Etiología de las diarreas en conejos

Resultados obtenidos a partir de más de 2.600 muestras analizadas

Elena Gracia, Rafael Baselga, Ana Fernández, Iñaki Albizu, Aleida Villa
EXOPOL. Autovacunas y diagnóstico. Pol. Río Gallego, San Mateo, 50840 Zaragoza. Tel 976694525, exopol@exopol.com, www.exopol.com

Introducción y objetivos

Los problemas digestivos en gazapos desde el nacimiento hasta el final de cebo son la principal causa de mortalidad en las explotaciones cunícolas industriales, donde se aceptan tasas de mortalidad del 12 al 20% de los nacidos. Este hecho, unido a la disminución del crecimiento y al empeoramiento del índice de conversión que tienen los animales con gastroenteritis supone una gran pérdida económica para el productor (Rossell, 2000).

Diversos estudios reflejan que en las explotaciones industriales, aparte de agentes altamente patógenos (*Salmonella*, algunos serotipos de Escherichia coli enteropatógenos y algunas especies de *Eimeria*) existen de forma endémica agentes moderadamente patógenos que actúan de forma sinérgica produciendo unas enteritis multifactoriales difíciles de diagnosticar y tratar (Boucher y Nouaille, 2002, Peeters 1984, Rossel 2000).

Además, algunas otras bacterias como *Clostridium, Klebsiella* o *Pseudomonas* y los virus *Rotavirus y Coronavirus* también son importantes patógenos (Boucher y Nouaille, 2002; Rosell, 2000)

El objetivo de este trabajo es estudiar la importancia relativa y la relación entre algunos de los agentes patógenos implicados en procesos entéricos en conejos. Para ello se exponen los datos obtenidos tras el análisis de 2.621 muestras recibidas en 832 casos.

Material y métodos

Muestras

Durante los años 2.000-2.003 se recibieron 2.621 muestras pertenecientes a 832 explotaciones, distribuidas por toda España, que presentaron procesos diarréicos. Las muestras remitidas al laboratorio fueron animales de 373 granjas, paquetes intestinales completos de 143 granjas, e hisopos de 327 granjas, tomados directamente de intestino y enviados con medio de mantenimiento (Amies o Stuart;). En 11 ocasiones se recibieron más de un tipo de muestras de la misma explotación.

Cultivo microbiológico

Los hisopos recibidos, así como hisopos tomados en el laboratorio del ciego de los conejos y paquetes intestinales se sembraron en agar MacConkey (Oxoid PO 5002 A) y agar XLD (Oxoid PO 5057 A) y se incubaron a 37ºC durante 24-48 horas. Las colonias con diferente morfología se subcultivaron y las cepas aisladas se identificaron mediante pruebas bioquímicas convencionales o con el sistema API 20E (Biomerieux).

En 14 granjas con enteritis y abscesos cutáneos en gazapos de menos de 1 semana de vida, las muestras se sembraron también en agar sangre de cordero (Oxoid PB 5039 A) y se incubaron como se indica más arriba.

A todas las cepas identificadas como *E. coli, Klebsiella spp* y *Salmonella* spp se les realizó un antibiograma por difusión en disco en medio sólido, según se describe

en el NCCLS, (National Commitee for Clinical Laboratory Standards, 1991), empleando como base un agar Mueller Hinton de Oxoid (PO 5007 A).

Detección de Clostridium

La presencia de *Clostridium spiroforme* y *Clostridium perfringens* se determinó mediante el examen microscópico de un frotis de la muestra teñido con Gram. Las muestras se leyeron en microscopio de campo claro a 1.000 aumentos con aceite de inmersión.

Detección de coccidios

Con el contenido cecal de animales y órganos se realizó una técnica de flotación en sulfato de Zinc (REF) para la concentración de ooquistes de coccidios. Las muestras se observaron en microscopio de campo claro a 200 aumentos. Esta técnica no se utiliza con los hisopos pues la cantidad de heces es demasiado pequeña y podría dar lugar a falsos positivos.

Al estudiar la presencia de *Coccidios* se anotaba también la presencia de *Saccharomyces gluturatus*, una levadura apatógena pero indicativa de procesos de disbiosis intestinal en gazapos.

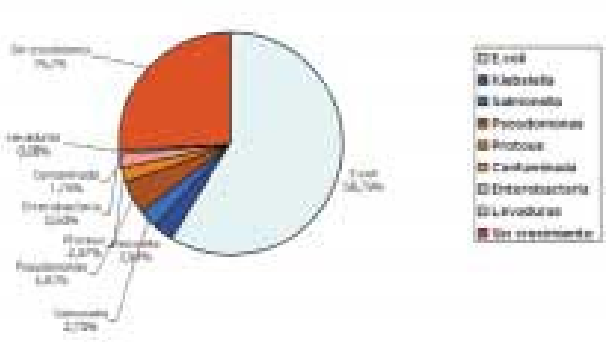
Detección de virus entéricos

Para el detección de *Rotavirus* y *Coronavirus* se realizó una inmunoperoxidasa indirecta (IPX). Se obtuvieron células mediante lavado de los hisopos en PBS-tripsina 0,1% o disgregando fragmentos de intestino delgado con el sistema automatizado Medimachine-Medicon de 50 µm (Becton Dickinson 340588- 340592). Las células lavadas en PBS se fijaron sobre



Foto 1.Ooquistes de coccidios sin esporular, observados en un estudio coprológico a partir de heces de conejos. Se realizó una técnica de flotación con sulfato de Zinc. Observación en microscopía de campo claro x400 en fresco. El coccidio es Eimeria Magna. Obsérvese los hombros en los laterales del opérculo característicos de esta especie. Autor: ®Exopol

Figura 1 Patogenos entéricos aislados de 2621 gazapos



láminas multiesfera, aplicando como anticuerpo primario un monoclonal anti Rotavirus que reconoce una proteína de 41 Kda de la cápside grupo específico (VP6) de Chemicon (MAB851) en dilución 1:100 o un monoclonal anti Coronavirus clon BGN/BIO-104 de Biogenesis (UK) en dilución 1:200. Sobre el primer anticuerpo se aplicó en ambos casos un Anti-Mouse IgG (Fab especific) conjugado con peroxidasa en cabra (Sigma A-2304). La reacción fue revelada con AEC-DMF (Sigma A-6926/D-4254), con contraste de Hematoxilina de Mayer. Las láminas, montadas con GVA (Zymed 00-8000), se estudiaron en microscopía de campo claro a 1.000 aumentos.

Es importante destacar que aunque el cultivo bacteriológico se realizó en todos los casos, la detección de coccidios y *Cl. spiroforme* solo se realizó cuando fue posible en función de la muestra (460 casos en los que se analizaron coccidios y 780 casos en los que se analizaron clostridios). La detección de *Rotavirus, Coronavirus* y *S. aureus* se realizó bajo petición del veterinario encargado de la explotación.

Resultados y discusión

Del cultivo bacteriológico de las 2.621 muestras enviadas, se obtuvo crecimiento de bacterias patógenas primarias en 1.689 muestras (64,4% de las muestras analizadas; 1.540 con E. Coli (58,79%), 77 con Klebsiella spp y 72 con Salmonella spp).

En 134 muestras (5,1%) crecieron bacterias secundarias (13 muestras con diversos tipos de Enterobacter spp y Citrobacter spp y 121 muestras con Pseudomonas spp). En dos muestras se obtuvieron unicamente levaduras, 109 muestras llegaron contaminadas por Proteus spp o por otras bacterias, y en

686 muestras (26,2%) no hubo ningún crecimiento.

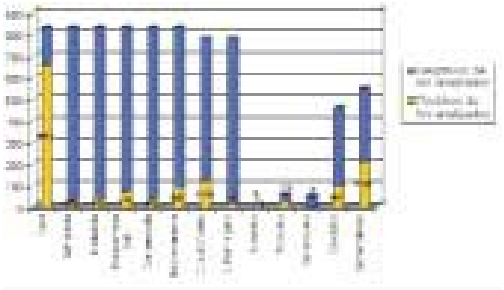
El porcentaje de aislamientos bacteriológicos por muestras se puede observar en la Figura 1, mientras que estudiado por explotaciones lo podemos ver en la Figura 2.

Si comparamos los resultados por muestras y por explotaciones, se observan dos importantes diferencias: E. coli se detectó en casi el 80% de las explotaciones, frente al casi 60% de aislamiento en las muestras analizadas individualmente y en el 12% de las explotaciones no hubo ningún aislamiento bacteriológico, mientras que las muestras sin crecimiento son más del 26%. Esto parece indicar la conveniencia de enviar varias muestras de cada explotación para aumentar las posibilidades de obtener un diagnóstico.

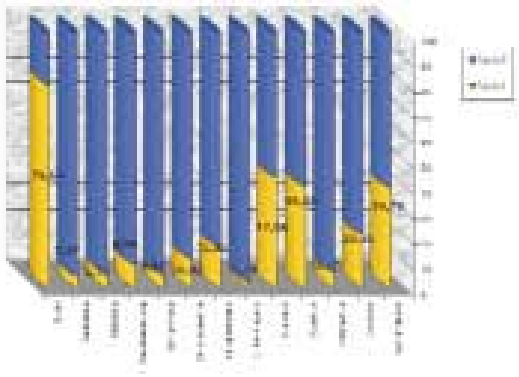
En la tabla 1 se detallan los aislamientos en función del origen de la muestra, animales vivos, paquetes intestinales o hisopos con medio de transporte.

El porcentaje de aislamiento o detección de E. coli, Klebsiella, Pseudomona spp, Cl. spiroformis, Cl. perfringens y Saccharomices glururattus es similar en animales, órganos e hisopos. Lo mismo ocurre con los casos sin crecimiento bacteriano.

Figura 2 Casos positivos sobre total de muestras investigadas



Porcentajes de patógenos aislados sobre muetras



El aislamiento de Salmonella parece que se ve favorecido cuando la muestra enviada son órganos, pero este efecto puede ser debido a que cuando se realiza la necropsia en la granja, si el veterinario ve lesiones sospechosas de Salmonella (focos

Resultados de detección de diferentes patógenos entéricos por explotaciones, en función de la muestra analizada; animales vivos, paquetes intestinales e hisopos cecales o rectales enviados con medio de mantenimiento. En 11 de los casos se recibieron más de un tipo de muestras (animales e hisopos) (Tabla1)

Patógeno	N° Animales positivos % positivos respecto a los analizados	N° Intestinos positivos % positivos respecto a los analizados	N° Hisopos positivos % positivos respecto a los analizados	Casos positivos/ % positivos
E.coli	301 (80,69%)	109 (76,22%)	253 (77,37%)	663 (79,68%)
Salmonada	10 (2,68%)	13 (9,09%)	10 (3,05%)	
Klebsiella spp	13 (3,48%)	9 (6,29%)	21 (6,42%)	33 (3,96%)
Pseudomona spp	31 (8,31%)	12 (8,39%)	31 (9,48%)	43 (5,16%)
S. aureus	6* (42,85%)	0	0	74 (8,89%)
Contaminada	7 (1,87%)	8 (5,59%)	25 (7,64%)	6 (42,85%)
Sin crecimiento	47 (12,60%)	16 (11,18%)	27 (8,25%)	40 (4,80%)
Cl.spiroformis	59 (15,81%)	14 (9,79%)	47 (14,37%)	90 (10,81%)
Cl.perfringens	9 (2,41%)	4 (2,79%)	0	120 (15,34%)
Saccharomices gluturattus	106 (28,41%)	33 (23,07%)	77 (23,54%)	14 (1,79%)
Rotavirus	18** (31,03%)	0	5 (8,62%)	216 (39,20%)
Coronavirus	3* (5,76%)	0	0	23 (39,65%)
Cocidos	82 (21,98%)	13 (9,09%)	0	3 (5,76%)
Total	373	143	327	95 (20,65%)

* Solo se analizaron 14 casos para S. aureus, con un total de 54 gazapos.

** Solo se analizaron 58 casos para Rotavirus y 52 casos para Coronavirus.

necróticos en apéndice cecal Foto 2) envía la muestra al laboratorio. En cuanto al porcentaje de muestras contaminadas, parece que los hisopos son las muestras que más fácilmente se contaminan, y los animales las que menos. Este dato tiene el sesgo de que en laboratorio normalmente no se analizan los animales muertos y autolíticos si hay otras muestras disponibles del mismo caso.

Los patógenos más frecuentemente detectados fueron E. coli en casi el 80% de las granjas seguido de los coccidos en el 20,65% y Cl. spiroforme en el 15,35% de las explotaciones. Salmonella spp, a pesar de la gravedad de los cuadros que ocasiona sólo fue causa del 3,96% de los casos de enteritis. Klebsiella spp se aisló en el 5,16% de las granjas y Pseudomona spp en el 8,89%.

Saccharomices gluturattus estuvo presente de forma masiva en casi el 40% de las muestras, lo que es indicativo de que estas muestras tenían un problema de disbiosis.

Rotavirus y *Coronavirus* son dos patógenos generalmente no investigados en conejos, pero con patogenicidad demostrada (Thouless 1, Xu 2, Descoteaux 3) en gazapos neonatos y de cebo. En nuestros resultados, Rotavirus fue detectado en el 39,65% y Coronavirus en el 5,76% de las granjas en las que fueron analizados. Estos resultados no pueden estimarse ni tan siquiera como una prevalencia aproximada ya que el número de explotaciones en las que se estudió fue muy bajo, sin embargo sí parece importante incluir, al menos la investigación de Rotavirus dentro del esquema general de diagnóstico en procesos entéricos de gazapos. Dada la importancia de estos patógenos en otras especies ganaderas y la facilidad de su control, en nuestra opinión los veterinarios especialistas en conejos y los cunicultores deberían interesarse mucho más en estas patologías.

Especial atención merece el aislamiento de S. aureus, que fue detectado en el 42,85% de las granjas en las que fue analizado. En todos los casos S. aureus fue aislado de gazapos lactantes menores de 1 semana de vida y con dermatitis producida por la misma bacteria (Foto 3). Aunque el número de casos en los que se intentó el aislamiento de S. aureus fue muy escaso, en todas las muestras se hizo una tinción de Gram para observar la flora predominante



Foto 2. Focos necróticos en apéndice cecal de conejo, ocasionados por Salmonella spp



Foto 3. Conejos lactantes con fuerte diarrea liquida de color amarillento. Se aprecia la parte trasera de los animales mojada y sucia. También se aprecia la deshidratación en la piel de los mismos. Se diagnostico colibacilosis al aislarse E. coli masivamente y como único agente a partir del aparato digestivo (intestino delgado y ciego) de todos los animales. Mediante frotis en fresco y tinciones no se observo ni coccidios, ni criptosporidios ni clostridios. Autor: ®Exopol

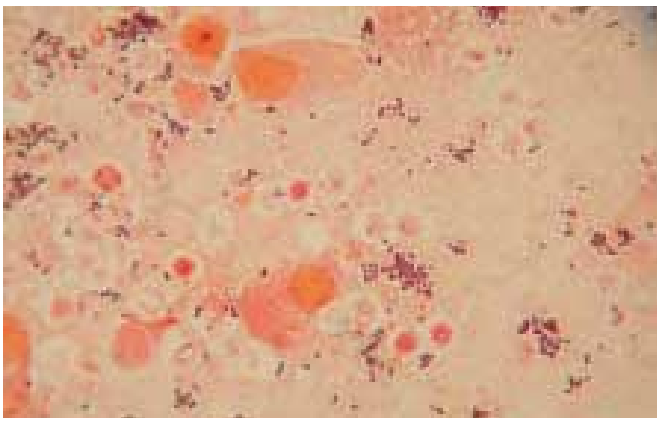


Foto 4. Tinción de Gram (100x) realizada a partir de un frotis de contenido cecal de un conejo lactante. En la imagen se observan multitud de cocos gram positivos. La muestra fue inoculada en agar sangre, agar MacConkey y agar XLD y tras la incubación creció un cultivo puro de Stahpylococcus aureus. Los gazapos tenían abscesos purulentos en abdomen, región perianal y extremidades.

en el intestino delgado y ciego. En los lactantes donde se obtuvo un cultivo puro de S. aureus, la flora predominante eran coco gram positivos como se muestra en la foto 3 (Foto 4). S. aureus ha sido relacionado con abscesos cutáneos e internos, mamitis, metritis y neumonías en conejos jóvenes y adultos. Rosell (Rosell, 2000) describe la presencia de diarrea amarilla en algunos lactantes afectados de estafilococia cutánea, pero no llega a precisar si esta diarrea está producida por S. aureus o por otro proceso intercurrente.

Con este trabajo podemos afirmar que en estos casos S. aureus fue el responsable único de las diarreas en este tipo de gazapos, por lo que debería incluirse la búsqueda de dicho patógeno de forma rutinaria en las enteritis de gazapos lactantes.

En la tabla 2 se detallan las asociaciones encontradas entre diferentes patógenos. E. coli se encontró asociado a otros patógenos en el 35,14% de las ocasiones, preferentemente asociado a *C. spiroformis* y *coccidos*. Este porcentaje puede ser inferior al real, ya que en un gran número de casos, sólo se realizó el aislamiento bacteriológico, bien porque recibimos hisopos (no se puede analizar coccidos) o porque el veterinario lo solicitó así expresamente.

Salmonella spp se encontró asociada a otros patógenos, especialmente a E. coli y

Asociaciones entre patógenos entéricos en conejos. (Tabla2)

Patógeno	Casos positivos	Casos positivos con más de un patógeno	Asociaciones entre patógenos más frecuentes. (Porcentaje respecto al total de muestras positivas del patógeno en primer lugar)*
E.coli	663	233 (35,14%)	E.coli-Salmonella 1,50% E.coli-Klebsiella 3,92% E. coli-Cl. Spiroformis 14,63% E.coli-Rotavirus 2,71% E.coli-Coccidios 12,36 %
Salmonada spp	33	18 (54,54%)	Salmonada –E.coli 30,30% Salmonella-Klebsiella 6,06% Salmonella-Cl. Spiroformis 6,06% Salmonella-Rotavirus 0% Salmonada–Coccidios 12,12%
Klebsiella spp	43	35 (81,39%)	Klebsiella–E.coli 60,46% Klebsiella-Salmonella 4,65% Klebsiella-Cl. Spiroformis 9,30% Klebsiella-Rotavirus 0% Klebsiella–Coccidios 6,97%
Cl.spiroformis	120	117 (97,5%)	Cl. Spiroformis –E.coli 80,83% Cl. Spiroformis-Salmonella 1,66% Cl. Spiroformis-Klebsiella 3,33% Cl. Spiroformis-Rotavirus 3,33% Cl. Spiroformis–Cocidos 11,66%
Rotavirus	23	23 (100%)	Rotavirus –E. Coli 78,26% Rotavirus –Salmonada 0% Rotavirus -Klebsiella 0% Rotavirus- Cl.spiroforme 21,73% Rotavirus-coccidios 8,69%

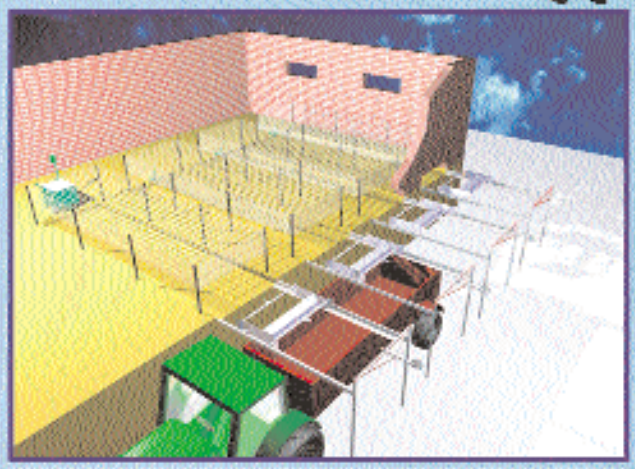
*En la tabla se indica el porcentaje de casos que siendo positivos a un patógeno, resultaron positivos a otro simultáneamente (Ej. *Rotavirus* es positivo en 23 casos, de esos 23 casos, en el 78,26% de los casos (18), se asoció a *E. coli*)



Mecanismos automáticos para la limpieza de granjas

Sistema patentado y homologado CE

cuni equip



NUEVA GENERACIÓN
EN EQUIPOS DE LIMPIEZA



MANDO A DISTANCIA
Programe y ordene maniobras desde cualquier punto



SISTEMA INNOVADOR
Dejando los cables pasados en cada foso.
Usted sólo tendrá que unir los cables a los de la máquina manualmente y sin necesidad de utillaje alguno.

Ello de la forma más fácil, rápida y segura.
La automatización de nuestros equipos junto con la utilización de este sistema INNOVADOR, permite un gran ahorro de tiempo en el trabajo más engorroso de la limpieza de la granja, ello con la mínima inversión que representa el dejar cables pasados en cada foso.

Este sistema, igual que los accesorios que pudieran precisar, están especialmente diseñados y fabricados con piezas de fácil adaptación y transporte, pudiendo efectuar el montaje y puesta en funcionamiento el propio usuario.

Fabricado por Especial Inox, S.L., C/ Reus, 20 Parc d'activitats econòmiques 08500 VIC (Barcelona)
Comercializado en España por Cuniequip, S.L. Tel. 93 846 67 88
Distribución y servicio técnico: tel. 659 78 12 75 - 93 857 04 80

Figura 3.Porcentaje de cepas sensibles "in vitro" a cada uno de los antibióticos utilizados. Las cepas incluidas corresponden a los casos estudiados en nuestro laboratorio (8.800 casos clínicos). Compare las resistencias que aparecen en su explotación con las de otros casos análogos y estudie, en su caso, la posibilidad de utilizar menos antibióticos.

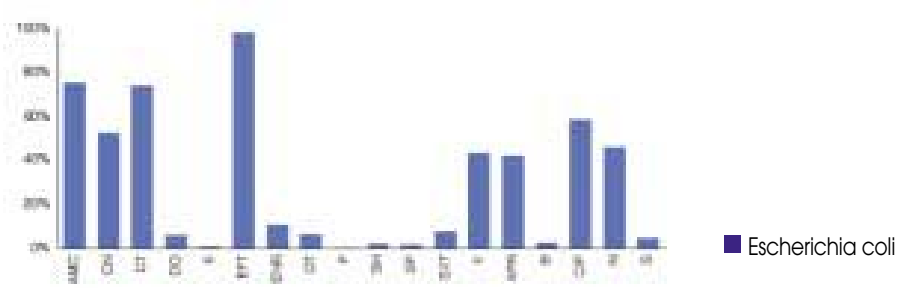
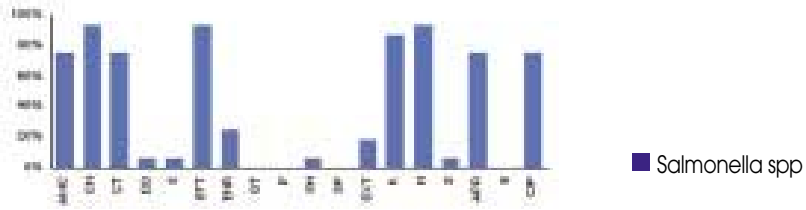


Figura 4. Porcentaje de cepas sensibles "in vitro" a cada uno de los antibióticos utilizados. Las cepas incluidas corresponden a los casos estudiados en nuestro laboratorio durante los últimos doce meses (4.500 casos clínicos). Compare las resistencias que aparecen en su explotación con las de otros casos análogos y estudie, en su caso, la posibilidad de utilizar menos antibióticos.



coccidos en más de la mitad de las explotaciones, mientras que Klebsiella spp se asoció con *E. coli, Cl. spiriformis o coccidos* en más del 80% de los aislamientos.

Hay que destacar que *Cl. spiriformis, coccidos* y *Rotavirus* se encontraron prácticamente siempre asociados entre sí o a E. coli, lo que parece indicar que la presencia de más de uno de estos patógenos provoca una enteritis difícil de solucionar, que requiere un diagnóstico preciso por parte del laboratorio. ■

Referencias bibliográficas

Blanco JE, M Blanco, J Blanco, A Mora, L Balaguer, M Mourino, WH Jansen O serogroups, biotypes, and eae genes in Escherichia coli strains isolated from diarrheic and healthy rabbits Journal of Clinical Microbiology 34: 12 1996 3101-3107.

Boucher S., Nouallille, L. 2002. Maladies des Lapins, France Agricole, 2.

Descoteaux,-JP; Lussier,-G Experimental infection of young rabbits with a rabbit enteric Coronavirus. Canadian-Journal-of-Veterinary-Research. 1990, 54: 4, 473-476.

Peeters,-JE; Pohl,-P; Okerman,-L; Devriese,-LA Pathogenic properties of Escherichia coli strains isolated from diarrheic commercial rabbits. Journal-of-Clinical-Microbiology. 1984, 20: 1, 34-39.

Rosell Pujol, Juan Maria. Enfermedades del conejo. Tomo II. Mundi Prensa, 2000.

Thouless,-ME; DiGiacomo,-RF; Deeb,-BJ; Howard,-H Pathogenicity of Rotavirus in rabbits. Journal-of-Clinical-Microbiology. 1988, 26: 5, 943-947.

Xu-CH; Cui-SL Epidemiological investigation of Rotavirus infection in rabbits. Chinese-Journal-of-Veterinary-Medicine. 1992, 18: 7, 6-8.