Patogenicidad, diagnóstico y control de *Haemophilus parasuis*

Virginia Aragón, Nuria Galofré-Milà, Bernardo Bello-Ortí y Florencia Correa Fiz

Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA) y Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona

virginia.aragon@cresa.uab.es

Foto de grupo. Miembros actuales del grupo. De izquierda a derecha, Nuria Galofré, Florencia Correa Fiz, Virginia Aragón y Bernardo Bello.

Haemophilus parasuis es el agente causal de la enfermedad de Glässer, una enfermedad sistémica caracterizada por poliserositis fibrinosa, meningitis y artritis. Esta enfermedad es una de las más importantes en los lechones destetados, aunque también puede afectar a los cerdos en otras fases de producción. Las infecciones por *H. parasuis* tienen un gran impacto económico en todos los países productores de porcino.

H. parasuis es una bacteria exclusiva del cerdo que es capaz de colonizar las vías respiratorias superiores de este animal desde temprana edad. En los lechones, *H. parasuis* se detecta en la cavidad nasal desde los dos días de vida. Esta colonización temprana se produce al transmitirse la bacteria por contacto directo entre los lechones y su madre, de quien, a la vez, obtienen anticuerpos que los protegen.

Esta doble vida, como parte de la microbiota respiratoria y como patógeno, es el reflejo de la existencia de una gran variabilidad de cepas, que van desde no virulentas (colonizadoras) a altamente virulentas (invasivas).

El control de la enfermedad se puede realizar mediante una rápida intervención con antimicrobianos o mediante programas de vacunación, ya que *H. parasuis* es un patógeno extracelular y se ha demostrado que los anticuerpos son esenciales en la protección. Las vacunas comerciales son bacterinas, que proporcionan una protección dependiente de serovariedad. En la actualidad hay una gran presión social para reducir el uso de antibióticos en el ganado, por lo que es necesaria una vacuna eficaz frente a todas las cepas virulentas.

La patogenia de la enfermedad de Glässer conlleva un paso de la bacteria por el pulmón antes de proceder a la invasión sistémica. Como se ha dicho anteriormente, no todas las cepas de *H. parasuis* tienen la misma capacidad patogénica. Las cepas que no poseen factores de virulencia, cuando alcanzan el pulmón son eliminadas por los macrófagos alveolares y la infección queda controlada (Figura 1A). Así, la localización de las cepas no virulentas se limita al tracto respiratorio superior donde no representan un riesgo para la salud de los lechones. Por otro lado cuando una cepa virulenta alcanza el pulmón, se induce una clara infiltración de neutrófilos (Figura 1B) y una inhibición de la activación de los macrófagos alveolares. La resistencia a la fagocitosis de las cepas virulentas parece implicar varios

mecanismos, entre ellos la expresión de cápsula bacteriana. Además, las cepas virulentas son capaces de incorporar ácido siálico a moléculas de su superficie, como el lipooligosacárido y el polisacárido capsular, que puede facilitar la evasión del sistema inmune. Al no ser eliminadas por los macrófagos, las cepas virulentas se multiplican dentro del animal y pueden alcanzar el torrente circulatorio, donde sobreviven por ser resistentes al complemento sérico. Una vez en el torrente sanguíneo, pueden alcanzar e invadir otros órganos dando lugar a la enfermedad sistémica. Finalmente, la multiplicación de la bacteria induce una fuerte inflamación, que es la responsable de las lesiones que se observan en los animales, y en los casos graves de su muerte.

Clásicamente, la clasificación de las cepas de *H. parasuis* se hace por serotipación, pero una gran proporción de cepas no son serotipables. Más recientemente se han desarrollado métodos de genotipado, especialmente un MLST («multilocus sequence typing»), que agrupa las cepas con una cierta relación con su origen clínico. Sin embargo, este método no es práctico para el diagnóstico rutinario. Estudios genómicos permitieron identificar un grupo de genes que están diferencialmente presentes en cepas de distinto origen patológico. Estos genes se denominaron *vtaA* (del inglés «virulence-associated trimeric autotransporters») y codifican proteínas de membrana externa, con un dominio translocador y uno pasajero que contiene dominios de colágenos y otros dominios con posible papel en adhesión. El estudio en mayor profundidad de estos genes permitió el diseño de una PCR capaz de identificar cepas con potencial patógeno y así, diferenciarlas de las cepas puramente colonizadoras del tracto respiratorio superior. En estudios con macrófagos alveolares porcinos nuestro grupo pudo determinar que dos de estos autotransportadores, VtaA8 y 9, provocaban un retraso en la fagocitosis por macrófagos, demostrando su papel en la resistencia a la fagocitosis y apoyando su presencia en cepas virulentas. Además, la presencia de las VtaA en la superficie bacteriana y su expresión diferencial en cepas virulentas, nos llevó a plantearnos su potencial uso en una vacuna dirigida contra las cepas virulentas. De hecho, en experimentos *in vivo* realizados por nuestro grupo vacunando lechones con una mezcla de seis VtaAs se observó una protección parcial frente a una infección letal con una cepa de *H. parasuis*. Actualmente nuestro grupo está realizando estudios de transcriptómica del patógeno durante las fases iniciales de la infección y participa en un proyecto de identificación de la microbiota respiratoria y el papel de *H. parasuis* como componente de la microbiota normal del cerdo.

Nuestros principales colaboradores son el Dr. Marcelo Gottschalk y el Dr. Mario Jacques de la Universidad de Montreal (Canadá), el Dr. Dan Tucker de la Universidad de Cambridge (UK), el Dr. Javier Domínguez del INIA (Madrid) y la Dra. Junkal Garmendia del Instituto de Agrobiotecnología (Pamplona).

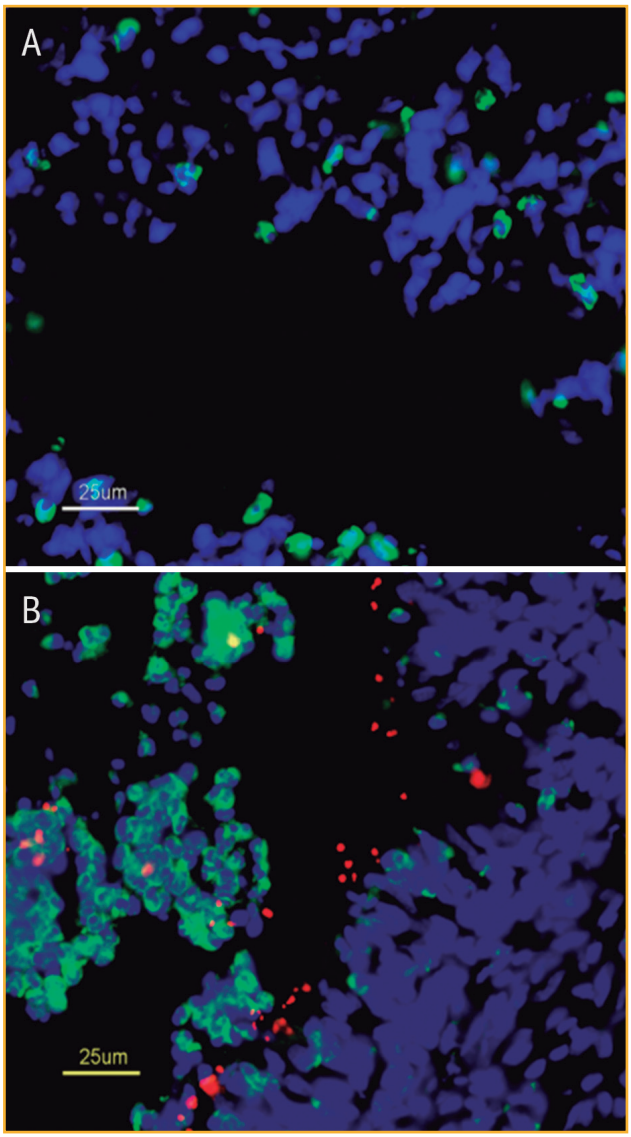

Figura 1. Cortes de pulmones de lechones infectados intranasalmente con la cepa no virulenta SW114 (A) o la cepa virulenta Nagasaki (B), 1 día post-infección. *H. parasuis* se marcó con un suero hiperinmune de conejo (rojo). El anticuerpo monoclonal 6D10, donado por J. Dominguez (INIA), se usó para marcar los neutrófilos (verde). Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (azul).

PUBLICACIONES REPRESENTATIVAS

Aragon V, Cerdà-Cuéllar M, Fraile L, Mombarg M, Nofrarías M, Olvera A, Sibila M, Solanes D, Segalés J. (2010). Correlation between clinico-pathological outcome and typing of *Haemophilus parasuis* field strains. Vet Microbiol 142:387-393.

Bello-Orti B, Costa-Hurtado M, Martinez-Moliner V, Segalés J y Aragon V. (2014). Time course *Haemophilus parasuis* infection reveals pathological differences between virulent and non-virulent strains in the respiratory tract. Vet Microbiol 170:430-437.

Costa-Hurtado M, Ballester M, Galofré-Milà N, Darji A, Aragon V. (2012). VtaA8 and VtaA9 from *Haemophilus parasuis* delay phagocytosis by alveolar macrophages. Vet Res 43:57.

Costa-Hurtado M, Olvera A, Martínez-Moliner V, Galofré-Milà N, Martínez P, Dominguez J y Aragon V. (2013). Changes in macrophage phenotype after infection of pigs with *Haemophilus parasuis* strains of different virulence. Infect Immun 81:2327-2333.

Howell KJ, Weinert LA, Luan SL, Peters SE, Chaudhuri RR, Harris D, Angen O, Aragon V, Parkhill J, Langford PR, Rycroft AN, Wren BW, Tucker AW y Maskell DJ; BRaDP1T Consortium. (2013). Gene Content and Diversity of the Loci Encoding Biosynthesis of Capsular Polysaccharides of the 15 Serovar Reference Strains of *Haemophilus parasuis*. J Bacteriol 195:4264-4273.

Martínez-Moliner V, Soler-Llorens P, Moleres J, Garmendia J, Aragon V. (2012). Distribution of genes involved in sialic acid utilization in strains of *Haemophilus parasuis*. Microbiology 158:2117-2124.

Mullins MA, Register KB, Brunelle BW, Aragon V, Galofré-Mila N, Bayles DO, Jolley KA. (2013). A curated public database for multilocus sequence typing (MLST) and analysis of *Haemophilus parasuis* based on an optimized typing scheme. Vet Microbiol 162:899-906.

Olvera A, Ballester M, Nofrarías M, Sibila M, Aragon V. (2009). Differences in phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains. Vet Res 40:24.

Olvera A, Martínez-Moliner V, Pina-Pedrero S, Pérez-Simó M, Galofré-Milà N, Costa-Hurtado M, Aragon V, Bensaid A. (2013). Serum cross-reaction among virulence-associated trimeric autotransporters (VtaA) of *Haemophilus parasuis*. Vet Microbiol 164:387-391.

Olvera A, Pina S, Macedo N, Oliveira S, Aragon V, Bensaid A. (2012). Identification of potentially virulent strains of *Haemophilus parasuis* using a multiplex PCR for virulence-associated autotransporters (vtaA). Vet J 191:213-218.

Olvera A, Pina S, Pérez-Simó M, Aragón V, Segalés J, Bensaid A. (2011). Immunogenicity and protection against *Haemophilus parasuis* infection after vaccination with recombinant virulence associated trimeric autotransporters (VtaA). Vaccine 29:2797-2802.

Perry MB, MacLean LL, Gottschalk M, Aragon V, Vinogradov E. (2013). Structure of the capsular polysaccharides and lipopolysaccharides from *Haemophilus parasuis* strains ER-6P (serovar 15) and Nagasaki (serovar 5). Carbohydr Res 378:91-97.

Genómica evolutiva de bacterias simbiontes de insectos

Andrés Moya, Amparo Latorre, Francisco J. Silva, Rosario Gil, Juli Peretó, Carlos García Ferris, Purificación Carrasco, Ana Gutiérrez Preciado, Sergio López Madrigal, Alejandro Manzano, Vanesa Martínez, Mariana Reyes y Diego Santos García

Genética evolutiva, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva. Universitat de València

andres.moya@uv.es

Foto de grupo. Miembros del grupo durante la visita del Dr. Matsuura (Octubre 2014). De izquierda a derecha, Yee Ying Chang, Francisco Silva, Carlos Vargas, Mariano Collantes, Mariana Reyes, Miquel Barberá, Ana Gutiérrez, Rosario Gil, Purificación Carrasco, Amparo Latorre, Yu Matsuura, Carlos García y Andrés Moya. Delante, Diego Santos.