

ENTEROPATÍAS ESPONTÁNEAS EN CONEJOS DE CEBO¹

Badagliacca P.², Letizia A.², Candeloro L.², Di Provvido A.², Di Gennaro A.², Scattolini S.², Pompei G.², Pedicone R.², Scacchia M.²

¹Instituto Zooprofilattico Sperimentale Abruzzo e Molise "G. Caporale", Campo Boario, 64100 Teramo, Italia.

Tel. +39 0861 332420. e-mail: p.badagliacca@izs.it

²Avitalia, Unione Nazionale Associazioni di Produttori Avicunicoli, Via Punta di Ferro, 47100 Forlì, Italia



Los problemas digestivos son el principal factor responsable de las pérdidas en la producción de conejos en países europeos (Nouaille, 2006; Rosell, 2006; Grilli *et al.*, 2006). La importancia del problema no ha cambiado respecto al pasado. En los ochenta, Peeters (1987) cuantificó en aproximadamente un 70% las pérdidas a causa de enfermedades digestivas en explotaciones cunícolas belgas. Las enteritis específicas, con lesiones claras de células intestinales, presencia de contenido líquido en intestino y diarrea, pueden estar causadas por agentes infecciosos, tales como *Eimeria* patógena o *E.coli* enteropatogénico (EPEC). El gen *eae*, que codifica la proteína intimina y el gen *afr/2*, que codifica la adhesina de las fimbrias, son los principales marcadores genéticos usados para definir las cepas de EPEC de conejo (Milon *et al.*, 1999). Otra manera de determinar la enteropato-genicidad de *E. coli* es bio-/serotipando, lo que permite establecer una conexión entre el bio-/se-rotipo y las altas mortalidades.

En Italia, la presencia del serotipo O103 junto con el carácter de fermentación ramnosa- negativo fue asociado también con patogenicidad en cepas de *E.coli* de conejos destetados (Agnoletti *et al.*, 2006). Este serotipo está también presente en Francia y España, mientras las serovariedades de *E. coli* O15:H- y O109:K-H2 son prevalentes en conejos destetados y lactantes de Bélgica y Países Bajos, respectivamente, y el tipo O26:H11 ha sido encontrado en conejos destetados en Francia (Milon *et al.*, 1999). En algunos casos, la enfermedad digestiva puede estar ocasionada por errores en la alimentación, estrés medioambiental o social y por uso incorrecto de antimicrobianos, desencadenando una disbiosis intestinal, en la que se desarrolla *E. coli* de baja patogenicidad y/o *Clostridium spiroforme* y otros agentes infecciosos tales como rotavirus, o *Eimeria* sp. de baja patogenicidad. En estos casos, el trastorno digestivo puede ser considerado multifactorial (Peeters, 1987). A finales de



LA ENFERMEDAD DIGESTIVA PUEDE ESTAR OCASIONADA POR ERRORES EN LA ALIMENTACIÓN, ESTRÉS MEDIOAMBIENTAL O SOCIAL Y POR USO INCORRECTO DE ANTIMICROBIANOS.

los noventa comenzó a propagarse en Europa (Licois *et al.*, 2005) un nuevo síndrome denominado ERE, Epizootic Rabbit Enteropathy (Enteropatía Mucoide [Rosell, 2000]; Enteropatía Enzootica [Alberti, 2006]). Bajo condiciones experimentales la enfermedad se caracteriza por los siguientes signos clínicos: borborigmos, distensión de todo el tracto intestinal, incluyendo el estómago, con gases y líquido, a veces asociado con paresia cecal y presencia de moco en el colon (Licois, 2004; Licois *et al.*, 2005). En el campo, la característica más frecuente recogida es la impactación cecal y la presencia de sustancia mucoide en el colon (Rosell, 2000; Gallazzi, 1998). En cualquier caso, se documenta una repentina alta tasa de mortalidad entre las 6 y las 8 semanas de vida de media (de 4 a 14 semanas). La ausencia de inflamación intestinal, especialmente a nivel de ciego, es la principal característica de este síndrome que lo diferencia de la enteritis aguda o enterotiflitis observadas durante colibacilosis, coccidiosis y enterotoxemia producida por la toxina t de *C. spiroforme*. Se ha investigado el papel de *Clostridium perfringens* como agente etiológico de ERE (Marlier *et al.*, 2005), pero has-

¹ Artículo publicado en el World Rabbit Science, volumen 18 (4), la revista oficial de la World Rabbit Science Association (WRSA)

RESUMEN

En una nave de producción de conejos, se realizó una prueba de vigilancia sanitaria de enteropatías en 15 ciclos productivos durante 20 meses. Para cada ciclo, se seleccionaron al azar el mismo día del destete 100 gazapos de 35d de edad. Los animales seleccionados se criaron en la misma nave de cebo, pero de forma separada del lote de origen, y alimentados con el mismo pienso excepto por el suplemento antimicrobiano. Los síntomas clínicos y las lesiones entéricas del grupo seleccionado fueron registradas usando dos listas de respuesta binomial (responder sí/no en una lista con 54 variables clínicas y entéricas). Se recogieron muestras del intestino delgado y del ciego de los animales seleccionados para análisis microbiológico de *C. spiroforme*, ooquistes de *Eimeria* y test de detección de antígenos de rotavirus el día después del destete, una semana más tarde, al inicio de los síntomas entéricos y 4-5 días después del comienzo de los síntomas. Las muestras representativas de aislados de *E. coli* y *C. perfringens* fueron testados por serotipo y biotipo para los genes *eae*, *afr/2* y para los genes de enterotoxinas α , $\beta 1$, $\beta 2$, ϵ , ι , respectivamente. La respuesta a las variables clínico-patológicas fueron sometidas a análisis estadístico a fin de obtener grupos de animales enfermos homogéneos y estadísticamente significativos (que se denominan clusters). A continuación, los clusters se asociaron a los resultados de laboratorio de forma estadística. El cluster que presentaba lesiones de enterotiflitis fue asociado de forma significativa con la detección de *E. coli*, *E. coli* serotipo O103 y *C. spiroforme* (variable "varios elementos"). *C. spiroforme* (variable "escasos elementos") se asoció significativamente con un cluster caracterizado por un perfil patológico consistente en borborrigmos, contenido líquido en estómago y ciego, sin inflamación entérica. *Clostridium perfringens* en cambio se asoció a un cluster caracterizado por un perfil patológico consistente en dilatación del intestino delgado por presencia de líquido, impactación cecal y contenido mucoso en el colon. De las 25 cepas de *C. perfringens* examinadas por los genotipos de sus toxinas, 18 resultaron ser toxina tipo A, mientras que las 7 restantes mostraron la combinación de genes de las toxinas α y $\beta 2$. El antígeno de rotavirus y los ooquistes de *Eimeria* en conejos sanos se detectaron (el día después del destete y una semana más tarde) en un 15% de los animales examinados, en cambio su presencia en animales enfermos no se asoció significativamente a ningún cluster.

Tabla 1: Criterio usado para perfiles clínicos -patológicos

Variable*	Perfil					
	A	B	C	D	E	F
Zona perineal manchada de heces	Si/No	Si/No	Si/No	Si/No	Si/No	Si/No
Borborrigmos	Si	Si/No	Si/No	Si/No	Si/No	Si/No
Estómago, contenido líquido	Si	Si/No	Si/No	Si/No	Si/No	Si/No
Intestino delgado, distensión/cont.líquido	Si/No	Si	Si/No	Si/No	Si/No	Si/No
Intestino delgado, inflamación	No	Si/No	Si	Si/No	Si/No	Si/No
Ciego, contenido líquido	Si/No	Si/No	Si/No	Si	No	Si/No
Impactación cecal parcial/total	Si/No	Si/No	Si/No	No	Si	Si/No
Ciego, inflamación	No	Si/No	Si	Si/No	Si/No	Si/No
Colon, contenido mucoso	Si/No	Si/No	Si/No	Si/No	Si/No	Si

* Las variables que no aparecen en la lista fueron respondidas como Si/No en cada perfil.

ta la fecha no se ha detectado el agente causal que lo produce (Dewrée *et al.*, 2007; Huybens *et al.*, 2009), aunque se ha sugerido como causante un origen bacteriano (bacteria anaerobia, aero-tolerante) o toxina bacteriana (Licois and Marlier, 2008).

Este artículo describe un estudio de observación de enteropatías espontáneas en una nave de producción de conejo, mediante una lista binomial estandarizada de signos clínicos y lesiones digestivas, seguida de procesamiento de datos y análisis

por cluster. El objetivo del análisis por cluster fue identificar grupos homogéneos de animales de acuerdo a sus variables clínicas y patológicas para luego aplicar las técnicas estadísticas comunes de asociación entre grupos de animales (clusters) y los resultados de laboratorio.

ANIMALES Y ALIMENTACIÓN

En una explotación cunícola problemática, localizada en la provincia de Teramo (región de Abruzzi,

Tabla 2: Datos generales del estudio

Ciclo	Lote de origen			Grupo separado			Animales examinados							Síntomas entéricos	
	n	Mortalidad (%)	Datos del ambiente		n	Fidel destete (días)	Enfermos n (%)	n	Tiempo de muestra (n) ¹				Medio de edad (días)		Duración (días)
			Período (mes)	Temperatura media diaria					T0	T1	T2 (k)	T3 (k)	Inicio	Final	
1	2.510	48,0	Feb-Mar	12,4	100	37	69 (69,0)	24	4	4	8 (1)	8 (1)	46	71	25
2	3.532	12,1	Mar-May	19,1	58	34	29 (50,0)	17	4	2	9 (1)	2 (1)	46	66	20
3	2.010	15,8	Abr-Jun	21,6	50	36	12 (24,0)	12	2	1	1	8 (1)	46	50	6
4	3.200	6,4	May-Jun	23,3	50	35	17 (34,0)	16	1	1	4	10 (1)	48	56	13
5	3.660	8,3	Jun-Jul	28,4	27	35	12 (44,4)	13	1	1	6	5 (1)	51	56	14
6	3.255	8,5	Agosto	23,9	32	35	12 (37,5)	10	0	4	1	5 (1)	47	56	16
7	3.060	10,0	Sep-Oct	21,2	100	35	37 (37,0)	20	2	4	8	6 (1)	48	58	16
8	2.280	16,1	Oct-Dic	16,4	100	36	19 (19,0)	23	4	4	9 (1)	6	47	54	13
9	2.080	18,5	Dic-Feb	14,9	100	37	36 (36,0)	30	4	4	8 (1)	14 (1)	58	72	24
10	624	17,0	Ene-Mar	16,1	100	36	3 (3,0)	11	4	4	0	3	54	59	7
11	2.580	20,4	Feb-Abr	18,1	100	36	15 (15,0)	15	4	2	5 (1)	4	46	52	12
12	3.844	14,6	Abr-May	24,2	100	35	12 (12,0)	20	4	4	5	7 (1)	59	63	7
13	1.760	11,8	May-Jul	26,9	100	35	14 (14,0)	19	4	4	5 (1)	6 (1)	50	61	12
14	7.389	4,7	Jul-Sep	30,0	100	36	7 (7,0)	9	4	2	1	2	52	55	7
15	4.046	3,2	Sep-Oct	23,6	100	36	38 (38,0)	24	4	4	8 (1)	8 (1)	51	58	10
Total	46.030				1.217	35,5*	332	263	46	45	78 (7)	94 (11)	49**	58**	13,5*

(k) = número de controles negativos; *Media; ** Mediana

¹ Momento toma de muestras: T0, días después del destete; T1, una semana después del destete; T2, 1-2 días después de los primeros síntomas intestinales; T3, 4-5 días después del inicio de los síntomas intestinales.

Italia Central), en la que se destetan por ciclo de 2000 a 8000 conejos, se llevó a cabo una vigilancia sanitaria con el objetivo de estudiar patologías digestivas durante 15 ciclos de producción de cebo de conejo. El estudio se realizó separando dentro de la nave de cebo, un grupo de gazapos que fueron criados a la misma densidad que el lote de origen y con el mismo tipo de alimentación, excepto por el suplemento antimicrobiano (grupos no medicados). Por ciclo, se destetaban 100 híbridos de cruce comercial Neozelandés x Californiano entre 33 y 37 días de vida, que se disponían en una fila separada de jaulas (ver Tabla 2). Se alojaron de 2 a 3 gazapos por jaula de dimensiones de 30x40 cm. Los animales se alimentaron *ad libitum* con un pienso de 16% de proteína bruta, 4.8% de grasa bruta y 17% de fibra bruta, y únicamente suplementado con Robenidina (66ppm). A partir de los 55-60 días de edad, los animales pasaron a tomar un pienso de 15.8% de proteína bruta, 5.2% de grasa bruta y 16.50% de fibra bruta. En cada lote, y en cada ciclo reproductivo, se recogió la tasa de mortalidad debida a causas digestivas y la temperatura media diaria.

En los grupos no medicados, se registraron datos de la tasa de morbilidad digestiva, el consumo y la frecuencia de dilatación-distensión, borborigmos y diarrea. El día después del destete (tiempo T0) y una semana más tarde (tiempo T1), se seleccionó aleatoriamente de 2 a 4 animales del grupo sepa-

rado, y se sometieron a examen clínico, se sacrificaron y se les realizó un protocolo de necropsia predefinido anteriormente.

Uno o dos días después del primer síntoma entérico (tiempo T2), y 4-5 días después del comienzo de los síntomas digestivos (tiempo T3), se tomaron todos los animales que mostraban síntomas de enfermedad hasta un máximo de 10 para realizarles los protocolos descritos anteriormente.

Además, se cogieron al azar 1 o 2 gazapos sanos a los que también se les realizaron los mismos protocolos, y que sirvieron de control negativo para T2 y T3.

Los protocolos se llevaron a cabo conforme a la Directiva 86/609/EEC para el bienestar de animales utilizados con propósitos experimentales. Los animales no examinados del grupo en prueba se criaron y comercializaron junto con los de su lote de origen.

EXÁMENES CLÍNICOS Y NECROPSIAS

Los animales sujetos a los protocolos clínicos y necropsia se examinaron usando 2 listas de respuesta binomial (responder sí/no a una lista de 54 variables, síntomas o lesiones). La parte clínica consistía en las siguientes secciones (y variables): identificación animal, examen clínico del sistema

Adex-3 Inyectable

Mayor rentabilidad de la fertilidad

Estimulación de la fertilidad
Óptimo desarrollo embrionario

Alta prolificidad

Fácil aplicación
(vía subcutánea 1 ml/coneja)



Especies de destino e indicaciones:

Está indicado en todas las especies en afecciones de esterilidad por avitaminosis A en machos y hembras. Asegura el desarrollo embrionario por la acción de la vitamina A y estimula la fertilidad por la acción de la vitamina E. Disturbios del crecimiento y nerviosos. Coadyuvante al tratamiento de deficiencias minerales (Ca y P). Aumento de resistencia a las infecciones de todo tipo.

Registro nº 8.205

Vía de administración y dosis:

Vía subcutánea a la dosis de:
Menos de 100 k.p.v.: 1 ml/animal y día.
Más de 100 k.p.v.: 2 ml/animal y día.

Tiempo de espera:

No precisa.

Precauciones especiales de conservación:

Conservarse en lugar seco, fresco y al abrigo de la luz.

Mantener fuera del alcance de los niños.

Dispensación: "Con receta veterinaria"

Envase de 250 ml.



s.p. veterinaria, s.a.

Ctra. Reus-Vinyols Km. 4,1 - Ap. Correos 60

Teléfono 977 850 170* - Fax 977 850 405

43330 RIUDOMS (Tarragona)

www.spveterinaria.com

digestivo (diarrea, distensión abdominal, borborismos, paresia cecal, presencia de moco en las heces) y características de la diarrea (acuosa, hemorrágica, mucoide). La necropsia se hizo de partes específicas (y variables) considerando lesiones de estómago, intestino delgado, ciego y colon (distensión, contenido líquido/gas/moco, ausencia de contenido, impactación, inflamación, y necrosis. La presencia de un síntoma o lesión era puntuada como leve, media o severa.

MICROBIOLOGÍA

Examen bacteriológico del contenido intestinal. Se cogió aproximadamente 1 ml de contenido intestinal y otro ml de contenido cecal, se diluía en 2ml de caldo de carne y se sometió a análisis microbiológico en condiciones aerobias y anaerobias².

PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para permitir la identificación de grupos homogéneos, las variables clínicas y patológicas fueron primero reducidas a seis macro variables o perfiles (A-F) ajustando, para cada segmento del sistema digestivo, los determinantes de una condición patológica, de acuerdo a los criterios expuestos en la Tabla 1.

Entonces, para agrupar los animales en clusters homogéneos se aplicó a los seis perfiles un análisis por cluster en dos-pasos (Anderberg, 1973; SPSS, 2006). Se usó la medida de log-verosimilitud para calcular la distancia entre clusters, y el Criterio de Información Akaike (AIC) como criterio de agrupamiento. Con la intención de probar la contribución positiva o negativa de cada perfil a la formación del cluster se aplicó un test chi-cuadrado con la corrección de Bonferroni. Finalmente, para estudiar el efecto de la asociación entre los

cluster y los resultados de laboratorio se utilizó un test chi-cuadrado por independencia. Este test también se utilizó para valorar las asociaciones entre serotipo, biotipo, carácter de la fermentación de la ramnosa y presencia del gen eae en los aislados de E.coli.

RESULTADOS

ANIMALES, LOTES ESTUDIADOS Y EXÁMENES CLÍNICOS

En la Tabla 2 se presentan los datos principales del trabajo: lote de origen, grupo separado, número de animales examinados, temperatura media diaria y edad media al inicio y final de los síntomas digestivos en cada ciclo. Durante los 15 ciclos, 1217 conejos se sometieron a la vigilancia sanitaria y 263 a los protocolos de diagnóstico, 91 de ellos al tiempo T0 y T1 (sin síntomas digestivos), 154 a T2 y T3 (casos tempranos y tardíos de síntomas digestivos) y 18 como control negativo interno de los tiempos T2 y T3.

La mortalidad total de los lotes de origen mostró una tendencia inversa a la temperatura media diaria, mientras que la morbilidad total de los grupos no medicados se comportaba de manera indepen-



LA MORTALIDAD TOTAL DE LOS LOTES MOSTRÓ UNA TENDENCIA INVERSA A LA TEMPERATURA MEDIA DIARIA.



² Nota del editor: la información sobre cómo se realizaron los análisis microbiológicos se puede consultar en el artículo original.

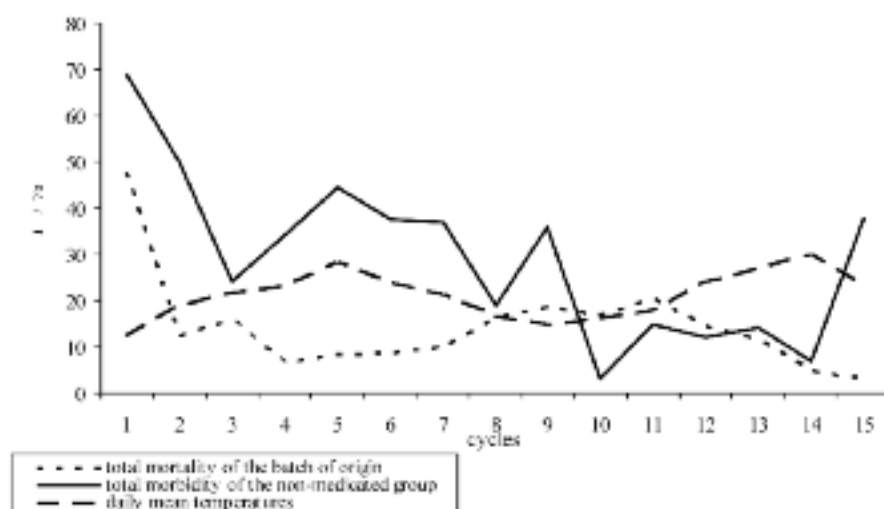


Figura 1: Temperatura media diaria (°C), mortalidad total (%) de lote de origen y morbilidad total (%) de los grupos no medicados durante el periodo de observación.

diente a la temperatura (Figura 1). De media, los animales de los grupos no medicados empezaron a mostrar síntomas digestivos a los 49 d. de edad (de 46 a 59 d.) y los últimos síntomas aparecieron a los 58 d. (de 50 a 72 d.).

Durante 8 ciclos, la duración de la enfermedad digestiva estuvo dentro de la desviación estándar correspondiente a la media general de 13.5 d. En cambio, en los demás ciclos la desviación fue mayor. Al inicio de la enfermedad los signos principales y constantes eran distensión abdominal, borborigmos, pérdida de peso y región perineal manchada de heces.

ANÁLISIS POR CLUSTER DE LOS PERFILES CLÍNICOS Y ENTEROPATOLÓGICOS

En la Tabla 3 se muestra la contribución positiva

(Sí) o negativa (NO) en porcentaje de los perfiles patológicos, y el correspondiente valor de chi-cuadrado, para la construcción de los 4 clusters obtenidos por análisis por cluster. Los perfiles C y D contribuyeron positivamente al Cluster 1 mientras A, B y E lo hicieron de manera negativa.

Los animales enfermos de los grupos del Cluster 1 presentaron de manera significativa inflamación entérica, contenido líquido en el ciego pero sin dilatación, impactación cecal o contenido líquido en el intestino delgado. Los del Cluster 2 presentaban dilatación/contenido líquido en el estómago (perfil A) y líquido en el ciego (perfil D), sin inflamación entérica (perfil C) o impactación cecal (perfil E). Los animales del Cluster 3 contribuyeron negativamente a todos los perfiles. Los del Cluster 4 tenían dilatación/líquido en intestino delgado (perfil B), impactación cecal (perfil E), contenido mucoso en colon (perfil F) y sin líquido en el ciego (perfil D).

Tabla 3: Criterio usado para perfiles clínicos -patológicos

Perfil	Cluster 1 (n=39)		Cluster 2 (n=56)		Cluster 3 (n=29)		Cluster 4 (n=48)	
	Sí/No (%)	p	Sí/No (%)	p	Sí/No (%)	p	Sí/No (%)	p
A. Borborigmos, estómago con contenido líquido, ausencia de inflamación	NO (41,9)	<0.001	Sí (54,8)	<0.001	NO (33,7)	<0.001	Sí (42,9)	0.18, Ns
B. Intestino delgado, distensión/contenido líquido	NO (35,1)	0.002	Sí (43,7)	0.03, Ns	NO (26,8)	0.02	Sí (45,0)	0.006
C. Intestino delgado/ciego, inflamación	Sí (72,0)	<0.001	NO (41,4)	<0.005	NO (22,7)	0.02	Sí (28,0)	0.98, Ns
D. Ciego, contenido líquido	Sí (44,8)	<0.001	Sí (55,2)	<0.001	NO (34,1)	<0.001	NO (56,5)	<0.001
E. Impactación cecal parcial/total	NO (29,7)	0.001	NO (43,2)	<0.001	NO (26,1)	0.001	Sí (70,0)	<0.001
F. Colon, contenido mucoso	NO (26,6)	0.26, Ns	NO (33,6)	0.93, Ns	NO (22,7)	0.02	Sí (58,3)	<0.001

n = número de animales enfermos; p = Valor de significancia de Chi-cuadrado; Ns = No significativo



Pulmotil[®]

TM

**Para la enfermedad
respiratoria
de los conejos...**

**EL ÚNICO
EFICACIA
VALOR**

Elanco

Tabla 4: Distribución de los serotipos y biotipos de *E. coli* en 138 cepas aisladas de animales enfermos.

Serotipo <i>E. coli</i>	Biotipo <i>E. coli</i>															Total
	B4	B10	B12	B14	B17	B18	B19	B20	B21	B22	B25	B27	B28	B29	B30	B31
NT	1	1	2				10	2		1	1	1	5	6	28	9
O103			14	1			1						6			1
O141										2					6	1
O157															1	1
O2					1	1	2		1					1	1	4
O22			1													
O49			1												15	5
O75															1	
O86						1									3	
Total	1	1	18	1	1	2	13	2	1	3	1	1	11	7	35	20

NT – No tipificable

Tabla 5: Presencia de agentes microbiológicos, antígeno de rotavirus y ooquistes de *Eimeria* en el contenido intestinal de animales sanos.

Muestra	n	Acrobios	%	Anaerobios	%	<i>Eimeria</i>	%	Rotavirus*	%
T0 (en la 5ª semana)	46	1	2,2	11	23,9	1	2,2	0	0,0
T1 (en la 6ª semana)	45	3	6,7	5	11,1	13	28,9	4	33,3
Total	91	4	4,4	16	17,6	14	15,4	4	15,4

*El test de antígeno de rotavirus fue llevado a cabo en una muestra de 26 contenidos intestinales (14 en T0, 12 en T1).



EN TODOS LOS CICLOS
APARECIERON *E. COLI* Y/O
CEPAS DEL GÉNERO
CLOSTRIDIUM Y, ADEMÁS
C. PERFRINGENS
Y *E. COLI* ESTUVIERON
PRESENTES EN 13 DE LOS 15
CICLOS.

Detección de ooquistes de *Eimeria*. Los ooquistes de *Eimeria* se detectaron en 90 conejos enfermos (representan el 52.3% del total de muestras de T2 y T3), en 73 de ellos se encontraron “pocos ooquistes”, y en 17 “varios ooquistes”.

Virología. El test de antígeno de rotavirus se llevó a cabo en 134 muestras de contenidos intestinales (50.1% de todos los animales tanto enfermos como sanos), hallándose el virus en 23 muestras (17.2%), y no encontrando diferencias en los resultados positivos entre animales sanos (T0, T1) y enfermos (T2, T3).

Presencia temprana de agentes en los animales examinados. En la Tabla 5 se exponen los datos de la presencia de bacterias aerobias y anaerobias y

ooquistes de *Eimeria* en el contenido de intestino delgado y ciego de todos los animales examinados a tiempo T0 y T1 (ausencia de enfermedad entérica). Esta tabla también muestra los resultados de la presencia del antígeno de rotavirus en 26 de 91 muestras examinadas de contenidos intestinales recogidos en el mismo momento.

Las bacterias aerobias encontradas resultaron pertenecer a los géneros *Klebsiella* (1), *Enterobacter* (1) y *Bacillus* (2), y las bacterias anaerobias al género *Clostridium* (*C. spiroforme*, 1; *C. ramnosum*, 1; *Clostridium bifermentans*, 1; *C. butyricum*, 2; *Clostridium* sp, 11). El antígeno de rotavirus se empezó a detectar a partir del tiempo T1 (4 positivos de 12 animales de 6 semanas de edad).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS DE LABORATORIO.

La tabla 6 muestra las frecuencias observadas de los principales resultados del laboratorio, y su asociación con los clusters de los perfiles patológicos de animales enfermos. Para cada cluster, las frecuencias significativamente más altas o más bajas que las esperadas están indicadas con el correspondiente valor de chi-cuadrado. El cluster 1 (inflamación entérica y contenido líquido en el ciego) se ha asociado significativamente con la presencia de *E. coli*, *E. coli* O103 y “varios” *C. spiroforme*. En cambio la presencia de “escasos” *C. spiroforme* se asoció de forma significativa con el Cluster 2 (distensión/contenido líquido en el estómago y contenido líquido en ciego). La ausencia de *E. coli*,



bacterias anaerobias y *C. spiroforme* se relacionó significativamente con el Cluster 3 (grupo control negativo y animales enfermos con lesiones leves). El Cluster 4 (contenido líquido/dilatación de intestino delgado, impactación de ciego y contenido mucoso en colon) se asocia con el aislamiento de *C. perfringens*.

El valor observado no fue significativo cuando se aplicó el test chi-cuadrado a las frecuencias de los aislados aerobios a parte de *E. coli*, *E. coli* genotipos *eae* y *afr/2*, *Clostridium* sp., *C. perfringens* genotipos *cpa* o *cpa+cpb2*, antígeno de rotavirus y ooquistes de *Eimeria*. También se probó el test chi-cuadrado para establecer si había asociación entre la edad media de inicio de la enfermedad entérica, el tiempo de muestreo (T2, T3) y los clusters, no llegando a ser ninguna significativa.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El modelo experimental usado en este estudio resultó ser adecuado para sus propósitos. La cría separada de un grupo de animales, que estuvieron bajo las mismas condiciones que el grupo de origen, alimentados con el mismo pienso, excepto por la medicación, provocaron la exacerbación espontánea de los desórdenes digestivos. Desde el punto de vista de la representatividad de los resultados obtenidos, cerca del 50% de los animales enfermos fue examinado durante los 20 meses que duró el periodo de observación, el cual incluyó todos los meses del año. Como se muestra en la Figura 1, los valores de mortalidad del lote de origen forman una curva inversa a las temperaturas medias de la nave. La reducción del consumo de

Tabla 6: Frecuencias de los resultados de laboratorio, su distribución dentro de los 4 clusters de animales enfermos y la significancia de la asociación entre el resultado de laboratorio y pertenencia al cluster (valor de P).

Resultados de laboratorio	Cluster				Total	Valor-P
	1	2	3	4		
<i>E. coli</i> positivo	33 ⁽⁺⁾	35	7 ⁽⁺⁾	29	104	<0,001
<i>E. coli</i> negativo	6 ⁽⁻⁾	15	20 ⁽⁺⁾	14	55	<0,001
Otros aislados aerobios	0	6	2	5	13	Ns
<i>E. coli</i> serotipo O103 positivo	10 ⁽⁺⁾	6	2	2	20	0,03
<i>E. coli</i> serotipo O103 negativo	21 ⁽⁺⁾	29	6	28	84	0,03
<i>E. coli</i> genotipo <i>eae+afr/2</i> positivo	9	10	2	7	28	Ns
<i>E. coli</i> genotipo <i>eae+afr/2</i> negativo	13	14	3	11	41	Ns
<i>C. perfringens</i> positivo	7	16	3	20 ⁽⁺⁾	46	0,01
<i>Clostridium</i> spp positivo	12	14	4	11	41	Ns
Negativo para anaerobios	20	26	22 ⁽⁺⁾	17	85	0,01
<i>C. perfringens</i> genotipo <i>cpa</i>	2	7	1	8	18	Ns
<i>C. perfringens</i> genotipo <i>cpa + cpb2</i>	1	3	0	3	7	Ns
Raro <i>C. spiroforme</i>	12	21 ⁽⁺⁾	1 ⁽⁻⁾	12	46	<0,001
Varios <i>C. spiroforme</i>	10 ⁽⁺⁾	7	0 ⁽⁻⁾	8	25	<0,001
<i>C. spiroforme</i> negativo	17 ⁽⁺⁾	28	28 ⁽⁺⁾	28	101	<0,001
Pocos ooquistes de <i>Eimeria</i>	14	30	5 ⁽⁻⁾	24	73	0,05
Varios ooquistes de <i>Eimeria</i>	4	4	5	4	17	Ns
<i>Eimeria</i> ooquistes negativo	21	22	19	20	82	Ns
Rotavirus positivo	7	6	0	6	19	Ns
Rotavirus negativo	17	33	11	28	89	Ns

(+) frecuencia observada por encima de la esperada y umbral $\alpha \leq 0,05$ para la significancia del test chi-cuadrado

(-) frecuencia observada por debajo de la esperada y umbral $\alpha \leq 0,05$ para la significancia del test chi-cuadrado

Ns = No significativo: el valor observado de chi-cuadrado por debajo del v



pienso causado por el incremento de temperatura media probablemente indujo un auto-rationamiento por parte de los conejos. Después del destete, la reducción del consumo fue considerada una herramienta útil para controlar los desórdenes digestivos, especialmente durante la ERE experimental (Boisot *et al.*, 2003). Por el contrario, en los grupos no medicados la curva de morbilidad es independiente de la temperatura, indicando que en esos grupos, en ausencia de una suplementación de antimicrobianos, el incremento de la presión de agentes patógenos es el factor que probablemente más contribuye a la morbilidad y a la propagación de la enfermedad.

De media, los animales empezaron a presentar alteraciones digestivas a las 7 semanas de edad (de 46 a 59d.), siendo esta edad compatible con la Enteropatía Enzoótica del Conejo (Licois *et al.*, 2005). Sin embargo no se asoció de forma significativa con ningún cluster de perfiles clínicos patológicos, indicando ésto que es la edad de mayor susceptibilidad de los conejos a las enteropatías espontá-

neas. La edad media de inicio y la duración de la enteropatía no se relacionan aparentemente con ningún mes en especial del año, tampoco la tasa de morbilidad, lo que indica que la propagación de la enteropatía dentro del grupo no-medicado está aparentemente relacionado a la susceptibilidad del conejo, ya que la madurez inmunológica y el aparato digestivo llegan a ser completamente funcionales alrededor de las 8 semanas de vida (Fortun-Lamonthe and Boullier, 2007). El periodo que transcurre entre el destete a 35d., y el inicio de la enfermedad a 49d., es el tiempo en el que los agentes patógenos, bajo el estrés por el cambio de la dieta, pueden multiplicarse en el intestino. En las muestras de los animales seleccionados a T0 y T1 (de 35 a 42 d.), flora de tipo no coliforme y aerobia ha sido encontrada en un 4.4% mientras que *C. perfringens* y *Eimeria* son encontrados en un 17.6% y 15.4% respectivamente. En este periodo, también se detectaron antígenos de rotavirus en 4 de 26 conejos examinados. Los síntomas tempranos de enteropatía encontrados en los grupos no medicados, a saber borborigmos, región perineal manchada de heces y pérdida de peso, son compatibles con la Enteropatía Enzoótica del Conejo (Licois *et al.*, 2005). El desarrollo espontáneo de desórdenes entéricos condujo a más perfiles definidos de la enfermedad entérica inflamatoria (enterotiflitis), enteropatía no-inflamatoria, impactación cecal y enteropatía mucoide, las cuales han sido a menudo encontradas de forma combinada.

El análisis de los clusters nos permitió agrupar los perfiles clínico-patológicos de los animales que sufrieron el síndrome entérico en tres grupos o clusters, los cuales comprendieron el 83% de los casos (el cluster 3 fue excluido, al afectarle de forma negativa todas las variables patológicas). Ningún cluster prevaleció sobre otro en los ciclos que

“

**EL TEST DE ANTÍGENO DE
ROTAVIRUS SE LLEVÓ
ACABO EN 134 MUESTRAS DE
CONTENIDOS INTESTINALES
(50.1% TANTO ENFERMOS
COMO SANOS),
HALLÁNDOSE EL VIRUS
EN 23 MUESTRAS
(17.2%),**

GAUN

INSTALACIONES Y MATERIALES PARA
CUNICULTURA

Naves Modelo Túnel
Naves Panel Sandwich · Engorde
Polivalentes · Reposición
Accesorios, etc...



MODELO LEYBA



MOD. REPOSICIÓN-GESTACIÓN 48 DPTOS. 2 PISOS



MODELO GÓNDOLA



MODELO MALLORCA

ATENCIÓN AL CLIENTE
968 658 027
www.gaunsa.com

Autovía A-7 · Salida 642 · 30892 · Librilla · Murcia · España
Telf.: 968 658 136 · Fax: 968 658 406 · E-mail: info@gaunsa.com

duró la prueba. Los animales que mostraron inflamación del intestino delgado y el ciego, y presencia de contenido líquido en este último contribuyeron significativamente al primer cluster. Este cluster también se relacionó de manera significativa con la detección positiva de *E. coli*, *E. coli* O103 en los contenidos de ciego y/o el intestino delgado y la presencia de *C. spiroforme* (variable "varios elementos"). El serotipo O103, el cual fue prevalente entre las cepas tipificables, fue significativamente correlacionado con el carácter de fermentación negativa de la ramnosa y la presencia del gen *eae*, además fue confirmado como un indicador de patogenicidad (Agnoletti *et al.*, 2006). En nuestro estudio, el biotipo B12 ramnosa-negativo fue asociado de forma significativa con el serotipo O103 (14 de 23 cepas). En Italia, la cepa de *E. coli* O103-B12 es una de los principales agentes responsables de brotes de colibacilosis (Agnoletti *et al.*, 2004).

La variable "varios elementos" de *C. spiroforme*, también se asoció significativamente con el cluster 1 (10 casos de 39 animales). Aunque se ha considerado responsable de enteritis específicas, en nuestro estudio su detección debe considerarse como un agente secundario en los casos de enterotiflitis, confirmando las observaciones de varios autores (Licois and Marlier, 2006; Agnoletti *et al.*, 2006).

A los otros 2 clusters, denominados 2 y 4, los cuales agrupaban el 60% de los animales enfermos, contribuyeron de manera significativa los siguientes síntomas: Cluster 2, conejos con borborismos/distensión/contenido líquido en el estómago, ausencia de inflamación intestinal y/o contenido líquido en el ciego; Cluster 4, conejos con contenido líquido en el intestino delgado y/o impactación cecal y/o contenido mucoso en el colon. Dichas variables son compatibles con ERE (Licois *et al.*, 2005). Desde un punto de vista del diagnóstico, el cluster 2 está significativamente asociado con la presencia de *C. spiroforme* (variable "escasos elementos"), mientras que el cluster 4 está significativamente asociado con la presencia de *C. perfringens*. Los casos positivos por *C. perfringens* que pertenecen al cluster 2 fueron numéricamente altos, sin llegar a ser significativos.

La toxina tipo sin clasificar que contenía los genes *cpa* y *cpb2* está también considerada por otros autores como asociada con ERE, especialmente con la impactación cecal (Le Normand *et al.*, 2003; Perez de Rozas *et al.*, 2005). En nuestro estudio los datos no mostraron esta asociación.

La hipótesis de *C. perfringens* como agente etiológico de ERE, según el postulado de Koch, podría no ser corroborado por estudios previos (Marlier *et*

al., 2005), aunque fue reconocido que este agente puede jugar un papel importante en las altas mortalidades observadas durante ERE espontáneas (Licois and Marlier, 2008).

Para concluir, el análisis de cluster resultó ser una potente herramienta para el estudio de patologías entéricas del conejo típicamente caracterizadas por síntomas clínicos y lesiones patológicas no específicas para un síndrome en concreto.

Particularmente, el análisis de cluster nos llevó a conseguir un mayor número de variables para un gran número de animales. La aplicación del análisis de cluster en la patología del conejo podría contribuir a identificar factores de riesgo y agentes etiológicos en estudios epidemiológicos llevados a cabo a gran escala.

Agradecimientos: Este estudio fue financiado por Avitalia, Unione Nazionale Associazioni di Produttori Avicunicoli, Forlì, Italia, como parte de un programa titulado "Miglioramento della qualità, della gestione dell'offerta delle produzioni cunicole e di rafforzamento dei rapporti di filiera. Azione 4.3". Nuestro agradecimiento a los criadores Leta Covelli and Dasco srl por proporcionar los conejos, a nuestro colega Romolo Salini y a Fabrizio Agnoletti del Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Veneto, Treviso, Italia.



BIBLIOGRAFÍA

- Alberti S., 2006. L'Enteropatía Enzootica del Coniglio. *Riv. Zoot. Vet.* 34 (1); 5-6.
- Anderberg M.R., 1973. *Cluster analysis for applications*. Academic Press, New York, USA.
- Agnoletti F., Bano L., Cocchi M., Mazzolini E., 2006. Aggiornamenti sulle enteriti batteriche del coniglio. *Riv. Zoot. Vet.* 34 (1); 29-38.
- Agnoletti F., Favretti M., Deotto S., Passera A., Tisato E., Bano L., Mazzolini E., 2004. Report of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from enteric outbreaks in Italian intensive rabbit herds. 8th World Rabbit Congress, 7-10 September, Puebla City, Mexico. 416-421.
- Baums C.G., Scotte U., Amtsberg G., Goethe R., 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet. Microbiol.* 100; 11-16.
- Blanco J.E., Blanco M., Blanco J., Mora A., Balaguer L., Mourino M., Juárez A., Jansen W.H., 1996. O serogroups, biotypes and eae genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *J. Clin. Microbiol.* 34; 3101-3107.
- Boisot P., Licois D. and Gidenne T., 2003. Une restriction alimentaire réduit l'impact sanitaire d'une reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL) chez le lapin en croissance. 10èmes Journées de la Recherche Cunicole. 19-20 November 2003, Paris. 267-270.
- Camguilhem R., Milon A., 1989. Biotypes and O serogroups of *Escherichia coli* involved in intestinal infections of weaned rabbits: clues to diagnosis of pathogenic strains. *J. Clin. Microbiol.* 27 (4); 743-747.
- China B., Pirson V., Mainil J., 1996. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62; 3462-3465.
- Cocchi M., Agnoletti F., Bacchin C., Bano L., Guolo A., Drigo I., 2007. Tossinotipizzazione di *Clostridium perfringens* isolati dal coniglio. Atti delle Giornate ASIC di Coniglicoltura. 26-27 Settembre, Forlì, Italia. Associazione Scientifica Italiana di Coniglicoltura. 2007; 67-69.
- Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *European Official Journal L* 358, 18/12/1986; 1-28.
- Dewrée R., Meulemans L., Lassence C., Desmecht D., Ducatelle R., Mast J., Licois D., Vindevogel H., Marlier D., 2007. Experimentally induced epizootic rabbit enteropathy: clinical, histopathological, ultrastructural, bacteriological and haematological findings. *World Rabbit Sci.* 15; 91-102.
- Fortun-Lemonthe L., Bouillier S., 2007. A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. *Livestock Science*, 107; 1-18.
- Gallazzi D., 1998. Enterocolite, una malattia da conoscere. *Rivista di Coniglicoltura*. 3; 21-23.
- Grilli G., Ferrazzi V., Agnoletti F., Piccirillo A., Pisoni A.M., Gallazzi D., 2006. La patologia enterica nel coniglio da carne allevato in Italia. *Riv. Zoot. Vet.* 34 (1); 51-56.
- Holmes H.T., Sonn R.J., Patton N.M., 1988. Isolation of *Clostridium spiroforme* from rabbits. *Laboratory Animal Science* 38 (2); 167-168.
- Le Normand B., Le Guenec J., Moalic P.Y., 2003. Contribution à l'étude toxinotypique de souches de *Clostridium perfringens* isolées dans l'entéropathie épizootique du lapin (EEL). 10èmes Journées de la Recherche cunicole, 19-20 novembre 2003. Paris.
- Licois D., 2004. Domestic rabbit enteropathies. 8th World Rabbit Congress, 7-10 September, Puebla City, Mexico. 385-403.
- Licois D., Wyers M., Coudert P., 2005. Epizootic rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet. Res.* 36; 601-613.
- Licois D. & Marlier D., 2008. Pathologies infectieuses du lapin en élevage rationnel. *INRA Prod Anim*, 21 (3), 257-268.
- Marlier D., Dewrée R., Lassence C., Licois D., Mainil J., Coudert P., Meulemans L., Ducatelle R., Vindevogel H., 2006. Infectious agents associated with epizootic rabbit enteropathy: isolation and attempts to reproduce the syndrome. *The Veterinary Journal*. 172 (3); 493-500.
- Milon A., Oswald E., De Rycke J., 1999. Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 30; 203-219.
- Nouaille L., 2006. Enterocolite del coniglio in Francia. *Riv. Zoot. Vet.* 34(1); 45-50.
- Penteado A.S., Ugrinovich L.A., Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Andrade J.R.C., Corrêa S.S., Pestana de Castro A.F. (2002). Serobiotypes and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. *Vet. Microbiol.* 89; 41-51.
- Peeters J.E., 1987. Troubles digestifs chez le lapin de chair: causes et prévention. *Revue de l'Agriculture*. 40 (5); 1240-1254.
- Peréz de Rozas A.M., Carabaño R., García J., Rosell J., Díaz J.V., Barbé J., Pascual J.J., Badiola I., 2005. Etiopatogenia de la Enteropatía Epizootica del conejo. In Proc. XXX Symposium de Cunicultura. Valladolid, Spain. 167-174.
- Rosell Pujol J.M., 2000. *Enfermedades del conejo*. Tomo II, *Enfermedades*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España, 2000.
- Rosell Pujol J.M., 2006. Enterocolite del coniglio in Spagna e in Portogallo. *Riv. Zoot. Vet.* 34 (1); 39-44.
- SPSS, 2006. *Statistical Package for Social Science for Windows*, 15.0 version. SPSS Inc., 1989-2006, Chicago, USA.
- Szalo I.M., Lassence C., Licois D., Coudert P., Poulipoulis A., Vindevogel H., Marlier D., 2007. Fractionation of the reference inoculum of epizootic rabbit enteropathy in discontinuous sucrose gradient identifies aetiological agents in high density fractions. *The Veterinary Journal*. 173 (3); 652-657.
- Yoo H. S., Lee S. U., Park K. Y., Park Y. H., 1997. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35 (1); 228-232.

Texto traducido por D.^a María Esteban y D.^a Rosa Rocha, Centro de Investigación de Avicultura y Cunicultura de Nutreco.