

# COMUNICACIONES

# Nuevos aspectos de la patología Respiratoria y Reproductiva en conejos de granja. Inmunocitoquímica.

Dr. Rafael Baselga, Iñaki Albizu Exopol. Pol. Río Gállego, San Mateo de Gállego, 50840 Zaragoza, España. Tel/Fax. 34,976694525. E-mail: exopol@exopol.com. www: exopol.com

## Antecedentes

Frecuentemente en la patología respiratoria y reproductiva del conejo únicamente se ha atendido a las bacterias más prevalentes y sin discusión más importantes como son *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Bordetella bronchiseptica* o *Salmonella spp.*

Sin embargo no se han considerado como causantes habituales de problemas respiratorios o reproductivos a los virus de la mixomatosis (MXV) o de la enfermedad vírica hemorrágica (RHD). Por otro lado, aunque se conoce el papel de *Chlamydia psittaci*, *Toxoplasma gondii*, *Leptospira interrogans* o *Mycoplasma spp* en otras especies, en conejos estos patógenos están muy poco o nada estudiados.

**En todas las especies, incluyendo la humana, los *Mycoplasmas* son importantes en los procesos respiratorios (rumiantes y porcino), e incluso en los reproductivos (rumiantes). Los *Mycoplasmas* también están implicados en problemas de mamitis (rumiantes), articulares (rumiantes y porcino), o conjuntivales (rumiantes). *Mycoplasma pulmonis* es un patógeno muy frecuente e importante en roedores de laboratorio, a cuyo estudio se ha dedicado un gran esfuerzo de investigación y frente al que se están buscando vacunas que utilizan las tecnologías más sofisticadas.**

En el laboratorio de diagnóstico de Exopol y utilizando las mismas técnicas microbiológicas utilizadas con las muestras de otras especies hemos aislado por cultivo *Mycoplasmas* a partir de pulmón de conejos afectados con problemas respiratorios. Probablemente este sea el primer aislamiento (publicado) en conejos de granja y en este momento estamos estudiando si la especie aislada es o no una especie nueva de *Mycoplasmas*.

El fallo cada vez más frecuente de las terapias antibióticas y de algunas de las vacunas comerciales así como los hallazgos de lesiones pulmonares y estructuras microscópicas que no son compatibles con los agentes habitualmente patógenos en el sistema respiratorio, han llevado a diversos autores a la búsqueda de nuevas posibilidades.

## Objetivo del trabajo

En este trabajo queremos estudiar el papel de la Mixomatosis (MXV), Enfermedad hemorrágica (RHD), *Chlamydia psittaci*, *Toxoplasma gondii* y especialmente *Mycoplasma spp* en problemas respiratorios y reproductivos de conejos de granja.

## Animales seleccionados

En problemas respiratorios, este estudio se ha realizado con 84 animales de 45-60 días, de los que 51 presentaban problemas clínicos, mientras que los otros 33 sin problemas clínicos se usaron como controles negativos para establecer una comparación.

En problemas reproductivos se han utilizado 80 hembras que se recibieron en el laboratorio este tipo de afecciones.

## Muestras analizadas

A partir de pequeños fragmentos de tejidos (pulmón y útero) se separaron poblaciones celulares utilizando técnicas de perfusión o enzimáticas.

Sobre estas células individualizadas se aplicó técnicas de inmunocitoquímica, concretamente la inmunoperoxidasa o IPX.

## Inmunoperoxidasas IPX

Una vez que las células individualizadas están fijadas en un porta, se añade a cada pocillo un anticuerpo específico diferente, que sirve para identificar la presencia de cada uno de los patógenos buscados. Este anticuerpo se adhiere a las células del pocillo sólo si éstas, están infectadas con el patógeno que identifica el anticuerpo.

Tras un período de incubación se añade un segundo anticuerpo que se adhiere al primer anticuerpo junto con un sustrato que produce un cambio de color. Sólo si las células de la muestra estaban infectadas, el segundo anticuerpo se podrá unir al primero ya adherido y se producirá el cambio de color.

En el ejemplo mostrado en la charla, se observan células infectadas con el virus de la mixomatosis (citoplasma rojo) y su control negativo (células sin infectar). La visualización de estos resultados se lee en un microscopio por personal muy especializado. La inmunocitoquímica permite no sólo estudiar la forma del patógenos sino también su localización intra o extracelular, el cambio de color que se produce si hay adhesión del anticuerpo específica asegura una óptima fiabilidad de la técnica.

En el caso de la charla, el anticuerpo frente al virus de la mixomatosis, se ha pegado a los virus que se multiplicaban. Al añadir un segundo anticuerpo junto con el sustrato, se produce el cambio de color. En la célula control no hay cambio de color (rojo) porque no hay infección.

Esta misma técnica se emplea con otros *Mycoplasmas*, *Leptospira interrogans* y RHDV. El procedimiento empleado es igual al utilizado con el virus de la mixomatosis.

### Anticuerpos utilizados.

La calidad de los resultados obtenidos en este tipo de estudios depende de los anticuerpos utilizados para identificar la presencia de los patógenos buscados. En este trabajo se han utilizado anticuerpos monoclonales totalmente específicos.

## Resultados

En problemas respiratorios de conejos destaca la mayor frecuencia de MXV, RHD y sobre todo *Mycoplasma* en los pulmones afectados que en los pulmones sin clínica respiratoria. Por el contrario no encontramos diferencias con *Chlamydia*, *Toxoplasma* y *Leptospira* entre pulmones afectados y no afectados.

Los virus MXV y RHD pueden ser virus de campo (infección) o virus vacunales (vacunas vivas). La inmunocitoquímica no nos permite distinguir el virus vacunal del virus campo.

**Tabla 1: Patógenos detectados por IPX en pulmones de conejos con síntomas respiratorios y lesiones anatomopatológicas y en pulmones de animales sin afección respiratoria.**

Antígeno	Enfermos = 51		Sanos = 33	
	Positivos	%	Positivos	%
RHDV	12	23.5 %	1	3.0 %
MXV	15	29.4 %	1	3.0 %
<i>C. psittaci</i>	7	13.7 %	5	15.1 %
<i>T. gondii</i>	4	7.8 %	6	18.1 %
<i>Mycoplasmas spp</i>	22	43.1 %	1	3.0 %
Antígeno no detectado	6	11.7 %	20	60.6 %
Antígeno detectado	45	88.2 %	13	39.3 %

Entre las bacterias *Pasteurella multocida* destaca como patógeno más prevalente. *Staphylococcus aureus* y *Bordetella bronchiseptica* también son muy importantes.

Patógenos detectados por cultivo en pulmones de conejos con afección respiratoria		
Bacteria	Positivo/estudiado	%
P. multocida	129 / 283	45
S. aureus	72 / 283	25
B. bronchiseptica	81 / 283	29

Para el control de estos patógenos se pueden elaborar autovacunas simples o combinadas. En todos los casos recomendamos que en estas autovacunas se incluya a *Mycoplasma* (cuando sea aislado).

Como interpretación a este estudio diremos que, si bien las infecciones bacterianas son, sin duda, las causas primordiales de las afecciones respiratorias en conejos de granja, los mycoplasmas aparecen como agentes muy frecuentes y descritos por 1ª vez en procesos respiratorios

En problemas reproductivos de conejos destaca la elevada frecuencia de MXV y sobre todo de *Chlamydia* y *Mycoplasma* en los úteros. Por el contrario RHD y *Leptospira* no parecen importantes en la clínica reproductiva.

Tabla 2: Patógenos detectados por IPX en úteros e hisopos cervicales (positivos/estudiados).		
Antígeno	Positivo	%
RHDV	1 / 23	4,3 %
MXV	8 / 27	29,6%
<i>C. psittaci</i>	28 / 80	35,0%
<i>T. gondii</i>	11 / 54	20,4%
<i>Mycoplasmas</i>	8 / 27	29,6%
<i>L.interrogans</i>	0 / 33	0,0%

Entre las bacterias aisladas en problemas reproductivos, *Pasteurella multocida* y *Staphylococcus aureus* destacan como patógenos más prevalentes. *Escherichia coli* y *Salmonella spp* tienen un papel menos importante.

Patógenos detectados por cultivo en úteros e hisopos cervicales de conejas (1999-2000)		
Bacteria	Positivo/estudiado	%
P. multocida	129 / 283	45
S. aureus	72 / 283	25
B. bronchiseptica	81 / 283	29

Para el control de estos patógenos se pueden elaborar autovacunas. En todos los casos recomendamos que en estas autovacunas se incluya a *Mycoplasma* (cuando sea aislado).

**Ademas de los procesos bacterianos, MXV y chlamidias aparecen frecuentemente asociados a procesos reproductivos.**

Los mycoplasmas se han encontrado con elevada frecuencia lo que parece indicar su implicación reproductiva.

**Conclusiones**

Existen todavía muchos campos sin explorar en la patología del conejo.

Existen formas subclínicas de Mixomatosis y Vírica Hemorrágica que deben ser tenidas muy en cuenta en la patología respiratoria y reproductiva cunícola.

*Mycoplasma* aparece como un patógeno emergente cada vez mas frecuente en problemas reproductivos y respiratorios del conejo.