de un tratamiento con antimicrobianos, si bien las mastitis subclínicas causadas por microorganismos Gram negativos a menudo logran la curación bacteriológica sin la necesidad de utilizar antibióticos, existiendo también hasta un 40% de muestras sin crecimiento que tampoco requieren dicho tratamiento. Ante este contexto, distintos autores han propuesto el abordaje de esta enfermedad mediante una terapia basada en patógenos, la cual consiste en el empleo de los resultados del diagnóstico microbiológico para clasificar las muestras de leche y así realizar un plan de tratamiento adecuado basado en el uso racional de antimicrobianos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el uso de modelos predictivos basados en el análisis de muestras de leche de vaca mediante espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) como método de diagnóstico rápido para diferenciar el agente microbiano implicado y así promover la aplicación de una terapia selectiva de la mastitis subclínica bovina. Para llevar a cabo el estudio se analizaron un total de 101 muestras de leche de vacas frisonas con mastitis subclínica procedentes de 29 rebaños, que fueron sometidas a recuento automatizado de células somáticas y aislamiento microbiológico hasta identificar las especies bacterianas implicadas. Tras ello, las muestras fueron clasificadas en tres grupos: Gram positivo, Gram negativo o muestras sin crecimiento. Posteriormente, para el diseño de los modelos predictivos, las muestras fueron reagrupadas en dos grupos: grupo tratamiento, formado por muestras con crecimiento de microorganismos Gram positivos; y grupo sin tratamiento, formado por muestras sin crecimiento y muestras con crecimiento de microorganismos Gram negativos. Una vez clasificadas, las muestras fueron analizadas mediante tecnología NIRS, utilizando la información espectral resultante para diseñar distintos modelos predictivos. Se obtuvieron notables diferencias espectrales entre los grupos comparados, lo cual fue posteriormente consistente con el éxito de la clasificación o predicción de los modelos, que osciló entre 85,71% y 95,24%, así como con los altos porcentajes de sensibilidad (90-100%) y especificidad (81,2-90,9%) alcanzados. Los resultados obtenidos en este estudio resaltan la utilidad del enfoque propuesto como metodología de cribado para proporcionar un resultado diagnóstico rápido para el manejo de esta enfermedad y para promover una terapia selectiva basada en la detección del patógeno implicado. No obstante, la realización de estudios adicionales que



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

aumenten el número de muestras y la variabilidad de los grupos es considerado de vital importancia para alcanzar un rendimiento robusto de los modelos predictivos propuestos.

Notas

Streptococcus uberis: resistencias y formación de biofilm de cepas implicadas en el desarrollo de mastitis bovina.

Silvia Molina-Gay¹, Fernando Cardoso-Toset¹, Jorge Andrés Suarez Cáceres², Mari Ángeles Mena Rodríguez², Belén Huerta Lorenzo², Ángela Galán Relaño², Inmaculada Luque Moreno², Lidia Gómez-Gascón²

¹Dpto. I+D+i CICAP, Pozoblanco, Córdoba

²Dpto. Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Campus de Excelencia Internacional ceiA3

v32gogal@uco.es

La mastitis es una patología que afecta a la glándula mamaria del bovino alterando la producción de leche y causando grandes pérdidas económicas a nivel mundial. Uno de los principales microorganismos responsables de esta patología es *Streptococcus uberis*, bacteria con capacidad de producir biofilm, facilitando su adaptación a la ubre y haciéndose de esta forma más resistente a los antibióticos. Esto, unido al uso indiscriminado de antibióticos para combatir esta enfermedad ha llevado al desarrollo de resistencias a diferentes antimicrobianos. El objetivo de este estudio fue determinar el perfil de resistencia de 20 cepas de *S. uberis* aisladas a partir de leche de bovinos con mastitis en la provincia de Córdoba e identificadas mediante PCR del gen sub1154, frente a una batería de antibióticos empleados en el tratamiento de esta enfermedad (penicilina, enrofloxacin, oxacilina, tetraciclina, gentamicina, ceftiofur, eritromicina y clindamicina), con técnicas de microdilución en caldo, para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), utilizando los puntos de corte descritos por el organismo estadounidense (CLSI) y el europeo (EUCAST), y comparando los resultados obtenidos. Además, se midió la capacidad de producir biofilm en placas de poliestireno, utilizando para la lectura la tinción con cristal violeta. Nuestros resultados muestran un alto porcentaje de resistencias de *S. uberis*, incluyendo una alta resistencia frente a los β -lactámicos y los macrólidos, grupos de antimicrobianos usados frecuentemente para el tratamiento de las mastitis bovinas. Según el EUCAST, se determinaron resistencias mayores al 60 % frente a la mayoría de los antibióticos, a excepción de la penicilina (40%), con un 55 % de cepas multirresistentes (resistentes a tres o más clases de antimicrobianos). Por otra parte, y según los criterios del CLSI, aunque se evidenciaron resistencias mayores al 60 % frente a la mayoría de los antibióticos (<60%), el porcentaje de resistencias a la penicilina, ceftiofur y enrofloxacin fue menor, con un 80 % de cepas multirresistentes. Por otra parte, el 75 % de las cepas fueron formadoras de biofilm, y de ellas el 40 % fueron formadoras fuertes, si bien no se encontraron asociaciones significativas entre su formación y las resistencias detectadas. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de aplicar sistemas de vigilancia de esta bacteria, por la gran amenaza que supone para el control de las mastitis bovinas en un futuro cercano. Asimismo, las diferencias obtenidas entre los resultados en función de los puntos de corte publicados por el EUCAST o el CLSI, sugieren la necesidad de llegar a un consenso, ya que estas discrepancias pueden suponer implicaciones clínicas importantes.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Evolución del estado férrico durante la gestación en la yegua Pura Raza Española

Gemma Velasco¹, Ester Fazio², Pietro Medica², Katy Satué^{1*}

¹Facultad de Veterinaria. Universidad CEU-Cardenal Herrera, 46115-Alfara del Patriarca, Valencia, España. ksatue@uchceu.es

²Departamento de Ciencias Veterinarias, Unidad de Fisiología Veterinaria, Universidad de Messina, Via Palatucci, 98168 Messina, Italia

Durante la gestación los requerimientos de hierro (Fe) aumentan para favorecer el óptimo crecimiento placentario y fetal, la expansión de la masa eritrocitaria materna y prevenir posibles complicaciones derivadas de la deficiencia de Fe materna (Fisher y Nemeth, 2017). Por tanto, la predicción temprana del riesgo de anemia en la gestante es clínicamente relevante para permitir una intervención clínica temprana (Noshiro et al., 2022). El objetivo de este estudio fue evaluar el estado férrico en yeguas preñadas. Se tomaron muestras de sangre de 31 yeguas de Pura Raza Española durante 11 meses de gestación. Las concentraciones de Fe, ferritina (Ferr; $\mu\text{g/dL}$) y transferrina (T; mg/dL) se analizaron mediante espectrofotometría (Spin 200E, Spinreact®, Barcelona, España). La capacidad total de unión al hierro (TIBC; mg/dL) se determinó multiplicando el valor de T por un factor constante 1,27. La capacidad de unión al Fe insaturado (UIBC; mg/dL) se calculó como la diferencia entre TIBC y el Fe sérico. El porcentaje de saturación de la transferrina (SAT%) se determinó a partir de la fórmula $\text{Fe sérico/TIBC} \times 100$. Las concentraciones de Fe, Ferr, T y la TIBC aumentaron significativamente y la UIBC disminuyó a medida que avanzó la gestación, sin cambios en la SAT%. En base a que la TIBC indica la capacidad de transporte de Fe en función de la disponibilidad de T, y que ambos parámetros están estrechamente relacionados con las necesidades, se sugiere que la gestación aumenta los requerimientos basales de Fe en la yegua. La gestación en la yegua Pura Raza Española parece ser eficiente en relación con el transporte, movilización y utilización del Fe.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Desarrollo de un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos específicos de la enfermedad aleutiana de los visones

Diana Dorado¹, Mercedes Montón², Ricardo García¹, Ángela Bononat¹, Ricardo Fernández², Margarita García¹, Paloma Rueda¹ Y Ángel Venteo¹

¹Gold Standard Diagnostics Madrid S.A., Madrid, España.

²NUPE S.L.U.

INTRODUCCIÓN

El parvovirus de la enfermedad aleutiana del visón (AMDV) infecta sobre todo al visón de granja, pero también a mustélidos, y constituye uno de principales problemas sanitarios de estas explotaciones por las pérdidas económicas que ocasiona y las dificultades que entraña su erradicación. Se caracteriza por pobre reproducción, pérdida de peso, autoinmunidad, hipergammaglobulinemia, incremento de la susceptibilidad a infecciones bacterianas, y muerte por insuficiencia renal. La enfermedad ocurre en todos los tipos de color, pero es particularmente susceptible el visón homocigótico recesivo para el gen Aleutiano por el color claro de la piel.

Las estrategias una vez detectado el virus en una granja son dos; el vacío sanitario, desinfección y posterior reintroducción de animales o el convivir con el virus, seleccionando los animales más resistentes, que son los que menos hipergammaglobulinemia desarrollan (para medir este factor se utiliza el denominado test de yodo).

La principal forma de detectar la infección en una granja es la detección de anticuerpos específicos contra el virus. Actualmente se utiliza la técnica de la contra inmunolectroforesis o CIEP. Esta es una técnica bastante antigua y laboriosa basada en que antígeno viral y anticuerpos se encuentren en un gel de agar y formen una banda de precipitación, la cual ha de ser identificada por personal especializado de una manera cualitativa.

MATERIALES Y MÉTODOS

En GSD hemos desarrollado un ELISA basado en la detección de los anticuerpos generados durante la infección contra la VP2 viral. Para ello, en primer lugar, se clonó y expresó esta proteína recombinante en el sistema de baculovirus. Una vez producida y semipurificada, se utiliza como antígeno tapizado para realizar un ELISA indirecto. Sobre estos pocillos se añaden las muestras de visones u otros mustélidos y los anticuerpos que queden unidos serán detectados posteriormente por la unión de proteína A/G-peroxidasa y TMB.

RESULTADOS

El ensayo ha demostrado una sensibilidad del 98.7% (n=75) y una especificidad del 100% (n=231), siempre con la precaución de tomar los valores del CIEP como verdaderos.

CONCLUSIÓN

Además de las ventajas del ELISA frente al CIEP en cuanto a la automatización y la posibilidad de analizar un elevado número de muestras en poco tiempo, una ventaja adicional es la toma de muestras. Actualmente las muestras de visones llegan al laboratorio en un capilar donde la cantidad de suero no llega ni a los 20 µl, por lo que resulta difícil repetir una muestra ya que el ensayo CIEP consume 10µl. El ELISA, además de poder usar el suero de estos capilares (tan solo 1 µl), está diseñado



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

para su uso con sangre seca en papel, obtenida tras un pequeño corte en la uña del animal. La toma de muestras de esta forma facilita enormemente el trabajo de los veterinarios en la granja y además es compatible para su uso simultáneo en el ELISA para la detección de anticuerpos anti SARS-CoV-2, también desarrollado en GSD.

Notas

Mejora del diagnóstico rápido de la peste porcina africana

Cristina Aira¹, Ángela Bononat¹, Gabriela González-García¹, Juan Martínez-Cano¹, Nadia Casado², Carmina Gallardo², Marga García-Durán¹, Paloma Rueda¹, Alba Fresco-Taboada¹

¹Gold Standard Diagnostics Madrid S.A., Madrid, España.

²Laboratorio de referencia de la Unión Europea para la PPA, Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA/CSIC), Madrid, España.

INTRODUCCIÓN

La peste porcina africana (PPA) es una enfermedad porcina altamente infecciosa, causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA). La infección por el virus de la peste porcina africana se correlaciona con una amplia gama de síntomas clínicos, desde una enfermedad casi asintomática hasta fiebre hemorrágica con altas tasas de mortalidad (95-100%). Hoy en día, la enfermedad se transmite activamente en un gran número de países y no hay vacunas autorizadas disponibles en todo mundo. En consecuencia, el control de la PPA se lleva a cabo mediante el diagnóstico precoz y la aplicación de medidas sanitarias. Por sus características de rapidez, sencillez y robustez, los ensayos rápidos o inmunocromatográficos son una de las técnicas más utilizadas en campo, permitiendo acelerar el diagnóstico final. En este trabajo se describe como, mediante la aplicación de nuevos reactivos y nuevas carcacas, se ha mejorado el rendimiento diagnóstico de los ensayos rápidos, tanto para la detección de antígeno como de anticuerpos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para mejorar el rendimiento en la detección de antígeno, se desarrolló un ensayo rápido inmunocromatográfico empleando un nuevo anticuerpo monoclonal recombinante producido en GSD Madrid, así como nanopartículas de látex. Con este nuevo ensayo se evaluaron un total de 124 sangres experimentales positivas y 160 negativas clasificadas mediante la PCR descrita en el manual de la WOA, así como 150 negativas de áreas libres de PPA. Además, se compararon los resultados con los del ensayo comercial INgezim® ASF CROM Ag.

Por otro lado, para mejorar la detección de anticuerpos específicos de la PPA, se empleó una nueva versión recombinante de la VP72 para desarrollar un ensayo colorimétrico empleando oro coloidal. Este ensayo se comparó con otros ensayos comerciales al evaluar un total de 107 sueros positivos experimentales, 73 sangres negativas de campo y 50 sueros negativos de campo.

Ambos ensayos se combinaron en una carcaca doble (una tira de antígeno y una de anticuerpo) que, además, cuenta con una ventana adicional para la adición de la muestra.

RESULTADOS

El nuevo ensayo para la detección de antígeno mostró la misma sensibilidad que el ensayo comercial evaluado, pero con una especificidad mejorada, ya que, de las 160 muestras negativas evaluadas, no se detectó ningún resultado falso positivo. El nuevo ensayo para la detección de anticuerpos exhibió una mejor sensibilidad que los ensayos comerciales INgezim® PPA CROM Anticuerpo y ELISA indirecto INgezim® ASFV-R, este último basado en antígenos expresados tempranamente.



CONCLUSIÓN

Tratándose de una enfermedad altamente contagiosa como es la PPA, los ensayos rápidos son de gran interés para el control de la epidemia por su rápida interpretación, lo que permite acelerar la identificación de cerdos y jabalíes infectados. Los ensayos descritos en este trabajo mejoran el diagnóstico de la PPA, dando resultados más precisos en la detección de antígeno y una detección de anticuerpos más temprana. Además, con la combinación de ambos ensayos en una sola carcasa se obtiene una herramienta completa para la detección rápida de PPA.

Notas

Detección y diferenciación de PCV2 y PCV3 mediante una prueba PCR multiplex en tiempo real

C Michael Angelichio, Lisa Gow, Sarita Tiwari, Lori Plourde, Álvaro Hidalgo
IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, EE.UU.
alvaro-hidalgo@idexx.com

El circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) y el circovirus porcino de tipo 3 (PCV3) son patógenos de gran relevancia en la industria porcina. La detección precisa de estos virus es esencial para el manejo de enfermedades porcinas.

En este contexto, IDEXX presenta el RealPCR PCV2/PCV3, una avanzada solución que permite la identificación, cuantificación y diferenciación de estos patógenos en cerdos. Realizando la detección simultánea de PCV2 y PCV3 en una sola prueba, el RealPCR PCV2/PCV3 brinda información valiosa para un diagnóstico preciso. Además, con la capacidad de cuantificar la carga viral presente en la muestra, esta prueba proporciona un nivel adicional de detalle. Operando en la plataforma modular IDEXX RealPCR, esta solución simplifica la gestión del inventario y la formación del personal al utilizar un único proceso y reactivos compartidos.

RealPCR PCV2/PCV3 está elevando los estándares de detección de enfermedades porcinas, brindando precisión y eficiencia a la industria.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Sistema de ADN IDEXX RealPCR MilQ-ID: La nueva solución para las pruebas de mastitis

Loïc Commun¹, Katharina Engelke²; Christoph Egli³; Kathy Velek¹; Valerie Leathers¹

¹IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, EE.UU.

²IDEXX Europe, Hoofddorp, Países Bajos;

³IDEXX Switzerland AG, Liebefeld, Suiza

loic-commun@idexx.com

La mastitis es una preocupación constante en la industria lechera, y su diagnóstico preciso es esencial. En este contexto, IDEXX ha desarrollado RealPCR MilQ-ID, un sistema que utiliza cuatro mezclas multiplexadas para identificar hasta 15 patógenos causantes de mastitis, incluyendo el gen betalactamasa grampositivo, en muestras de leche bovina. Además de su rapidez, RealPCR MilQ-ID destaca por su sensibilidad analítica, permitiendo la detección de objetivos incluso a concentraciones mínimas. IDEXX RealPCR MilQ-ID opera en la plataforma modular IDEXX RealPCR, ofreciendo una flexibilidad sin igual. Además, integra un control interno positivo para asegurar la precisión en la extracción de muestras. Como complemento esencial, nuestro software, RealPCR Connect, automatiza el análisis de datos y garantiza un almacenamiento seguro, mejorando así la eficiencia operativa. RealPCR MilQ-ID redefine el diagnóstico de mastitis y mejora la calidad de la leche al fusionar la ciencia con la practicidad.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Tipificación molecular de brotes de *Paenibacillus larvae* mediante Multiple Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA).

I. Pérez-Cobo¹, L. Hernández¹, N. Frías², L. Borreguero¹, M.R. Maya², P. Fernández-Somalo¹, M. Agüero¹ y J.A. Bouzada¹.

¹Laboratorio Central de Veterinaria. División de Laboratorios de la Sanidad de la Producción Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ctra. M106, Km 1,4. 28110. Algete (Madrid). España.

²Tecnología y Servicios Agrarios (Tragsatec). Julián Camarillo, 5. 28037. Madrid. España.

Una de las enfermedades bacterianas más graves que sufren las colmenas de abejas melíferas (*Apis mellifera*) es la denominada loque americana, causada por *Paenibacillus larvae*, una bacteria grampositiva con forma de bastoncillo. Una vez que infecta las larvas, puede llegar a producir más de mil millones de esporas en cada larva infectada, las cuáles son altamente resistentes al calor y a los agentes químicos pudiendo permanecer viables durante décadas. Las larvas más jóvenes, de menos de 36 horas de edad, son las más susceptibles. La transmisión se produce por la ingestión oral de las esporas muy resistentes que se propagan dentro de la colonia o entre colonias al ser transportadas por abejas adultas, o por intervenciones del apicultor. Es una enfermedad de declaración obligatoria en la Unión Europea (UE) y es responsable de considerables pérdidas económicas en el sector apícola a nivel mundial.

El genoma de *P. larvae* contiene secuencias de ADN repetitivas conservadas que varían en número y longitud dentro de una misma especie. Mediante la PCR basada en el consenso intergénico repetitivo enterobacteriano (ERIC), se han definido cuatro genotipos ERIC (ERIC I-IV), con un nuevo genotipo ERIC V recientemente identificado y descrito en una miel española. Todos los genotipos ERIC difieren en sus características bioquímicas, morfológicas y de virulencia. Los genotipos ERIC I y II tienen una distribución mundial y son epidemiológicamente los más importantes, mientras que los genotipos ERIC III y IV no se han identificado desde hace varios años y sólo se pueden encontrar unos pocos ejemplos en colecciones de cultivos.

A lo largo de los años se han aplicado y perfeccionado varios métodos de genotipado para estudiar la diversidad genética de *P. larvae*. Recientemente se ha desarrollado un sistema de análisis denominado Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) basado en diferentes loci del genoma de diversas cepas bacterianas que tienen un número variable de repeticiones en tándem (VNTR), lo que permite llevar a cabo análisis epidemiológicos de forma rápida, económica y con gran capacidad de diferenciación de cepas. Esto permite ir más allá de la identificación empleada hasta el momento, ya que también permite subdividir los genotipos más dominantes como son los ERIC tipo I y ERIC tipo II.

El Laboratorio Central de Veterinaria ha desarrollado un sistema de análisis mediante una reacción multiplex de PCR con los cinco marcadores propuestos en la bibliografía (VNTR-A, VNTR-B, VNTR-C, VNTR-D y VNTR-E) utilizando parejas de cebadores marcados y analizados mediante electroforesis capilar en un analizador genético ABI3500 de *Applied Biosystems*. La interpretación de los resultados se llevó a cabo mediante el software GeneMapper 6.0 de *Applied Biosystems*.

Los resultados obtenidos después del análisis de 59 muestras, recogidas desde el año 2009 hasta la actualidad y procedentes de 13 comunidades autónomas españolas han demostrado la presencia de



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

elevado nivel de polimorfismo, lo que le da, a esta técnica, una gran capacidad de diferenciación de cepas y el consiguiente seguimiento de los brotes.

Además, se ha realizado un estudio biogeográfico para estudiar la correlación entre el genotipo MLVA y la región geográfica donde fueron recogidas las muestras.

Notas

Estudio de la presencia de *Malassezia pachydermatis* resistente a antifúngicos en muestras óticas y dermatológicas de origen canino

José L. Blanco^{1,2}, Sergio Quevedo^{1,2}, Marta E. García^{1,2} y Sergio Álvarez-Pérez^{1,2*}

¹Dpto. Sanidad Animal, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España.

²Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Hospital Clínico Veterinario Complutense, 28040 Madrid, España.

sergioaperez@ucm.es

A pesar del importante papel de los miembros del género *Malassezia* como agentes de infección fúngica en humanos y animales y de la reciente emergencia de cepas resistentes a múltiples antifúngicos, la amenaza que suponen estas levaduras para la salud animal sigue siendo en su mayor parte desconocida. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de *Malassezia pachydermatis* resistente a antifúngicos en muestras clínicas de origen canino recibidas en el Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Veterinario Complutense (HCVC, Madrid). Se incluyeron en el estudio todos los aislados de *M. pachydermatis* obtenidos entre septiembre de 2020 y agosto de 2022 a partir de muestras óticas y dermatológicas de perros analizadas en el HCVC. La identificación de los aislados a nivel de especie se realizó mediante procedimientos micológicos convencionales y secuenciación Sanger del gen que codifica la subunidad grande del ARNr. Por su parte, los análisis de sensibilidad a azoles, polienos y terbinafina se realizaron mediante un procedimiento de microdilución en placa de 96 pocillos basado en los estándares del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Durante el periodo de estudio se obtuvieron un total de 89 aislamientos de *M. pachydermatis* procedentes de 54 casos clínicos (46 otitis y 8 dermatitis). Once aislamientos (12,4% del total) de 6 casos distintos (11,1% de total; 5 otitis y 1 dermatitis) eran resistentes a ketoconazol (concentración inhibitoria mínima [CIM] ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$). Además, los 11 aislamientos resistentes a ketoconazol mostraron resistencia cruzada a itraconazol, posaconazol, ravuconazol y/o voriconazol, y uno de ellos resultó ser resistente a anfotericina B (CMI = 8 $\mu\text{g/mL}$). Los 89 aislamientos analizados mostraron altas CMIs frente a nistatina (rango = 2-8 $\mu\text{g/mL}$, mediana = 4 $\mu\text{g/mL}$), pero eran sensibles a terbinafina (rango = 0.016-1 $\mu\text{g/mL}$, mediana = 0.25 $\mu\text{g/mL}$). Finalmente, destaca un caso de otitis en un perro labrador (macho, 4 años) del que se aisló de ambos oídos colonias de *M. pachydermatis* resistentes y sensibles a azoles. Los resultados de este estudio concuerdan con los de estudios similares realizados en los últimos años que informan del aislamiento de cepas de *M. pachydermatis* con un alto nivel de resistencia a azoles a partir de casos clínicos de otitis o dermatitis en pequeños animales. Dado el potencial zoonótico de *M. pachydermatis*, consideramos que se debería mejorar la vigilancia epidemiológica de esta levadura, y en especial de las cepas resistentes a antifúngicos, en el entorno veterinario.

Sergio Quevedo es beneficiario de un contrato financiado por la Unión Europea-Next Generation EU dentro del Programa Investigo. Sergio Álvarez-Pérez agradece la ayuda RYC2018-023847-I financiada por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por el FSE invierte en tu futuro.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Confirmación de la producción de Betalactamasas de espectro extendido y de Carbapenemasas en bacterias multirresistentes

Jose L. Blanco^{1,2}, Laura Leal^{1,2}, Sergio Álvarez-Pérez^{1,2}, Marta E. García^{1,2}

¹Laboratorio de Microbiología y Parasitología. Hospital Clínico Veterinario Complutense. Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid. España.

²Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

La detección de bacterias multirresistentes es un foco de interés primordial en el concepto One Health. Resulta de particular interés la diseminación de bacterias portadoras de genes codificantes para betalactamasas de espectro extendido (ESBL), AmpC adquiridas y carbapenemasas. El objetivo de este estudio ha sido determinar, mediante análisis fenotípico, la prevalencia de este tipo de enzimas y caracterizar los mecanismos de resistencia de cepas bacterianas multirresistentes.

Se analizaron 77 cepas multirresistentes aisladas entre marzo de 2020 y septiembre de 2022 en el Hospital Clínico Veterinario Complutense, identificadas como miembros de la Familia *Enterobacteriaceae* o los géneros *Pseudomonas* o *Acinetobacter*. Inicialmente todas ellas se sembraron en medios cromogénicos selectivos y diferenciales para la detección de bacterias Gram negativas productoras de ESBL y/o carbapenemasas. A continuación, se realizaron antibiogramas de las bacterias crecidas en los medios mencionados para la detección de estas enzimas. Para ello, se utilizaron discos de tres cefalosporinas diferentes y su combinación con ácido clavulánico -inhibidor de betalactamasas- y/o cloxacilina -inhibidor de AmpC-. Para la detección de bacterias productoras de carbapenemasas se utilizaron discos de meropenem y su combinación con ácido fenilborónico para detectar carbapenemasas de clase A como las KPC, EDTA para carbapenemasas de clase B denominadas metalobetalactamasas (VIM, IMP y NDM), y cloxacilina para detectar si se trataba de una AmpC. Además, se utilizaron discos de temocilina para diferenciar entre la existencia de una ESBL con pérdida de porinas de una carbapenemasa de clase D (OXA-48-like) cuando no se veía sinergia entre el meropenem con el resto de inhibidores. De las 77 cepas estudiadas, 42 crecieron en el medio selectivo para bacterias productoras de ESBL (54,5%), comprendiendo 20 enterobacterias (47,62%), 21 *Pseudomonas* (50%) y 1 *Acinetobacter* (2,38%). Los antibiogramas mostraron que 13 enterobacterias y 3 *Pseudomonas* tenían alguna ESBL (n=16; 38%), 14 enterobacterias y 10 *Pseudomonas* tenían una AmpC (n=24; 57,14%), y 4 enterobacterias, 12 *Pseudomonas* y 1 *Acinetobacter* no tenían ninguna de estas enzimas (n=17; 40,48%). Por otro lado, crecieron 25 cepas productoras de carbapenemasas en el medio selectivo para estas bacterias (32,47%), de las cuales 24 habían crecido previamente en el medio ESBL y entre las cuales había 3 enterobacterias (12%), 21 *Pseudomonas* (84%) y 1 *Acinetobacter* (4%). Los antibiogramas mostraron que 2 enterobacterias y 17 *Pseudomonas* tenían una KPC (n=19; 76%), 1 *Acinetobacter* tenía una OXA-48-like (n=1; 4%) y 1 enterobacteria tenía una ESBL (n=1; 4%). En este estudio no se pudo demostrar en 4 *Pseudomonas* si tenían una OXA-48-like o no tenían ninguna carbapenemasa debido a que la temocilina, que se utiliza para determinar la presencia de esta enzima, no tiene actividad frente a este género bacteriano (n=4; 16%). Los resultados obtenidos del análisis fenotípico de carbapenemasas muestran el predominio de KPC como resistencia mayoritaria en las cepas analizadas.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

La conclusión del trabajo fue que al menos el 32,46% (n=25) de todas las bacterias multirresistentes analizadas en el estudio poseían alguna ESBL y/o AmpC, y el 25,97% (n=20) tenía algún tipo de carbapenemasa, porcentaje bastante elevado considerando que no está permitido en la Unión Europea el uso de carbapenémicos en animales domésticos.

Sergio Álvarez es beneficiario de un Contrato 'Ramón y Cajal'. Laura Leal es beneficiaria de un contrato financiado por la Unión Europea- Next Generation EU dentro del Programa Investigato.

Notas

Garantías sanitarias en la exportación de équidos: contribución del Laboratorio Central de Veterinaria

Juan Manuel Corral¹, Gema Rojo¹, M. Belén Gómez¹, Nieves Frías², Iratxe Pérez¹, M. Pilar Fernández¹, Rubén Villalba¹, Montserrat Agüero¹

¹Laboratorio Central de Veterinaria (LCV). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ctra. M-106, pk 1,4. 28110. Algete (Madrid). España. registro.lcv@mapa.es

²TRAGSATEC Tecnologías y Servicios Agrarios S.A.

El incremento de los movimientos internacionales de los caballos constituye un riesgo de distribución global de las enfermedades infecciosas equinas pudiendo ocasionar graves impactos económicos en el sector y daños a la salud pública en el caso de las enfermedades transmisibles a las personas. Por este motivo es necesario asegurar que los animales objeto de exportación cumplen con los estándares internacionales (OMSA) para evitar la introducción y diseminación de los patógenos equinos en poblaciones locales, sin que haya un menoscabo en la actividad comercial a nivel internacional. Las garantías sanitarias certificadas por los veterinarios oficiales se basan en análisis de laboratorio, tanto de animales individuales, como de la población de équidos de todo el país, mediante los programas de vigilancia y control.

El Laboratorio Central de Veterinaria (LCV) adscrito a la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación es el Laboratorio de Referencia de la UE (EURL) y a nivel mundial (OMSA-RL) para la Peste Equina Africana. Además, se encuentra designado, en muchos casos como único laboratorio en España, para la realización de las analíticas de todas las enfermedades equinas objeto de control internacional, a excepción de la Brucelosis y Surra que se realizan en el Laboratorio Central de Sanidad Animal (LCSA), situado en Santa Fe (Granada). Ambos laboratorios además actúan como Laboratorio Nacional de Referencia para las enfermedades equinas objeto de control oficial, realizando análisis de diagnóstico en caso de sospecha o brote, y coordinando la red de laboratorios oficiales, cada uno de ellos para las enfermedades de su ámbito de actuación.

En el LCV se han realizado durante el periodo enero 2003 - junio 2023 análisis de más de cincuenta mil caballos. De ellos, se estima que más del 65% son caballos de pura raza española. El destino principal de los animales analizados ha sido al continente americano (81%), Asia (11%) y África (4%). Los países de destino han sido: Méjico (47%), Estados Unidos (15%), Emiratos Árabes Unidos (5%), Colombia (4%), China (3,7%), Costa Rica (3,3%), Marruecos (2,35%) y otros países del mundo (20%).

En cuanto a las enfermedades objeto de análisis en el LCV para certificación individual de animales para movimiento, se incluyen tanto enfermedades de declaración obligatoria en la UE, como Metritis Contagiosa Equina (34%), Anemia Infecciosa Equina (15%), Arteritis Viral Equina (12%), Durina (5%), Muermo (5%), Fiebre del Nilo Occidental (1,24%) o Peste Equina Africana (0,7%), como otras enfermedades de declaración semestral a la OMSA, como la Piroplasmosis (11,5%), la Rinoneumonitis Viral Equina (2%), Leptospirosis (1,19%) o Influenza Equina (<1%). Además, se han realizado 15.129 análisis para los programas de vigilancia y control de Fiebre del Nilo occidental (9.285) y de Peste equina (5.844), que han contribuido a garantizar el estatus del país y, en el caso de la Peste equina, conseguir el estatus de país oficialmente libre de la OMSA.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

El objetivo de esta comunicación es realizar una revisión histórica de los análisis realizados en el LCV sobre muestras de équidos, que han contribuido a ofrecer adecuadas garantías sanitarias facilitando las exportaciones de animales vivos, con fines deportivos y comerciales.

Notas

Recuento de neutrófilos y linfocitos en muestras de líquido sinovial canino: comparación entre el método manual y el analizador ADVIA 2021i

Katy Satué^{1*}, Elena Damiá¹, Gemma Velasco¹, Laura Miguel-Pastor¹, Emma Martins¹, Deborah Chicharro¹, Mónica Rubio¹, Marta Torres-Torrillas¹, Pau Peláez¹, Joaquín Sopena¹ y José María Carrillo¹
¹Facultad de Veterinaria. Universidad CEU-Cardenal Herrera, 46115-Alfara del Patriarca, Valencia, España.

ksatue@uchceu.es

El análisis celular del líquido sinovial (LS) es necesario para la detección de trastornos articulares inflamatorios de naturaleza aguda (aséptica o séptica) y crónica (Aliç et al., 2022). En la actualidad, la técnica "gold estándar" sigue siendo el recuento celular manual (RCM), que evalúa el recuento diferencial celular directamente mediante microscopía óptica. Aunque la precisión y la exactitud de los métodos hematológicos automatizados como ADVIA parece ser más consistente para el recuento de células totales (RCT) en articulaciones sanas (Froom et al., 2013; Brudvig et al., 2015), no existen datos referentes al recuento diferencial de neutrófilos (NFS) y linfocitos (LINF) y su correlación con los obtenidos con el RCM en casos de sinovitis.

El objetivo de este estudio fue comparar los resultados del recuento de NFS y LINF entre el RCM y el ADVIA 2021i en diferentes patologías articulares inflamatorias agudas (asépticas y sépticas) y crónicas de diverso origen. En el estudio se incluyeron 12 muestras de LS extraídas mediante artrocentesis de 12 articulaciones diferentes de 10 perros. El coágulo de mucina en todos los casos presentó una calidad regular a mala, por lo que se procedió a la realización de las extensiones y al análisis del LS en el analizador ADVIA 2021i sin adición de hialuronidasa. Las extensiones fueron teñidas con Diff-Quick y analizadas mediante microscopía óptica para la determinación de los porcentajes de NFS y LINF. Aunque la correlación entre ambos métodos fue de $r=0,41$, la variabilidad aumentó con el incremento del % de NFS. El estudio comparativo mediante el RCM mostró incremento de NFS y disminución de LINF en las sinovitis asépticas ($n=4$; NFS: $70,5\pm 8,2\%$; LINF: $25,2\pm 2,3\%$) y sépticas agudas ($n=4$; NFS: $95,3\pm 9,5\%$; LINF: $10,3\pm 1,2\%$) frente a las asépticas crónicas ($n=4$; NFS: $18,1\pm 1,6\%$ y LINF: $56,1\pm 2,6\%$) ($p<0,05$), con modificaciones morfológicas en los NFS dependiendo del proceso. Los porcentajes de LINF mediante ADVIA2021i fueron significativamente diferentes entre los tres grupos con valores medios de $30,2\pm 3,3\%$, $20,3\pm 2,2\%$ y $40,3\pm 3,6\%$ en las sinovitis agudas aséptica y séptica y las crónicas ($p<0,05$) respectivamente, sin diferencias en el porcentaje de NFS.

Los resultados de este estudio indican que el RCM sigue siendo el método más adecuado para el recuento diferencial de NFS, ya que el método automatizado no permite diferenciar adecuadamente modificaciones cuantitativas ni morfológicas (segmentados o degenerados) en la evaluación de NFS en las muestras de LS.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Concentraciones de noradrenalina y progesterona en yeguas Pura Raza Española durante el periodo luteal

Katy Satué^{1*}, Elena Damiá¹, Gemma Velasco¹, Ester Fazio², Pietro Medica²

¹Facultad de Veterinaria. Universidad CEU-Cardenal Herrera, 46115-Alfara del Patriarca, Valencia, España. ksatue@uchceu.es

²Departamento de Ciencias Veterinarias, Unidad de Fisiología Veterinaria, Universidad de Messina, Via Palatucci, 98168 Messina, Italia

La inervación simpática regula la actividad ovárica incluyendo el desarrollo folicular, la ovulación y la esteroidogénesis (Tong et al., 2020). Estudios *in vitro* (Miszkiel y Kotwica, 2001) e *in vivo* (Piccinato et al., 2012) han reportado incremento de los niveles de noradrenalina (NA) durante la fase luteal. Este aumento de catecolaminas prolonga la vida del cuerpo lúteo (CL) e incrementa la síntesis de progesterona (P_4), efecto mediado por la reducción de las enzimas responsables de la degradación intracelular de catecolaminas. Hasta la actualidad la posible relación entre la NA y la P_4 en la yegua permanece desconocida. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue valorar la interrelación entre la NA y la P_4 durante el periodo luteal en la yegua Pura Raza Española. Este estudio se llevó a cabo en 24 yeguas sanas con edades comprendidas entre 4 y 17 años. El desarrollo folicular, la ovulación y posterior desarrollo del CL fue monitorizado mediante ecografía (SonoSite, 180-Plus; SonoSite Inc., USA). Las muestras de sangre fueron extraídas en el día + 5 del diestro. Las concentraciones circulantes de NA fueron determinadas mediante EIA-Technical 3-CAT EIA (Demeditec Diagnostics GmbH, Alemania) y las de P_4 mediante un método de radioinmunoensayo (RIA) I-125 en fase sólida (Coat-a-Count Progesterone, Diagnostic Products Co., Los Ángeles, LA, EE. UU.), ambos validados específicamente para la especie equina. Las concentraciones de NA y P_4 en el día +5 del diestro fueron de $75,9 \pm 27,7$ ng/ml y $12,2 \pm 5,53$ ng/ml, respectivamente. Ambos parámetros no se correlacionaron ($r = 0,01$). Los resultados de este estudio muestran que, si bien el NA puede estar implicada en la función ovárica durante el ciclo estral, el periodo de dominancia de la P_4 no representa una etapa presumiblemente caracterizada por la estimulación del sistema nervioso simpático en la yegua Pura Raza Española.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Diagnóstico del parásito *Aethina tumida* (pequeño escarabajo de las colmenas) mediante observación microscópica y técnicas moleculares

L. Hernández-Martínez¹*, M.J. Ruano, M. Agüero, P. Fernández-Somalo¹

¹Laboratorio Central de Veterinaria (LCV) Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ctra. M106, pk 1,4. 28110. Algete (Madrid). España.

*email: lhmartinez@mapa.es

Aethina tumida (orden *Coleoptera*, familia *Nitidulidae*) (Murray, 1867), conocido también como el “pequeño escarabajo de las colmenas” es un parásito externo depredador de las colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera*). Su ciclo biológico se desarrolla dentro y fuera de la colmena e incluye una metamorfosis completa con cuatro estadios: huevo, larva, crisálida y adulto, viviendo las larvas y los adultos dentro de las colmenas, alimentándose de las crías de las abejas melíferas, de la miel y el polen, lo que ocasiona grandes daños en las colonias de abejas.

Es originario de las regiones subtropicales del África subsahariana, donde es considerado una plaga menor de las abejas de estas regiones. Los principales riesgos de propagación de la enfermedad incluyen el vuelo del escarabajo (hasta 10 km), la trashumancia, el viento o el transporte de productos de colmenas afectadas. Desde su introducción en los Estados Unidos de América (1996) se ha propagado a Canadá y a varios países de Sudamérica y de Centroamérica. *A. tumida* se ha hallado también en Australia, Egipto, Corea y las Islas Filipinas. En 2014 en Italia se detectó por primera vez en Europa, con presencia de focos desde entonces en las regiones de Calabria y Sicilia. España permanece libre de la enfermedad.

El Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 clasifica a la infestación por *A. tumida*, en la categoría D+E, lo que supone aplicar medidas de prevención durante los movimientos y ejercer una vigilancia de la enfermedad. Por ello, en España se incluye la detección de este patógeno en el Programa de Vigilancia sobre las Pérdidas de Colonias de Abejas. Asimismo, se dispone de un Manual Práctico de Operaciones en la Lucha contra *Aethina tumida* y *Tropilaelaps* spp., que establece protocolos de organización y actuación ante una posible introducción de estos parásitos exóticos.

La infestación de una colonia de abejas por *A. tumida* puede sospecharse de forma indirecta, por los daños producidos sobre ésta, o identificarse de forma directa mediante la observación de huevos, larvas y adultos, así como la detección de un olor fuerte a miel fermentada en las colmenas afectadas. Ante una sospecha de la enfermedad la confirmación de la presencia del parásito debe realizarse en el laboratorio. El diagnóstico laboratorial por parte de los laboratorios oficiales incluye la observación morfológica previa mediante microscopía óptica de larvas y adultos e incluso de huevos, siendo necesario establecer un diagnóstico morfológico diferencial, que en el caso de las formas adultas se hará con otros coleópteros nitidúlidos, de las formas larvianas fundamentalmente con larvas de lepidópteros, como la polilla *Galleria mellonella*, y de los huevos de *A. tumida* con huevos de *A. mellifera*, entre otros. En caso de que no se pueda descartar la presencia de *A. tumida*, se realizará en el LCV la confirmación mediante observación morfológica y su posterior identificación por PCR en tiempo real (disponible desde 2016 en el LCV), de especial utilidad para el examen de larvas y huevos, cuya morfología puede ser menos específica. Estas técnicas son las establecidas y validadas por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (EURL) para las enfermedades de las abejas y han sido



verificadas conforme a la ISO17025, siendo periódicamente evaluadas en Ensayos de Intercomparación organizados por el EURL.

En el LCV se han analizado por observación microscópica desde el año 2012 hasta la actualidad un total de 292 muestras sintomáticas, 16 muestras destinadas a exportaciones a Argentina y 8.355 muestras procedentes de importaciones de Argentina. La confirmación mediante PCR sólo fue requerida en una muestra de huevo procedente de una importación, la cual resultó negativa.

En conclusión, debido al patente riesgo de introducción en nuestro país de *A. tumida*, tanto por su presencia en Italia como por sus condiciones de dispersión, es fundamental disponer de métodos de diagnóstico fiables que permitan confirmar rápidamente una posible introducción en nuestro país. Este póster tiene por objeto mostrar las técnicas de diagnóstico de la infestación por *A. tumida* disponibles en el LCV, como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para las enfermedades de las abejas, así como el trabajo de vigilancia realizado.

Notas

Parámetros biopatológicos evaluados en sangre y plasma de ratones k18-hACE2 desafiados con SARS-CoV-2

Lidia Sánchez-Morales^{1,2}, Fátima Cruz-López¹, Teresa García-Seco¹, Néstor Porras², Kiara Acurio-Gutsche¹, Andrea Pérez-Domingo¹, Sandra Barroso-Arévalo¹, Marta Díaz-de Frutos¹, Marta Pérez-Sancho^{1,2}, Lucas Domínguez^{1,2}.

¹Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET-UCM. 28040. Madrid. España

²Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. 28040. Madrid. España

Tras la pandemia ocasionada por el virus del SARS-CoV-2 se han llevado a cabo numerosos estudios tanto epidemiológicos como experimentales en modelos animales con el objetivo de conocer mejor la enfermedad. En los centros hospitalarios, en pacientes enfermos, se registraron alteraciones tanto hematológicas como de marcadores de coagulación e inflamación asociados a la respuesta del organismo frente al COVID19. La cepa de ratón k18-hACE2 ha sido ampliamente utilizada en los estudios de COVID19. Sin embargo, hasta el momento, no existen datos que confirmen si esta cepa de ratón se comporta como el ser humano con relación a los cambios en marcadores hematológicos e inflamatorios tras la infección. En este estudio se desafió con SARS-CoV-2 a ratones k18-hACE2 mediante inoculación intranasal (n=22). Los animales fueron sacrificados a día 3 (n=6), 4 post infección (n=6), y tras desarrollo de enfermedad en función de la evaluación clínica diaria y los criterios de punto final (n=10). Además, se incluyó un grupo control (no desafiado, n=4) que fue sacrificado para comparar los resultados obtenidos. Inmediatamente antes de la eutanasia, se obtuvo una muestra de sangre completa en heparina para realizar un hemograma completo y determinar los valores de ferritina, dímero D, proteína C reactiva (CRP) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) mediante la técnica ELISA.

Los principales resultados obtenidos fueron los siguientes: el recuento total de leucocitos fue más bajo en los animales infectados frente a los controles sin infectar (p=0.023). Sin embargo, los animales infectados que superaron el día 5 post-infección, mostraron un aumento relativo de granulocitos con respecto a los controles (p=0.020). Tanto el recuento de glóbulos rojos (p=0.024) como la hemoglobina (p=0.06) y el hematocrito (p=0.062) incrementaron en los animales enfermos, probablemente por el estado preagónico al sacrificio. De los marcadores inflamatorios, la ferritina (p=0.012) y la CRP (p=0.012) se vieron elevadas significativamente en los animales infectados con sintomatología clínica (n=4/10) con respecto a aquellos que no presentaron (n=6/10), de manera similar a lo que ocurre en personas con un cuadro severo de la enfermedad, mientras que el dímero D y la iNOS no tuvieron utilidad diagnóstica en esta cepa de ratón en nuestro estudio.

Hasta donde sabemos, no se ha comprobado el comportamiento de muchos de estos factores de forma previa en ningún estudio de infección por SARS-CoV-2 en este modelo de ratón. Si bien es cierto que el número de animales utilizados en este estudio es limitado, los resultados parecen sugerir que, respecto a la mayoría de los marcadores estudiados, esta cepa de ratón se comporta como el ser humano, salvo en el caso del dímero D y la iNOS, en los que no se observaron cambios significativos.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Multiple Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) como herramienta epidemiológica en el estudio de brucelosis por *Brucella abortus* bv 3.

R. Fdez. Oropesa¹, M. Francisco Hernández¹, O. Fdez. Navarro³, I. Guerrero García³, M.J. Sánchez Guzmán³, A. Lucas Villar³, M.J. Ortega¹, I. Notario³, R. Fernández-Rivera³, MA. Perales¹, JA. Bouzada².

¹Laboratorio Central de Sanidad Animal., División de Laboratorios de la Sanidad de la Producción Agraria. Camino del Jau s/n. 18320, Santa Fe, (Granada). España.

²Laboratorio Central de Veterinaria. División de Laboratorios de la Sanidad de la Producción Agraria. Ctra. M106, Km 1,4. 28110. Algete (Madrid). España.

³Tecnología y Servicios Agrarios (Tragsatec). Julián Camarillo, 5. 28037. Madrid. España.
rforopesa@mapa.es

La brucelosis es una patología infecciosa de gran importancia económica producida por bacterias Gram negativas del género *Brucella*. Las especies más afectadas son caprinos, ovinos, bovinos y porcinos, existiendo también reservorios salvajes. La importancia de esta patología determina la aplicación de planes de erradicación, a nivel oficial, en gran parte de los países afectados basados en la identificación del agente etiológico y posterior caracterización molecular, usándola como herramienta de seguimiento epidemiológico.

La técnica conocida como MLVA (Multiple Locus Variable number of tandem repeat Analysis) es una metodología que permite discriminar entre diferentes cepas bacterianas empleando una reacción de PCR multiplex, que amplifica regiones intragénicas con número variable de repeticiones en tándem. Es un método, de bajo costo, rápida ejecución, fácil interpretación y con gran capacidad de diferenciación.

El Dpto. de Biología y Epidemiología Molecular del Laboratorio Central de Sanidad Animal de Santa Fe (Granada) ha diseñado y puesto a punto un sistema de caracterización molecular en *Brucella spp*, basado en 16 locus divididos en dos reacciones multiplex de PCR. La primera con 8 marcadores minisatélites es para identificación de especie [Bruce06 (134pb), Bruce08 (18pb), Bruce11 (63pb), Bruce12 (15pb), Bruce42 (125pb), Bruce43 (12pb), Bruce45 (18pb) y, Bruce55 (40pb)], y la segunda con 8 microsátélites [Bruce04 (8pb), Bruce07 (8pb), Bruce09 (8pb), Bruce16 (8pb), Bruce30 (8pb), Bruce18 (8pb), Bruce19 (3pb), Bruce21 (8pb)] con alto poder discriminatorio debido a su alta variabilidad que permite individualizar los brotes. Los ocho primeros corresponden al Panel 1 y los ocho siguientes son el Panel 2 (Le Flèche et al. 2006).

Utilizando esta técnica se ha llevado a cabo la evaluación de la relación entre un caso de brucelosis detectado en el año 2013 y el brote de los años 2016/17 que tuvieron lugar en la misma Comunidad Autónoma (Caso 1) y se evaluó la relación de un caso detectado en el año 2017 con otros casos ocurrido durante el 2009 de otra Comunidad Autónoma (Caso 2) e investigar si existe alguna relación entre estos dos casos.

En el Caso 1, la diferencia genética encontrada entre los genotipos detectados es muy pequeña, se limita a 2 loci de alta variabilidad, además, 3 de los 4 genotipos encontrados en este estudio coexisten en un mismo municipio. Esto nos indica que se tratan de genotipos procedentes de una cepa común. En el Caso 2, todas las muestras del brote de 2017 presentan el mismo perfil de MLVA.



Las 5 muestras representativas tomadas del brote de 2009 son idénticas para los Paneles 1 y 2A, siendo muy heterogéneo para el Panel 2B, presentando diferentes genotipos.

Entre las muestras de 2009 y 2017 se encuentran diferencias en 5 loci tanto del Panel 1 como del Panel 2B. Estas diferencias encontradas entre genotipos se estiman suficientes para considerar que las cepas de 2017 no guardan relación con las de 2009 ni tienen relación con las cepas del Caso 1.

Se considera que entre las cepas de las distintas CCAA no hay relación y pertenecen a brotes de diferente origen.

Notas

Aplicación de la tecnología AlphaLISA para la cuantificación en saliva de la proteína S100A12 en un modelo de estrés en la especie porcina.

María Botía¹, Alba Ortín¹, Silvia Martínez¹, José Cerón, Damián Escribano^{1,2}, Fernando Tecles¹

¹Laboratorio Interdisciplinar de Análisis Clínicos (Interlab-UMU), Facultad de Veterinaria, Campus Regional de Excelencia Internacional 'Campus Mare Nostrum', Universidad de Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Espinardo, Murcia, España.

²Departamento de Producción Animal Campus Regional de Excelencia Internacional 'Campus Mare Nostrum', Universidad de Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Espinardo, Murcia, España.

S100A12 o calgranulina C es una proteína proinflamatoria fijadora de calcio, expresada y secretada por granulocitos neutrófilos, perteneciente a la familia de las proteínas S100. Se trata de proteínas de bajo peso molecular (9-14 kDa) que deben su nombre a que son 100% solubles en sulfato de amonio a pH neutro (Meijer et al., 2012; Pietzsch & Hoppmann, 2009). Tienen importantes funciones a nivel intra y extracelular y son consideradas biomarcadores del sistema inmune al estar involucradas en las respuestas inflamatoria y autoinmune (Cerón et al., 2023). Su medición en saliva de la especie porcina ha sido descrita recientemente (Ortín-Bustillo et al., 2023).

El objetivo de este estudio consiste en evaluar la respuesta de la proteína S100A12 ante una situación de estrés como el transporte y llegada a matadero y su correlación con el cortisol salivar.

Las muestras de saliva fueron recogidas usando tubos de recogida de saliva (Salivette®) y esponjas. Para evaluar los posibles cambios en la proteína S100A12 ante una situación de estrés y su correlación con el cortisol salivar, 10 cerdos fueron muestreados tras su transporte a matadero (T0) y a las 4 horas de estabulación en matadero (T4) y un día antes se tomaron muestras basales en granja de los mismos animales a las mismas horas (B0 y B4). La medición de los niveles de S100A12 y cortisol se llevó a cabo mediante dos métodos basados en la tecnología Alphasisa validados para saliva de la especie porcina (López-Arjona et al., 2020; Ortín-Bustillo et al., 2023).

Los resultados mostraron un incremento significativo de los niveles de la proteína S100A12 a las 4 horas de estabulación en matadero (T4) ($p < 0.05$) respecto a B0. Además, se observó una correlación positiva entre los valores de S100A12 y cortisol salivar en la llegada a matadero (T0) ($r^2 = 0.2801$, $p = 0.0289$) y tras 4 horas de estabulación (T4) ($r^2 = 0.5011$, $p = 0.0015$).

La tecnología AlphaLISA permite detectar cambios en los niveles de S100A12 que se producen a nivel de matadero, estando estos cambios correlacionados positivamente con los niveles de cortisol salivar. Esto podría indicar que la concentración de S100A12 en saliva puede aumentar en una situación de estrés, además de en situaciones ya conocidas como inflamación o sepsis.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Estudio piloto sobre el uso del Well-sal como biomarcador de estrés en saliva del ganado porcino a nivel de matadero

María Botía¹, Damián Escribano^{1,3}, Alba Ortín-Bustillo¹, María J. López-Martínez¹, Pablo Fuentes², Francisco J. Jiménez-Caparrós², Silvia Martínez-Subiela¹, Marina López-Arjona⁴, José J. Cerón¹, Fernando Tecles¹

¹Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis (Interlab-UMU), Veterinary School, Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

²Catedra Universitaria Grupo Fuertes, Murcia, Spain

³Department of Animal Production, Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

⁴Department of Animal and Food Science, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola de Vallés, Barcelona, Spain

El control del estrés en los animales durante las horas previas a su sacrificio resulta de gran importancia, no sólo con el fin de mejorar el bienestar de los animales, sino porque dicho estrés repercute negativamente en la calidad de los productos cárnicos. Entre las herramientas que se pueden utilizar para este control, el uso de biomarcadores salivares ha experimentado un auge importante en los últimos años. En este sentido, el grupo INTERLAB-UMU ha desarrollado el biomarcador Well-sal en saliva como estimador del grado de bienestar del ganado porcino. En este estudio, se evaluó la utilidad del Well-sal para estimar el grado de estrés sufrido por los animales en su transporte y estancia en matadero para su sacrificio comparándolo con un biomarcador habitual de estrés en saliva de cerdo como es el cortisol. Para ello, se utilizaron 48 cerdos [(*Sus scrofa domesticus*) (Large White x Duroc)] de final de cebo (5–6 meses de vida). Al final de su periodo de cebo, los animales se transportaron al matadero durante 15 kilómetros para su sacrificio, según las recomendaciones descritas en la Directiva 2001/88/EC y 2001/93/EC. En el momento de la carga de los animales, éstos se dividieron en dos grupos: A) Grupo óptimo (GO, 12 machos y 12 hembras). Los animales se cargaron en el camión en último lugar y en el matadero fueron descargados en primer lugar, duchados y colocados en parques con una densidad de 1,25m² por animal y sin mezclarlos con animales desconocidos para evitar el establecimiento de nuevas jerarquías. B) Grupo sub-óptimo (GS, 12 machos y 12 hembras). Estos animales fueron cargados en el mismo camión que el grupo anterior pero en primer lugar. Una vez en el matadero, fueron los últimos en ser descargados, no fueron duchados y se colocaron en parques, mezclándolos con animales desconocidos y con una mayor densidad (0,38m² por animal). De cada animal se obtuvieron 4 muestras de saliva: dos de ellas en granja el día anterior al transporte (B0, a las 8am; y B4, a las 12am); y otras dos el mismo día del transporte (S0, justo tras su llegada a matadero a las 8am; y S4, tras 4 horas de estancia en matadero, a las 12am). En todas las muestras se midió Well-sal y cortisol. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un modelo lineal mixto en el que los tiempos de muestreo y el grupo fueron los factores fijos y el individuo el factor aleatorio. Se realizó un estudio ROC ("Receiver Operating Characteristic") y se calculó el área bajo la curva (AUC) para determinar cuál de los dos analitos permitía una mejor discriminación entre los grupos a las 4 horas



de estancia en el matadero. Para el estudio estadístico se utilizó el software estadístico SPSS (IBM Corp, Armonk, EEUU); la significación estadística se estableció en un valor $\alpha = 0,05$.

El Well-sal dio resultados similares en ambos grupos en las tomas obtenidas en granja. Sin embargo, en el matadero fue significativamente superior en el grupo GS que en el grupo GO en cada una de las dos tomas. Dentro de cada grupo, en el grupo GS el Well-sal aumentó significativamente en ambas tomas en matadero al compararlo con las tomas obtenidas en granja, mientras que en el grupo GO el Well-sal aumentó sólo tras la llegada a matadero, bajando de nuevo hasta los niveles observados en granja tras 4 horas de estancia en matadero. El cortisol mostró un comportamiento similar, salvo porque en el grupo GO se mantuvo elevado también a las 4 horas en el matadero. Al hacer el estudio ROC para diferenciar entre GO y GS, se obtuvieron valores de AUC de 0,920 ($p < 0,001$) y 0,638 ($p = 0,109$) para Well-sal y cortisol, respectivamente. En esta prueba piloto, el Well-sal no sólo permitió detectar la presencia de estrés debido al transporte de los animales, sino que resultó capaz de diferenciar entre aquellos animales que tuvieron unas condiciones peores a nivel de matadero.

Notas

Epidemiología plasmídica del gen *mcr-1* en genomas de *Escherichia coli* provenientes de humanos y ganado

Biel Garcias Puigserver¹, Mayra Alejandra Flores¹, Mercedes Fernández¹, Martí Cortey¹, Laila Darwich¹

¹Departamento de Sanidad y Anatomía Animal, Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), 08193-Cerdanyola del Vallès, Barcelona

La colistina se ha convertido en un antibiótico de último recurso para infecciones nosocomiales de bacterias gram-negativas multirresistentes (MDR). No obstante, su uso, aunque se ha reducido y prácticamente eliminado en muchos lugares del mundo, estuvo muy extendido en la ganadería. En un primer momento, se pensaba que el mecanismo de resistencia se basaba en mutaciones puntuales transmitidas verticalmente. Pero, en el 2016, el descubrimiento del gen *mcr-1* hizo saltar las alarmas ya que posibilitaba la transmisión horizontal, encontrándose prevalencias altas en el ganado. Multitud de estudios se han hecho para determinar la prevalencia de este gen, pero muy pocos tenían como objetivo analizar la vía de transmisión, habiéndose realizado solo en China.

El objetivo de este trabajo fue, usando genomas de bases de datos públicas, analizar la localización del gen *mcr-1* y las tendencias derivadas a nivel geográfico y temporal. Para ello, se descargaron todos los genomas (y sus correspondientes metadatos) de origen humano, bovino, porcino y avícola que contenían el gen *mcr-1* (n=3245). Posteriormente, usando el software MOB-SUITE, se clasificaron los "contigs" de cada genoma en plasmídicos y cromosomales y los genes de resistencia (AMR) fueron detectados con Resfinder. A parte, los fragmentos plasmídicos fueron identificados con PlasmidFinder. Así, se pudo saber la localización del gen *mcr-1*.

La mayoría de los genomas eran provenientes de Asia (n=2637) y Europa (n=421). La gran mayoría estaban localizados en plásmidos (93.7%). En concreto, IncI2 (40.4%), IncX4 (26.9%) e IncHI2 (18.9%) fueron los más prevalentes. También se observó que los dos primeros prácticamente eran solo portadores del gen *mcr-1*, mientras que IncHI2 era un plásmido MDR (con una media de 14.6 genes). No obstante, esto no significa que las cepas de *Escherichia coli* portadoras de IncX4 e IncI2 no fueran cepas MDR, puesto que, aunque en menor medida que las cepas portadoras de IncHI2 (18.1 genes de resistencia) poseían niveles elevados de genes (11.4 y 13.3, respectivamente).

Se compararon las frecuencias de los distintos plásmidos entre Asia (ampliamente estudiada) y Europa. Se observó que mientras en Asia el plásmido predominante era IncI2 (44.6%), en Europa predominaba IncX4 (53.7%). A parte, se observaron diferencias en lo referente a la evolución temporal. En Asia, las proporciones se mantuvieron relativamente estables, solo destacando una substitución progresiva de IncI2 por IncX4, pero con una regresión en los años más recientes (2020 a la actualidad) donde IncI2 volvió a ser preponderante e IncX4 residual. En cambio, en Europa, se observó una substitución clara del plásmido MDR IncHI2, por otro más especializado como IncX4.

Así, podemos concluir que el gen *mcr-1* globalmente se encuentra principalmente en los plásmidos IncI2, IncX4 e IncHI2, siendo los dos primeros especializados en el gen *mcr-1*, mientras que IncHI2 es un plásmido MDR. Además, existen diferencias claras entre Asia, donde predomina IncI2, y Europa, donde el plásmido preponderante es IncX4, lo cual debería ser tenido en cuenta en futuras medidas de control.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Diagnóstico microbiológico y perfil de resistencias antimicrobianas en conejos de compañía en España.

Mercedes Fernández¹, Biel Garcias¹, Inma Duran², Rafael A. Molina-López³ and Laila Darwich^{1*}

¹Departament de Sanitat i Anatomia Animal, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Cerdanyola del Vallès, España

²Departamento Veterinaria de Laboratorio Echevarne, S.A., 08037 Barcelona, España

³Servicio de Fauna de Cataluña, Centre de Fauna Salvatge de Torreferrussa, 08130 Santa Perpètua de Mogoda, España.

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un problema de salud global cada vez más preocupante. La estrecha relación entre las mascotas y sus dueños puede facilitar la propagación de estas bacterias resistentes, resultando una amenaza para la salud pública. Los trabajos de investigación sobre la RAM en conejos de compañía son muy escasos. En nuestro estudio se analizaron registros de 3596 resultados microbiológicos de casos clínicos procedentes de clínicas de prácticamente todas las comunidades autónomas de España, enviados a un laboratorio de diagnóstico veterinario entre 2010 y 2021. Los resultados mostraron que la mayoría de las muestras enviadas procedían de problemas respiratorios (53%), de otitis (18%) o de abscesos cutáneos alrededor de la cabeza (16%). Los agentes diagnosticados con mayor frecuencia fueron *Staphylococcus* spp. (15,8%), *Pseudomonas* spp. (12,7%), *Pasteurella* spp. (10%), *Bordetella* spp. (9,6%) y *Streptococcus* spp. (6,8%). La familia *Enterobacteriaceae*, principalmente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*, representaron alrededor del 18% de los casos y se aislaron en una gran diversidad de procesos patológicos. Con respecto a las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, las especies bacterianas que mostraron una mayor resistencia (con una media de cinco clases de antimicrobianos) fueron *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia* spp. La familia de las enterobacterias presentó unos porcentajes muy elevados de multi-resistencia (MDR) sobre todo en *K. pneumoniae* (58%), *E. coli* (48%) y *E. cloacae* (36%). Por el contrario, las infecciones causadas por *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y *P. multocida* fueron altamente sensibles a los antimicrobianos convencionales autorizados para uso veterinario (categorías D y C).

En conclusión, en los conejos de compañía encontramos una emergente aparición de patógenos MDR nosocomiales, como *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* y *K. pneumoniae* que pueden representar un grave problema de salud pública. Teniendo en cuenta que las bacterias predominantes descritas en este trabajo están dentro de los principales patógenos involucrados en muertes humanas en hospitales debido a sus RAM, es crucial que tanto médicos como veterinarios trabajemos en consonancia para optimizar y racionalizar el uso prudente de antibióticos en los animales domésticos y en las personas bajo el enfoque de Una Sola Salud.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Paratuberculosis caprina en Canarias: valoración serológica en granjas con y sin vacunación frente a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

Elena Plamenova Stefanova^{1,2} *, Yania Páz-Sánchez^{1,2}, Oscar Quesada-Canales^{1,2}, Antonio Espinosa de los Monteros^{1,2}, Antonio Fernández^{1,2}, Miguel Antonio Rivero^{1,2} y Marisa Andrada^{1,2}

¹Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

²Departamento de Morfología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. marisaana.andrada@ulpgc.es

La paratuberculosis (PTB) es causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) y ocasiona notables pérdidas económicas a la industria ganadera de rumiantes a nivel mundial. Entre las pruebas rápidas para detección de la enfermedad destacan las pruebas serológicas, como el ELISA, para detección de anticuerpos frente a MAP. Destacar, que la comunidad autónoma de Canarias cuenta con un total de 202.887 cabezas de caprino distribuidas en 1289 ganaderías. Desde 2017 la provincia de Las Palmas es oficialmente indemne de tuberculosis bovina y en 2018 se reguló la vacunación en explotaciones con confirmación diagnóstica de PTB requiriendo de la autorización de la CCAA para su aplicación. Los test de ELISA disponibles en el mercado no tienen capacidad de distinguir entre anticuerpos vacunales y anticuerpos post-infección. En el presente estudio se valoraron los niveles de anticuerpos frente a MAP en 11 explotaciones situadas en las islas de Gran Canaria y Fuerteventura. Con un kit comercial de ELISA (PARACHECK®) se analizaron un total de 5112 sueros; de los acules se procesaron 1415 en un primer muestreo. Los resultados de la valoración serológica inicial fueron confirmados mediante técnicas de diagnóstico directas incluyendo necropsias, inspección en matadero, confirmación histopatológica, histoquímica, inmunohistoquímica y pruebas de biología molecular (real-time PCR). Posteriormente, 7 explotaciones iniciaron el protocolo de vacunación frente a MAP con la vacuna comercial Gudair®. La prevalencia inicial (pre-vacunación) fue de 18,6% con variaciones entre las granjas de un 2,5% a 61%. En 4 explotaciones sin vacunación y en muestreos sucesivos (2º, 3º, 4º, 5º, y 6º) se observó que las prevalencias se mantuvieron o aumentaron. Los animales procedentes de explotaciones que vacunaron fueron seroconvirtiendo por el efecto de la vacuna, si bien hubo un 30,4% que no evidenciaron anticuerpos hasta los 18 meses post-vacunación. El presente estudio evidencia la presencia de PTB en los rebaños caprinos de Canarias y da pie a futuros trabajos sobre estrategias diagnósticas combinadas para el control y prevención de la enfermedad.

El presente estudio fue financiado por los proyectos FCC-FC-2019-03 y subvención concedida (PROID2020010047) por el Gobierno de Canarias, Consejería de Economía, Conocimiento y Empleo; Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información, destinadas a la realización de proyectos de I+D en las áreas prioritarias de Canarias RIS-3, cofinanciada a través del PO FEDER Canarias 2014 2020. EPS

* es beneficiaria de contrato predoctoral con referencia FPU20/03693 financiado por el Ministerio de Universidades.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Caracterización de la microbiota intestinal de alcatraces atlánticos (*Morus bassanus*) infectados con el virus influenza H5N1 de alta patogenicidad.

Marta Barral^{1*}, Vega Alvarez¹, Xeider Gerrikagoitia¹, Jose Luis Lavín²

¹ NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA). Dpto. Sanidad animal. 48160 Derio (Bizkaia)

² NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA). Dpto. Matemática aplicada. 48160 Derio (Bizkaia)

* mbarral@neiker.eus

El alcatraz atlántico (*Morus bassanus*) ha sido una de las especies de aves marinas más afectadas por la infección con el virus influenza aviar de alta patogenicidad H5N1 en el último año. La microbiota digestiva parece tener un importante papel en la salud de las aves silvestres, y esta comunidad microbiana se puede ver alterada por diversos factores, incluyendo la infección con el virus de la influenza aviar. El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar la microbiota intestinal del alcatraz atlántico teniendo en cuenta si se encontraba o no infectado con H5N1 de alta patogenicidad. Así, entre septiembre y octubre de 2022 se tomaron muestras de escobillón cloacal de 20 ejemplares. Se llevó a cabo la extracción del DNA y el RNA en robot Biosprint y se analizaron las muestras mediante distintas RT-qPCR para la detección del virus influenza H5N1. Nueve de los ejemplares estaban infectados con H5N1 y 11 fueron negativos. Las muestras de DNA obtenidas se cuantificaron y se determinó su pureza en fluorímetro y espectrofotómetro respectivamente. Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación del gen 16S rRNA (V3-V4), la construcción de librerías y su secuenciación con la tecnología Illumina, obteniéndose en torno a 200.000 lecturas para cada muestra. El análisis bioinformático, se realizó con el entorno de QIIME 2, utilizando DADA2 para el proceso de filtrado de secuencias y detección de quimeras y SILVA ver 132 como base de datos de referencia para la asignación filogenética de las lecturas. Además, se utilizaron las diferentes herramientas propias del entorno para el cálculo de las métricas de diversidad alfa y beta y los otros cálculos estadísticos y representaciones graficas como barplots o PCoAs en 3D.

El análisis de las 1.242.984 secuencias de bacterias obtenidas ha permitido asignarlas a 16 filos siendo los 5 más abundantes *Epsilonbacteraeota* (28,6%), *Planctomycetes* (24,3%), *Actinobacteria* (17,5%), *Firmicutes* (10,0%) y *Synergistetes* (7,9%), que aglutinan el 88,2% de la abundancia relativa. Las bacterias identificadas se han agrupado en 212 géneros de los cuales se han podido llegar a identificar 137 a nivel de especie.

No se han observado diferencias significativas en la abundancia relativa y en la diversidad alfa de las bacterias detectadas en relación con la infección con el virus influenza H5N1, ni tampoco con el resto de los factores estudiados como el sexo, la edad, el origen geográfico o la semana de captura, entre otros. Aunque sí se ha constatado una alta variabilidad en la microbiota de los alcatraces atlánticos y una alta heterogeneidad dentro de los distintos grupos analizados. Sin embargo, se pueden apreciar algunas tendencias en la abundancia relativa de algunas bacterias. En relación con los filos más frecuentemente detectados en los ejemplares infectados por H5N1 frente a los no infectados, se han identificado *Planctomycetes* (32,3% en los positivos frente a 16,3% en los negativos), *Epsilonbacteraeota* (19,3% en los positivos frente a 37,8% en los negativos), *Synergistetes* (15,4% en los



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

positivos frente a 0,4% en los negativos), *Firmicutes* (14,3% en los positivos frente a 5,8% en los negativos) y *Actinobacteria* (8,5% en los positivos frente a 28,4% en los negativos). También es de destacar la identificación de algunas especies de bacterias de interés sanitario, incluidas en los géneros *Mycoplasma*, *Chlamidia*, *Campylobacter*, *Corynebacterium* o *Suttonella*.

Estudio financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto PID2020-114060RR-C31) y por el Departamento de Desarrollo Económico, Sostenibilidad y Medio Ambiente del Gobierno Vasco (proyecto VIGIA-2200003).

Notas

Utilización de una toxina recombinante para la detección de toxina B original en cepas de *Clostridioides difficile*

Marta E. García¹, Daniela Tercero-Guerrero¹, Mercedes Domínguez², Inmaculada Moreno², Sergio Álvarez-Pérez¹, José L. Blanco¹

¹Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, España

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

Clostridioides (Clostridium) difficile (CD) es un patógeno entérico zoonótico. En humanos, la infección por CD (ICD) está principalmente asociada al uso de antimicrobianos que alteran la microbiota intestinal. En veterinaria, tiene importancia principalmente en la especie porcina, como causante de diarreas neonatales que originan graves pérdidas económicas. Otras especies animales también pueden verse implicadas, bien con clínica evidente o simplemente como transmisores de la bacteria. Es por tanto un evidente ejemplo del concepto One Health. Su acción patógena se debe a la producción de 3 toxinas: toxina A, toxina B y toxina binaria. Se considera que la toxina B juega un papel predominante en el desarrollo de la enfermedad, lo que hace que esta toxina sea la diana preferente de las pruebas de diagnóstico laboratorial.

El Objetivo del presente trabajo fue desarrollar un ELISA para poder cuantificar la producción de TcdB en diferentes aislados de CD. Para la implementación del ELISA se produjeron anticuerpos (Ac) de captura y de detección de antígeno. Primero, se realizó el diseño de la proteína recombinante (B-Tcd). Seleccionamos el dominio CROPs de la toxina B (540 aminoácidos). Se utilizó el vector de expresión pET-28a(+) de Novagen (Gen de resistencia a Kanamicina. Promotor T7lac) y la cepa bacteriana *Escherichia coli* BL21(DE3) de Life Technologies. Esta B-Tcd se utilizará como estándar para la curva patrón en el ELISA- Sándwich y como antígeno de inoculación para la producción de anticuerpos monoclonales (AcM) de ratones y policlonales (AcP) de conejo.

Por otro lado, hemos procedido al desarrollo de anticuerpos monoclonales (AcM) frente a la toxina B de CD, para ello, a ratones BALB/c se les administró la B-Tcd. Los esplenocitos procedentes del ratón con una respuesta humoral mayor frente al antígeno, analizada por ELISA y Western blot, fueron fusionados con células de mieloma de ratón SP2. Los hibridomas productores de anticuerpos específicos resultantes de la fusión, han sido seleccionados mediante ELISA indirecto y Western blot frente a la proteína recombinante. En la actualidad, se está realizando la selección de clones que tengan reactividad frente a la toxina nativa y la toxina recombinante para utilizarlo como AcM.

Finalmente, hemos obtenido un anticuerpo policlonal (AcP) de conejo frente a la toxina B empleando como inmunógeno la toxina recombinante y el toxoide.

Se ha desarrollado un ELISA- Sándwich utilizando los AcM para captura de antígeno y el AcP para el revelado. Se ha utilizado la B-Tcd para calcular el valor de EC50 para cada AcM y el límite de detección del ensayo se calculó con el AcM 2, con un resultado de 0,03 ug/ml.

Este trabajo se ha desarrollado con la financiación del Proyecto del Plan Nacional Referencia: PID2019-18071RR-C22.



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Notas

Identificación de proteínas animales transformadas en harinas cárnicas destinadas a alimentación animal

M.J. Martínez¹, M. Estévez, M², E. Velasco, E², C. Pascual¹ y J.A. Bouzada¹

¹Laboratorio Central de Veterinaria (LCV). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ctra. M-106, pk 1,4. 28110. Algete (Madrid). España.

²Tecnología y Servicios Agrarios (Tragsatec). Julián Camarillo, 5. 28037. Madrid. España.
mjmartinez@mapa.es

Actualmente, la industria cárnica genera una gran cantidad de subproductos que no pueden ser destinados al consumo humano. Entre ellos se incluyen materiales como piel, huesos, cuernos, sangre, cáscaras de huevo, etc. Muchos de ellos tienen características que resultan interesantes. Algunos tienen un alto valor nutritivo y, por tanto, pueden utilizarse para fabricar productos como fertilizantes, piensos, biocombustibles y cosméticos. Otros, como las grasas animales y los aceites vegetales, pueden utilizarse en la producción de fuentes de energía alternativas como el biodiésel o los combustibles renovables. Su uso contribuye a disminuir la cantidad de residuos y al aprovechamiento de los recursos, lo que puede aportar recursos económicos adicionales.

El uso, almacenamiento, transformación y eliminación de subproductos animales está estrictamente regulado en la UE. En el año 2001, la UE a través del Reglamento (CE) 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo prohibió el uso de proteínas animales transformadas (PAT) en la alimentación animal para evitar que la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) se pudiera propagar de los animales a las personas a través de la cadena alimentaria.

El asesoramiento científico de la EFSA sobre subproductos animales sirvió de base a la decisión de levantar parcialmente la prohibición de su uso para la alimentación animal en la UE. El cambio en la legislación tuvo lugar en 2021 a través del Reglamento (UE) 2021/1372 de la Comisión y permitió que algunas proteínas animales transformadas (PAT) comenzaran a utilizarse en piensos destinados a ciertas especies.

La transparencia y trazabilidad en la producción y etiquetado de las harinas cárnicas destinadas a alimentación animal es un tema crucial en la seguridad alimentaria. Por ello es importante disponer de métodos analíticos rápidos, fiables y seguros que sean capaces de detectar si existen proteínas animales transformadas en los piensos y de qué especie proceden dichas proteínas. De este modo se puede verificar el cumplimiento de la legislación vigente.

Desde 2013, la microscopía óptica clásica y la PCR son los métodos oficiales para la detección de PAT en piensos compuestos en la Unión Europea. Estos dos métodos son complementarios ya que la microscopía óptica aporta la observación de ausencia/presencia de PAT en la muestra y la PCR aporta información de la especie de la que provienen dichas PAT.

Los diferentes métodos de PCR, gracias a la buena estabilidad del ADN frente a las altas temperaturas y a los procesos de transformación, han demostrado su eficacia para la detección de proteínas animales transformadas a concentraciones bajas en piensos. (*Aarts et al., 2006; Fumière et al., 2006; Prado et al., 2007; Cawthraw et al., 2009*).



El Laboratorio Central de Veterinaria ha implementado los métodos publicados por el Laboratorio Europeo de Referencia como herramienta para la supervisión del uso seguro, transparente y eficaz de las proteínas animales transformadas. Dichos métodos usan la tecnología de PCR a tiempo real. Se ha llevado a cabo un estudio de diversas harinas cárnicas para alimentación animal elaboradas con subproductos de distintas especies animales, comparando los métodos implementados con otros comercializados actualmente por distintos fabricantes. Los resultados que se muestran en este trabajo avalan el compromiso de las instituciones con la seguridad alimentaria y con el cumplimiento de la legislación existente.

Notas

Validación analítica de la determinación de citoquinas en muestras de saliva porcinas

Raquel Pato¹, Yolanda Saco¹, Lorena Castillejos², Raquel Peña¹ and Anna Bassols¹

¹Servicio de Bioquímica Clínica Veterinaria. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultat de Veterinaria. Universitat Autònoma de Barcelona.

²SNiBA (Servicio de Nutrición y Bienestar Animal) Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Facultat de Veterinaria. Universitat Autònoma de Barcelona

s.bioquimica.clinica@uab.cat

Las citoquinas son un conjunto de proteínas y glicoproteínas secretadas principalmente por células del sistema inmune. Desempeñan un papel clave en la respuesta inmune innata e inducen la respuesta inflamatoria estimulando la síntesis de proteínas de fase aguda. Son biomarcadores tempranos del estado de salud y bienestar animal.

La saliva refleja los niveles de algunos biomarcadores en suero. Se obtiene mediante procedimientos no invasivos, sin estrés para el animal y se pueden recoger diferentes muestras en un intervalo reducido de tiempo, siendo esto de especial importancia en la determinación de citoquinas, que poseen una vida media corta. El análisis de citoquinas en saliva es un buen marcador de algunas enfermedades en la especie humana. En medicina veterinaria se han analizado varios biomarcadores en saliva porcina, p.ej. cortisol o proteínas de fase aguda, pero la información sobre citoquinas en saliva aún es escasa, siendo más común su análisis en suero/plasma.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar la validación analítica del kit MILLIPLEX® MAP Porcine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel en muestras de saliva porcina.

Material y métodos: Se analizaron 40 salivas de cerdos de engorde Ibérico x Duroc, obtenidas mediante Salivette® y conservadas a -20°C. El panel analiza 19 citoquinas simultáneamente: BMP-2, CD34, GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-1 RA, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, MMP-1, PDGF-BB, PECAM-1, SERPIN E1-PAI-1 y TNF α mediante tecnología Luminex® y lectura con el equipo MAGPIX®. **Resultados:** Las 19 citoquinas analizadas en muestras de saliva fueron detectables dentro del rango lineal, a excepción del PDGF-BB. La precisión (CV intra-ensayo) fue <15%, exceptuando IL-6, IL-12 y PDGF-BB.

IL-1 α , IL-1 RA, PECAM-1 y TNF α mostraron buena linealidad bajo dilución ($R^2 >0,99$), pero no fue así para CD34, IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-18, MMP-1, PDGF-BB y SERPIN. Debería reevaluarse la linealidad en BMP-2, GM-CSF, IL-2, IFN γ , IL-4, IL-6 y IL-12 con muestras de concentración más elevada. La recuperación obtenida estuvo dentro del rango aceptable para la mayoría de las citoquinas (80-120%), excepto BMP-2, IFN γ , IL-1 RA y PDGF-BB.

Discusión: La falta de publicaciones sobre citoquinas en saliva porcina, remarca la importancia de realizar este estudio de validación. A todo ello, se suma la facilidad de recogida de la muestra, sin apenas estrés para el animal y la capacidad de realizar múltiples muestreos en un mismo animal/día. El análisis de muestras de saliva con el kit de suero porcino obtuvo valores dentro del rango lineal y buena precisión (CV intra-ensayo <15%) en la mayoría de citoquinas, aunque los resultados de validación de cada parámetro por separado fueron desiguales. IL-1 α , PECAM-1 y TNF α presentaron los mejores resultados en la validación analítica. Se requieren futuros estudios para el cálculo del CV



inter-ensayo, mejorar las pruebas de linealidad con muestras de concentración superior y realizar la validación biológica.

Conclusiones: La saliva porcina es una muestra adecuada para medir citoquinas mediante el MILLIPLEX® MAP Porcine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel.

Las citoquinas que presentan mejores resultados en la validación analítica en saliva son: IL-1 α , PECAM-1 y TNF α .

Se requieren estudios para establecer valores de referencia en saliva porcina y evaluar el ritmo circadiano de secreción y/o el comportamiento de éstas bajo diferentes condiciones.

Notas

Utilidad de las citoquinas proinflamatorias como marcadores de inmunidad inducida por micobacterias en modelo porcino

Teresa García-Seco¹, Inmaculada Moreno², Carmen Herranz¹, Andrea Pérez-Domingo¹, Alberto Díez-Guerrier^{3,4}, Aránzazu Buendía¹, Fátima Cruz¹, Mercedes Domínguez², Lucas Domínguez^{1,4}, Marta Pérez-Sancho^{1,4}

¹Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET-UCM. 28040-Madrid, España.

²Unidad de Inmunología Microbiana, Instituto de Salud Carlos III. 28222-Majadahonda, España.

³MAEVA SERVET S.L., 28749-Alameda del Valle, España.

⁴Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. 28040-Madrid, España.

maparezs@visavet.ucm.es

La constante búsqueda de alternativas más eficaces para el control de enfermedades se ha traducido en los últimos años en un incremento de los estudios en el ámbito de la inmunidad innata entrenada (IIE). La IIE es la capacidad del sistema inmune innato para mejorar su capacidad de respuesta tras una exposición inicial a ciertos microorganismos o estímulos específicos (p.ej. *Mycobacterium bovis* BCG o β -glucano), donde monocitos o macrófagos experimentan cambios epigenéticos y metabólicos que se traducen en una respuesta no específica más eficiente frente a agentes heterólogos. Múltiples estudios han evaluado la capacidad de distintas micobacterias y sus derivados en estimular la IIE y su consiguiente contribución al control de distintas enfermedades infecciosas (e incluso tumorales). Así, la IIE abre una nueva línea de investigación para el diseño de vacunas frente a patologías contra las cuales no se dispone aún de vacunas eficaces y universales. En este contexto, el proyecto PID2020-112966RB-I00 se centra en la evaluación y puesta a punto de un modelo experimental porcino dirigido a estudiar la capacidad de la BCG para estimular la IIE, tomando como modelo la infección por *Streptococcus suis*, un patógeno de gran importancia en la producción porcina en todo el mundo.

Se trabajó con 20 lechones de 35 días (4 animales/grupo): grupo A (BCG viva vía intravenosa una dosis), B (BCG inactivada vía intravenosa una dosis), C (BCG inactivada vía intravenosa dos dosis -separadas 14 días-), D (BCG inactivada vía oral una dosis) y E (control no inoculado). Se tomaron muestras de sangre completa los días 14, 36, 57, 91 y 120 tras la inoculación de BCG y se llevó a cabo la estimulación *in vitro* de las muestras en paralelo con antígeno de *S. suis* inactivado y PBS, recogiendo el plasma tras 24 h de estimulación. Las muestras se analizaron mediante el sistema ProcartaPlex y el equipo Luminex (ThermoFisher Scientific) para la cuantificación de las citoquinas IL1- β , IL-6, TNF- α y IFN- γ , dado que se ha observado que la reprogramación epigenética y metabólica conduce a un aumento de citoquinas proinflamatorias en respuesta a estímulos secundarios, considerándose así marcadores de estimulación de la IIE.

En el primer muestreo post inmunización (día 14) en todos los grupos inmunizados se observó una mayor respuesta en sangre estimulada con *S. suis* respecto a la estimulación con PBS para las citoquinas IL1- β , IL-6, TNF- α . Dicha diferencia fue estadísticamente significativa para IL1- β e IL-6 cuando se empleó BCG inactivada intravenosa (analizando en conjunto los grupos de una y dos dosis). Sin embargo, dicha respuesta no se mantuvo en muestreos posteriores. Por otro lado, la citoquina IFN- γ mostró valores muy bajos en todos los grupos y momentos de muestreo.



Estos resultados ponen de manifiesto la posible utilidad de este tipo de análisis como marcadores del desarrollo de la inmunidad innata si bien a su vez muestran limitaciones en el presente modelo empleado, lo que sugiere la complejidad en la evaluación de la modulación de la IIE basada en la respuesta en células periféricas y, en consecuencia, la necesidad de optimizar las herramientas disponibles para caracterizar e interpretar la relación entre distintos marcadores de IIE (en distintos modelos experimentales y con diferentes candidatos en evaluación) y la capacidad de inmunomodulación de la BCG en el desarrollo de diversas enfermedades.

Notas



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA



XXVI
SIMPOSIO AVEDILA

Autores de Comunicaciones

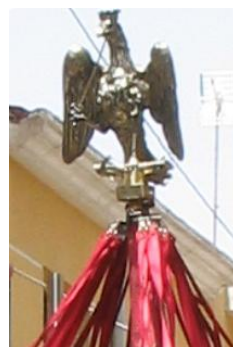
Adriana Muñoz	adriana.munoz@irta.cat	Pag 52
Alberto Alvarado Piqueras	alberto@grefa.org	Pag 96
Alberto Espí Felgueroso	aespi@serida.org	Pag 34
Alberto Gómez Buendía	agbuendia@ucm.es	Pag 54, 92
Alejandra Castillo	alejandra.castillo@innovative-diagnostics.com	Pag 86
Álvaro Hidalgo	alvaro-hidalgo@idexx.com	Pag 128
Ana Isabel Abad Fau	699930@unizar.es	Pag 56, 98
Ana Rebeca Zamora	anarebecazamora@hotmail.com	Pag 60
Ángela Bononat	angela.bononat@eu.goldstandarddiagnostics.com	Pag 124, 126
Antonio Martínez-Murcia	ammurcia@umh.es	Pag 100
Antonio Rodríguez Bertos	arbertos@ucm.es	Pag 40
Beatriz Romero	bromerom@ucm.es	Pag 62
Bernabé Diéguez Roda	at_algete98@mapa.es	Pag 102
Bernat Pérez de Val	bernat.perez@irta.cat	Pag 64
Carlos Martínez Gómez	carlosmartinezvet@gmail.com	Pag 104
Carlos Velasco Reinaldos	carvelas@ucm.es	Pag 66
Carmen Calvo Santalla	carmen.calvo.santalla@xunta.gal	Pag 68
Carmen Tarradas	sa1taigc@uco.es	Pag 106, 108
Chloe Wayman	c.wayman@uah.es	Pag 70
Concepción López Maroto	clmaroto@mapa.es	Pag 110
Cristian Melgarejo	cristiandavid.melgarejo@irta.cat	Pag 112
Cristina de Frutos Escobar	cdefrutos@mapa.es	Pag 114
David Antón Carmena	dacarmena@isciii.es	Pag 72, 90
David Sanmiguel Poveda	dermvetsanmiguel@gmail.com	Pag 44
Elena Plamenova Stefanova	elena.plamenova101@alu.ulpgc.es	Pag 116
Fernando Cardoso Toset	fcardoso@cicap.es	Pag 118, 120
Gema Bru	laboratory@geneticpcr.com	Pag 58
Gemma Velasco	mariagemma.velasco@alumnos.uchceu.es	Pag 122
Ignacio Arnaiz Seco	ignacio.arnaiz.seco@xunta.gal	Pag 74
Iratxe Pérez Cobo	iperezco@mapa.es	Pag 76, 132
Isabel Gonzalo Pascual	igonzalo@mapa.es	Pag 78
Javier Bezos Garrido	jbezosga@visavet.ucm.es	Pag 80
Jose Luis Blanco	jlblanco@vet.ucm.es	Pag 134, 136
José Manuel Sánchez-Vizcaíno	jmvizcaino@ucm.es	Pag 20



Joseba M. Garrido Urkullu	jgarrido@neiker.eus	Pag 30
Juan Manuel Corral	jmcorral@mapa.es	Pag 138
Julio Álvarez Sánchez	jmcorral@mapa.es	Pag 38
Katuska Satué Ambrojo	ksatue@uchceu.es	Pag 140, 142
Leticia Hernández Martínez	lhmartinez@mapa.es	Pag 144
Lidia Sánchez Morales	lidsan05@ucm.es	Pag 146
Lilianne Ganges	lilianne.ganges@irta.cat	Pag 32
Loïc Commun	loic-commun@idexx.com	Pag 130
María Botía	maria.botiag@um.es	Pag 150, 152
María Dolores Tabar	loli.tabar@veterinariosanvicente.com	Pag 42
María Jesús Ortega	mosanchez@mapa.es	Pag 28
María Mercedes Fernández	mariamercedes.fernandez2@autonoma.cat	Pag 154, 156
Marisa Ana Andrada	marisaana.andrada@ulpgc.es	Pag 158
Marta Barral Lahidalga	mbarral@neiker.eus	Pag 160
Marta Eulalia García	megarcia@ucm.es	Pag 162
Marta Martínez Galiana	mjmartinez@mapa.es	Pag 164
Marta Pérez Sancho	maperezs@ucm.es	Pag 36
Marta Valero Lorenzo	mvalero@mapa.es	Pag 26
Montserrat Agüero	maguerog@mapa.es	Pag 22
Natalia Elguezabal	nelguezabal@neiker.eus	Pag 84
Pachi Clemente	clemente@colvet.es	Pag 46
Raquel Pato González	s.bioquimica.clinica@uab.cat	Pag 166
Rocío Fernández Oropesa	rforopesa@mapa.es	Pag 148
Rubén Villalba	rvillalba@mapa.es	Pag 24
Sandra Barroso	sandrabarroso@ucm.es	Pag 18
Silvia Martínez Subiela	silviams@um.es	Pag 48
Teresa García Seco	teresagsr@visavet.ucm.es	Pag 168
Víctor Lorente	vicloren@ucm.es	Pag 88, 82

Insignia del Oriol de la Gloriosa Enseña del Oriol, Estandarte de la Ciudad de Orihuela

El Oriol o Herodio, un ave mítica en el remate de la bandera de Orihuela, con corona real, con alas a medio desplegar, con la pata izquierda posada sobre un leño, mientras que con la derecha empuña la espada haciendo honor al lema "Semper ensis vester prevaluit" (Siempre prevaleció vuestra espada), lema concedido a la ciudad por el Privilegio Real del Morabatin, por el rey Pedro el Ceremonioso, en honor a la defensa del Reino de Valencia que hizo la ciudad de Orihuela.



La bandera de Orihuela, nombrada tradicionalmente como Gloriosa Enseña del Oriol, Estandarte de la Ciudad de Orihuela o Pendón de Orihuela, es la bandera del municipio homónimo. Se trata de una de las banderas más antiguas de España, incluso más antigua que la Señera valenciana. Se tiene constancia de que, ya en torno al año 1400, se sacaba la bandera en procesión para celebrar las fiestas de la Reconquista; cada 17 de julio se expone en el balcón del Ayuntamiento y, durante la mañana, la bandera es bajada desde ese balcón con unas cintas de seda para que no se incline, y en solemne desfile se dirige hasta la Catedral de la Diócesis. A su vuelta, se vuelve a izar al balcón hasta que a la media noche de ese día se retira del balcón y vuelve a ser custodiada en la Sala Oriol del Ayuntamiento. Posee los títulos de Real y Gloriosa. La Gloriosa

Enseña del Oriol cuenta con privilegios históricos de no inclinarse ante nadie, salvo ante Dios y ante el Rey; por ello la bandera está considerada uno de los símbolos de mayor tradición de España.

Dr. JM Sánchez-Vizcaino DVM, PhD, DhC

Licenciado y doctorado en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), postgrado en la Universidad de Cornell, Ithaca, NY. A su vuelta a España, 1978, se incorpora al Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y Alimentarias (INIA), ocupando posiciones relevantes como: director del Departamento de Virología Animal; del Dpto. de Sanidad Animal; director-fundador del Centro de alta seguridad biológica (BSL3+) del Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA).

Actualmente es Catedrático de Sanidad Animal de la Universidad Complutense de Madrid, en el Departamento de Sanidad animal de la Facultad de Veterinaria y en el



Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria - VISAVET, director del laboratorio de referencia de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE; ahora WOA - World Organisation for Animal Health) para Peste Porcina Africana y Peste Equina Africana. Co-autor de más de 300 publicaciones científicas en revistas internacionales de alto impacto, así como de 49 capítulos en libros de prestigio internacional (algunos manuales de la OIE), y cursos digitales dedicados a estas infecciones y su control. Director de numerosos proyectos de investigación nacionales e internacionales y 37 tesis doctorales, más de un centenar de contratos de I+D, en 20 patentes y ponente en más de 900 congresos, conferencias, jornadas cursos, colaborando con medios de difusión científica (TV, radio, prensa, vídeo, web) por todo el mundo. IP del proyecto europeo VACDIVA, "Una vacuna contra la Peste Porcina Africana" (10 millones de €) y el financiado por el ISCIII "Impacto de la COVID-19 en mascotas" .

Ha contribuido en el control y erradicación de varias enfermedades animales en cuatro continentes (Peste porcina africana, Peste equina, Peste porcina clásica), gracias al desarrollo de métodos y reactivos de diagnóstico rápidos y sensibles, nuevas estrategias y modelos epidemiológicos, y al desarrollo de vacunas.

Ha recibido condecoraciones y nombramientos nacionales e internacionales, entre ellas: la Encomienda de Número de la Orden del Mérito Agrario (1999) y del Mérito Alimentario (2003), la Cruz del Mérito Militar con distintivo blanco (2003), por sus contribuciones en

sanidad animal y en el control de enfermedades infecciosas. Premio ANAPORC 1990, Internacional "PORCO BRAVO 1999", Sanidad y Producción porcina 2000, "Los mejores de La Verdad 2007", Albéitar 2012 en Categoría Científica, Premio de INVESTIGACIÓN SEPOR 2019, y A de ORO de ALBEITAR 2021 del Colegio de Veterinarios de la Región de Murcia. Premio Isabel Mínguez Tudela a INNOVACIÓN CIENTÍFICA 2021 y Premio ANIMAL HEALTH 2023, A UNA TRAYECTORIA PROFESIONAL

Medalla al Mérito de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), como reconocimiento internacional a sus servicios excepcionales a la ciencia veterinaria (Paris 2009). Doctor Honoris Causa por la Universidad de Murcia (2010), George C. Poppensiek Visiting Professor in Global Animal Health por la Universidad de Cornell (Ithaca 2013) y Profesor Honorífico de la Universidad de Minnesota (desde 2018).

Mas información en la web: www.sanidadanimal.info