



OCCURRENCE OF *EPTESIPOX* VIRUS IN BIG BROWN BATS PRESENTACION DE *EPTESIPOX* VIRUS EN MURCIELAGOS MORENOS



CRAIG TIPTON AND LOREN K AMMERMAN
DEPARTMENT OF BIOLOGY, ANGELO STATE UNIVERSITY, SAN ANGELO, TX

ABSTRACT The recently described pathogen, *Eptesipox virus*, was first reported in 2013 based on 6 Big Brown bats (*Eptesicus fuscus*) taken to a wildlife rehabilitation center in Washington state. These individuals suffered from joint swelling and were euthanized after failed treatments. The novel virus was characterized as a poxvirus by researchers associated with the Centers for Disease Control which led to a real-time PCR protocol being developed for detecting the virus. Although *Eptesipox* is not thought to be pathogenic to humans, it does represent a poorly understood threat to *Eptesicus* populations. The purpose of this study was to gain a better understanding of the occurrence and distribution of this virus, which could encompass the known range of the Big Brown bat. We acquired 36 tissue samples archived in the Angelo State Natural History Collection for testing. We report that the samples are negative for *Eptesipox* based on PCR when run concurrently with a positive control. This work could suggest that these infections are localized to the Northwestern part of the *Eptesicus fuscus* range, but additional sampling is desired to develop a stronger argument.

RESUMEN El primer registro del patógeno, *Eptesipox virus*, apareció en 6 murciélagos morenos (*Eptesicus fuscus*) habitando un centro de rehabilitación de fauna silvestre en el estado de Washington (E.E.U.U.) durante el 2013. Estos individuos padecían de inflamación articular y fueron sacrificados después de tratamientos fallidos. Este nuevo virus fue identificado como poxvirus por investigadores del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, lo que condujo al desarrollo de un protocolo para detectar el virus utilizando la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR). Aunque *Eptesipox* no es considerado patógeno humano, representa una amenaza potencial para poblaciones de *Eptesicus*. El objetivo del presente estudio invoca una inspección de la distribución y prevalencia de este virus en el rango del murciélago moreno. Examinando 36 muestras de tejido proporcionados por la colección del Museo de Historia Natural de Angelo State, reportamos que todos los tejidos resultaron negativos a *Eptesipox* via RT-PCR comparados a el control positivo. Actualmente, nuestros análisis sugieren que el rango geográfico de la infección en *Eptesicus fuscus* está limitada al Noroeste de su distribución pero se requiere muestreos adicionales para desarrollar un argumento más influyente.

INTRODUCTION

- Novel poxvirus characterized from infections in 6 grounded Big Brown bats in Washington, state. (Emerson et al. 2013)
- Nuevo poxvirus caracterizado por infecciones en 6 Murciélagos Morenos en el estado de Washington. (Emerson et al. 2013)
- First reported poxvirus in bats, Order Chiroptera, and the host in concern *Eptesicus fuscus* has a widespread distribution. (Figure 1, Ammerman et al. 2012)
- Primer poxvirus reportado en murciélagos, Orden Chiroptera, y su hospedador, *Eptesicus fuscus*, tiene una distribución extendida. (Figura 1, Ammerman et al. 2012)
- The Texas Department of State Health Services and local Natural History Collections can be invaluable resources in assessing the prevalence of a pathogen. (McLean et al. 2016)
- El Departamento de Servicios de Salud del Estado de Texas y colecciones de historia natural locales han sido recursos invaluable en acceder el predominio del patógeno. (McLean et al. 2016)



Figure 1 Range of the virus host, *Eptesicus fuscus*, with star on approximated area of infection. <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=7928>

RESULTS AND CONCLUSIONS

- So far 36 samples have been extracted and consequently tested negative for poxvirus DNA.
- 36 especímenes han sido extraídos y consecuentemente comprobaron negativamente para ADN de poxvirus.
- Confidence in these results is derived from the successful amplification series reported (Figure 2) below. Approximated amounts of DNA used per reaction as follows in the positive control dilution series: 35ng, 3.5ng, 0.35ng, 0.035ng. CFX manager reported 100% binding efficiency.
- La confiabilidad de estos resultados es derivado de la serie de amplificación exitosa (Figura 2) hacia bajo. Cantidad aproximada de ADN usada por reacción en la serie de dilución de control positivo: 35ng, 3.5ng, 0.35ng, 0.035ng. CFX manager reportó una eficiencia de unión de 100%.
- Preliminary data suggest that the pathogen may be presently restricted to the northwestern extent of the *E. fuscus* range.
- Datos preliminares sugieren que el patógeno sea restringido actualmente al grado noroeste de la distribución de *E. fuscus*.

Table 1 *Eptesicus* used for poxvirus screening, with approximate locality

Tissue #	County or State	Tissue #	County or State
ASK 10883	Hutchinson, TX	ASK 6760	Presidio, TX
ASK 10884	Potter, TX	ASK 6832	New York
ASK 10885	Randall, TX	ASK 6400	New York
ASK 10886	Randall, TX	ASK 6399	New York
ASK 10887	Hutchinson, TX	ASK 7047	Jeff Davis, TX
ASK 10888	Randall, TX	ASK 8095	Mexico (Morelos)
ASK 10889	Randall, TX	ASK 8096	Mexico (Morelos)
ASK 10890	Randall, TX	TK 171163	Hall, TX
ASK 10824	Houston, TX	TK 171120	Randall, TX
ASK 10825	Houston, TX	TK 171122	Randall, TX
ASK 9496	El Paso, TX	TK 171213	Jasper, TX
ASK 10683	El Paso, TX	TK 171119	Randall, TX
ASK 10684	El Paso, TX	TK 171123	Hutchinson, TX
ASK 10685	El Paso, TX	TK 171211	Lynn, TX
ASK 10686	El Paso, TX	TK 171313	Ochiltree, TX
ASK 6498	Oregon	TK 173105	Hutchinson, TX
ASK 6493	Oregon	ASK 10920	Hutchinson, TX
ASK 6478	Oregon	ASK 10921	Arkansas

DNA
Extraction

Amplification by
Real-Time PCR

Data Analysis

METHODS

- Samples obtained through Angelo State Natural History Collection genomic resources.
- Especímenes obtenidos de los recursos genómicos de Angelo State University History Collection
- DNA extracted (QIAGEN, Valencia, CA) with preference for liver tissue and then quantified by Nanodrop Lite (Nanodrop Products, Wilmington, DE).
- ADN extraído (QIAGEN, Valencia, CA) con preferencia de tejido del hígado y cuantificado por Nanodrop Lite (Nanodrop Products, Wilmington, DE).
- A positive control DNA sample was obtained through Emerson et al and a chiropox specific set of primers with fluorescent probe was acquired through the same lab (Li, unpublished data).
- Un espécimen de ADN del control positivo obtenido mediante Emerson et al y una serie específica de cebadores con una sonda fosforescente cual fue adquirida mediante el mismo laboratorio (Li, datos inéditos).
- Real-Time PCR conducted using CFXConnect (Bio-Rad, Hercules, CA), with the iTaq universal probe supermix (Bio-Rad) which contained the enzyme and buffer solution necessary for reactions. Thermal cycles ran one cycle at 95°C for 20 s, then 40 cycles at 95°C for 3 s and 60°C for 30 s.
- PCR llevado a cabo en tiempo real usando CFXConnect (Bio-Rad, Hercules, CA), con la iTaq sonda supermix universal (Bio-Rad) cuya contenía la enzima y solución reguladora necesaria para las reacciones. Ciclos termales implementados; un ciclo a 95° C por 20 s, después 40 ciclos a 95° C por 3 s y 60° C por 30 s.

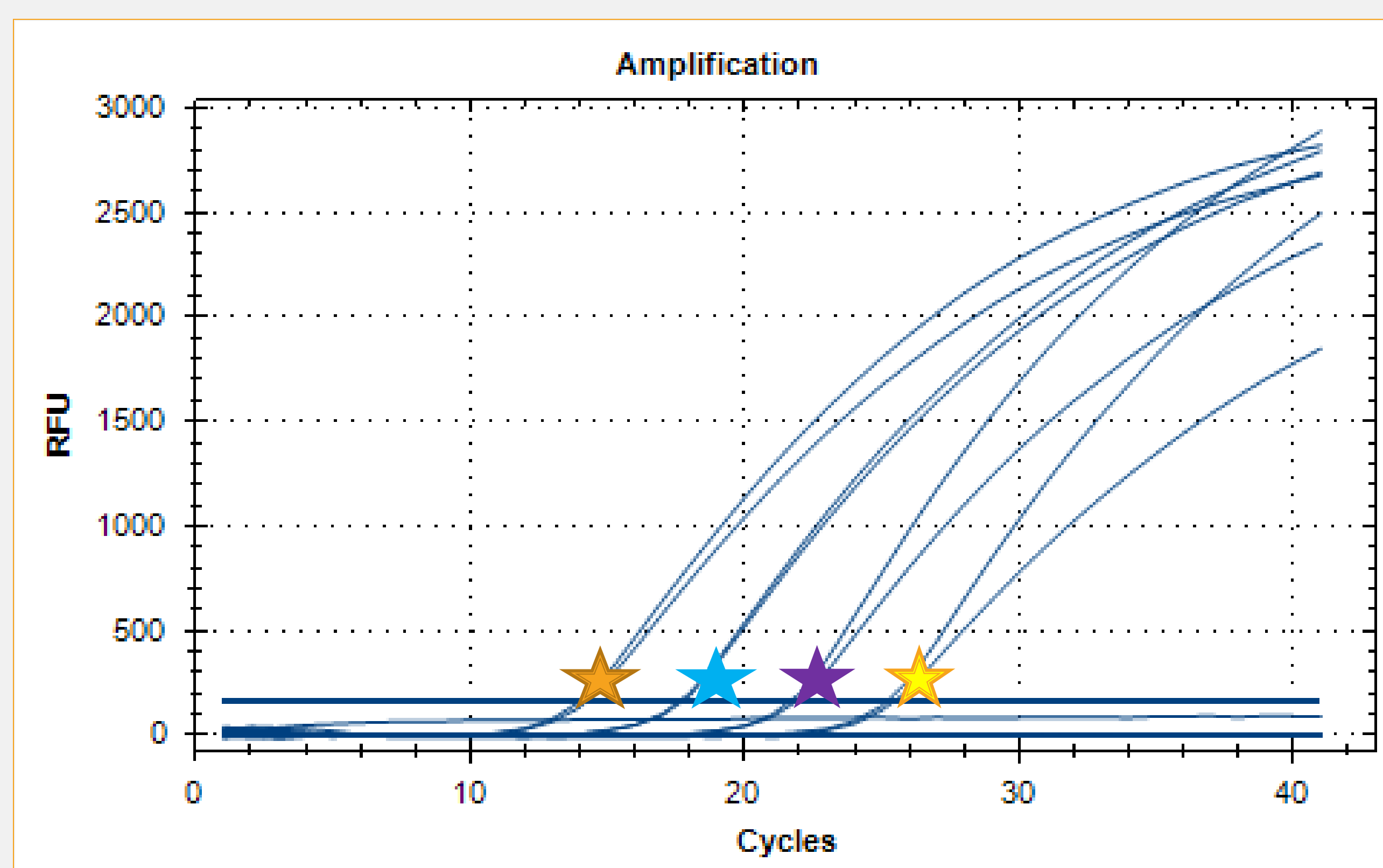


Figure 2 These amplification curves were generated while assessing the sensitivity of *Eptesipox virus* detection in *Eptesicus fuscus*. To do this, two duplicate reactions of four different concentrated positive control were run, along with four negative controls and nine unknown DNA samples. Each star indicates a different duplicate dilution series as follows: Orange, whole DNA; Blue, one-tenth dilution; Violet, one-hundredth dilution; and Yellow, one-thousandth dilution. The characteristic curves shown indicate successful amplification of viral DNA (Efficiency = 100%). The negative controls and unknowns were indistinguishable in this graph as they did not amplify. / Las curvas de amplificación fue generada mientras se asesaba la sensibilidad de detección del *Eptesipox virus* en *Eptesicus fuscus*. Para lograr esto, dos reacciones duplicadas de cuatro controles positivos de concentrado diferentes fueron implementadas, a la vez cuatro controles negativos y nueve especímenes de ADN desconocidos fueron implementados. Cada estrella indica una serie de dilución duplicada diferente de la siguiente manera: Anaranjado, ADN pura; Azul, un décimo de dilución; Violeta, un centésimo de dilución; y Amarillo, un milésimo de dilución. La curva característica presentada indica amplificación de ADN viral exitosa (Eficiencia = 100%). Los controles negativos y desconocidos son indistinguibles en la gráfica por que no se amplificaron.

LITERATURE CITED

- Emerson, G.L., R. Nordhausen, M.M. Garner, J.R. Huckabee, S. Johnson, R.D. Wohrle, W.B. Davidson, K. Wilkins, Y. Li, J.B. Doty, N.F. Gallardo-Romero, M.G. Metcalfe, K.L. Kareem, I.K. Damon, and D.S. Carroll (2013). Novel poxvirus in big brown bats, northwestern United States. *Emerg. Infect. Dis.* 19(6):1002-1004. [DOI:<http://dx.doi.org/10.3201/eid1906.121713>]
- Ammerman, L. K., C. L. Hice, and D. J. Schmidly (2012). Bats of Texas. Texas A&M University Press, College Station, Texas.
- McLean, B.S., K.C. Bell, J.L. Dunnum, B. Abrahamson, J.P. Colella, E.R. Deardoff, J.A. Weber, A.K. Jones, F. Salazar-Mirallas, and J.A. Cook (2016). Natural history collections-based research: progress, promise, and best practices. *J. Mamm.* 97(1):287-297.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Bonny Mayes with the Texas DSHS, the ASU undergraduate research program, the ASU SPURRS program and National Science Foundation grant # DUE-0856657, and Ginny Emerson, Nadia Gallardo-Romero, and Yu Li of the CDC Poxvirus and Rabies Branch all for their support and guidance through this research endeavor.

