
ESTUDIO SOBRE UN NUEVO PROCESO RESPIRATORIO EN CONEJOS

Joan Plana i Duran.- Dtor. General Técnico
Josep Bassols i Mallarach.- D. Relaciones Técnicas
M. Vayreda i Casadevall, T. Pey, M. Bastons, M.A. Ba-
leri.- Dp. de Investigación

LABORATORIOS SOBRINO, S.A. Vall de Bianya (Girona)



I.- SUMARIO

La ponencia que presentamos, es el inicio de una serie de trabajos encaminados a averiguar, cual es el agente causal de este nuevo proceso respiratorio en conejos, el cual tiene a expansionarse cada vez mas en nuestra cunicultura industrial.

Las conclusiones, a las que podemos llegar con esta ponencia no son del todo satisfactorias para nosotros, ya que hubiera sido preciso disponer de más tiempo, para aclarar nuestras confusas ideas. No obstante estamos trabajando en el tema para decantarnos hacia una de las dos preguntas que debemos formularnos.

¿Se trata de una mutación del virus de Mixomatosis, con un tropismo respiratorio? o bien ¿Es en realidad un nuevo virus el que afecta a nuestra cunicultura?.

II.- INTRODUCCION

Desde el año 1979 hemos tenido ocasión de intervenir en algunas explotaciones cunícolas cuyos animales estaban afectados de un fuerte coriza contagioso, con lesiones en ojos, nariz, cara, orejas y genitales, siendo interpretados estos síntomas como propios de una Mixomatosis, tanto por los propios cunicultores como por los especialistas que habían visto los animales afectados.

Al no presentar claramente los nódulos típicos de la Mixomatosis, y al fracasar la vacunación frente a esta enfermedad, empezamos a investigar otras posibles causas de la misma.

Sobre un total de 20 explotaciones (Cataluña, Aragón y Valencia) con síntomas de éste proceso respiratorio, nosotros en un 90% de los casos hemos aislado virus a partir de macerados de pulmones y nódulos subcutáneos, así como identificado diferentes gérmenes, siendo los más importantes las Pasteurellas y Bordetellas; y apareciendo en menor proporción, Staphilococos, Streptococos, Pseudomonas, así como Proteus

y gérmenes del tipo Coli.

De estas granjas, 4 (el 20%) habían sido vacunadas de Mixomatosis con vacuna homóloga; 6 (el 30%) con vacuna heteróloga, y las 10 restantes (el 50%) no estaban vacunadas de Mixomatosis.

III.- MATERIAL Y METODOS

Experimento nº1: Observación clínica - exámen macroscópico de los animales procedentes de diferentes granjas con dicho proceso respiratorio.

Experimento nº2: Aislamiento de los virus.- Los aislamientos de los virus en cuestión se realizó a partir de un macerado del tejido pulmonar afectado, y de los nódulos subcutáneos de la cara, orejas, etc., al cual se le añadió una asociación de antibióticos a base de Penicilina, Kanamicina y Estreptomina, filtrándose con filtros adecuados. Comprobada su esterilidad, se realizó la infección sobre las líneas celulares: SIRC (córnea del conejo) y RK13 (riñón de conejo), así como infecciones experimentales en conejos.

Experimento nº3: A partir de los virus aislados, así como con el virus de Sanarelli campo, con cepa homóloga vacunal y con virus fibroma de Shope, obtuvimos un stock de los mencionados virus sobre la línea celular RK13 para disponer de material antigénico adecuado. Las titulaciones se realizaron en placas de Microtiter con las técnicas clásicas empleadas en virología.

Experimento nº4: Al presentar el proceso a estudiar, una sintomatología parecida a la Mixomatosis y al complejo respiratorio, realizamos una serie de experimentos en conejos de raza Neozelandesa, y edad aproximada 2 meses, los cuales eran sensibles a infección experimental con el virus Sanarelli, Pasteurella multocida y Bordetella bronchiseptica.

LOTE A: 10 conejos, que nos sirven como testigos de infección de los virus problema. Vía de infección: Intraparpebral

LOTE B: 10 conejos vacunados de Mixomatosis con vacuna heteróloga (Fibroma de Shope) por vía subcutánea. La infección por vía intraparpebral con el virus problema se realizó a los 15 días post-vacunación.

LOTE C: 10 conejos vacunados frente al complejo respiratorio (Vacuna inactivada, con excipiente oleoso, a base de Pasteurella multocida y Bordetella bronchiseptica). La infección con el virus problema, se realizó a los 15 días post vacunación por vía intraparpebral.

Experimento nº5: Sobre los diferentes virus aislados de este proceso respiratorio, trabajamos con tres de ellos cuyas referencias son: G, C y D, comprobándolos con una cepa de campo del virus Sanarelli; con la cepa Fibroma de Shope; y con cepa homóloga vacunal de Mixomatosis.

Los parametros estudiados fueron los siguientes:

- a) Propagación del virus sobre cultivos celulares.
- b) Tinciones realizados sobre cultivos celulares.
- c) Determinación del tamaño.
- d) Efecto del calor.
- e) Test de sensibilidad a solventes orgánicos.
- f) Reacciones de seroneutralización.
- g) Capacidad hemoaglutinante del virus.

IV.- RESULTADOS

Resultados experimento nº1: Los reproductores afectados presentan un fuerte coriza contagioso, con exudación purulenta en fosas nasales y conjuntiva ocular, así como nódulos más o menos edematosos en la cara, orejas y genitales. Todo ello acompañado de una insuficiencia respiratoria.

En los animales de engorde que padecen éste proceso predominan las conjuntivitis purulentas sobre las lesiones propiamente respiratorias.

En la necropsia observamos una fuerte congestión de

las vías respiratorias altas y un proceso neumónico más o menos grave según los casos, (tanto en reproductores como animales de engorde).

En un porcentaje muy elevado de pulmones examinados observamos hemorragias puntiformes, mientras que en otros hay intensas zonas hemorrágicas.

En los demás órganos del animal, no hay lesiones macroscópicas evidentes (fotografía nº1 y 2).

Resultados experimento nº2: El primer virus aislado por nosotros, fue el que denominamos como referencia G, cuyo comportamiento sobre cultivos celulares y animales de experimentación fue el siguiente:

A los 6 días post-infección de la línea celular SIRC, observamos la formación de placas visibles macroscópicamente, las cuales aumentaron en número por un factor de multiplicación 10, a los 9 días post-infección de los tapices celulares. No se observó en los días siguientes un incremento del número de placas, ni del efecto citopático en cultivo celular.

Con el sobrenadante de cultivos infectados (9 días post-infección), se inoculan conejos por vía intranasal, intraparpebral e intradérmica (espalda). A los 7 días post-infección, los animales (10 por cada vía) muestran una inapetencia muy marcada, presentan indistintamente conjuntivitis, nariz con mucosidades, insuficiencia respiratoria y temperatura que van de 40°C a 42°C. En algunos conejos no observamos mucosidades en la nariz.

Todos los animales inoculados experimentalmente mueren entre 9 y 12 días post-infección.

En las necropsias, observamos macroscópicamente hemorragias puntiformes en pulmón, en mayor o menor intensidad, independiente de la vía de infección. En alguno de estos animales aparecen hemorragias en traquea y pericardio (Diapositivas de animales infectados experimentalmente, así como de las necropsias realizadas).

Resultados experimento nº3: Los títulos sobre cultivos de tejidos de los diferentes virus fueron los siguientes:

- a) Virus Sanarelli campo $10^{5.8}$ DICT₅₀/ml.
- b) Virus homólogo cepa vacunal $10^{6.6}$ DICT₅₀/ml.
- c) Virus Shope $10^{4.8}$ DICT₅₀/ml.
- d) Virus G $10^{6.1}$ DICT₅₀/ml.
- e) Virus C $10^{5.05}$ DICT₅₀/ml.
- f) Virus D $10^{5.7}$ DICT₅₀/ml.

Resultados experimento nº4:

LOTE A: A los 6 días post-infección con los virus problema los animales presentaban una fuerte generalización del proceso respiratorio con la sintomatología ya descrita anteriormente.

En el exámen macroscópico del pulmón, se observaron unas hemorragias puntiformes y circulares descritas anteriormente (Fotografía nº3)

LOTE B: A los 6 días post-infección, empieza a manifestarse la sintomatología clínica típica, con lesiones hemorrágicas en pulmón.

LOTE C: A los 9 días post-infección los 10 conejos no presentan síntoma alguno, desencadenándose el proceso a partir de los 13 a 16 días post-infección, con la sintomatología típica de los casos anteriores.

En los animales vacunados de Mixomatosis (lote B) y los vacunados con complejo respiratorio (lote C) pero no infectados, no se observan lesiones macroscópicas a nivel de pulmón.

Resultados experimento nº5: a) Propagación del virus sobre cultivos celulares.- A partir del primer pase del virus G, sobre la línea celular SIRC, realizamos un segundo pase, sobre la misma, y un primer pase so-

bre la línea RK13, a los 6 días post-infección empezamos a observar placas siendo el número de ellas mayor sobre la línea celular RK13 que sobre la línea celular SIRC. En los pases sucesivos la capacidad de formación de placas desapareció espontáneamente, observando un característico efecto citopático idéntico a los demás virus aislados, así como con el virus Mixomatosis campo y cepa homóloga vacunal (Fotografía nº4) (Diapositivas de placas en cultivo de tejidos).

b) En los exámenes de las diferentes preparaciones infectadas (ref. G, C, D) comparándolas con la cepa Sanarelli y la cepa homóloga vacunal, observamos una completa identidad (Mixomatosis por L. Joubert), respecto al tipo de alteraciones producidas en las células (efecto citopático) así como las inclusiones típicas en el citoplasma.

c) Determinación del tamaño de virus.- En las pruebas realizadas, vemos que todos los virus ensayados pasan a través de los filtros de 0,45 micras de tamaño de poro, mientras que por el tamaño de poro de 0,22 micras quedan retenidos los virus Sanarelli campo y cepa vacunal homóloga de Mixomatosis, pasando los virus problema. Estos últimos quedan retenidos en filtros de tamaño de poro 0,15 micras.

d) Efecto del calor.- El calentamiento del virus en baño maría a temperatura de 56°C, durante un período de 1 hora lo inactiva completamente.

e) Test de sensibilidad a los solventes orgánicos (éter y cloroformo).- Sensible al éter e inactivación total por el cloroformo.

f) Reacciones de seroneutralización.- Se han realizado pruebas de seroneutralización cruzada no pudiéndose llegar a ninguna conclusión debido a la falta de uniformidad en la obtención de sueros.

g) Capacidad hemoaglutinante del virus.- Se comprobaron los virus ref.: G, D, C Sanarelli campo, cepa homóloga vacunal de Mixomatosis y virus Fibroma de Shope, no observándose hemoaglutinación positiva frente

a glóbulos rojos de pollitos de 3 semanas. Las técnicas de hemoaglutinación fueron las clásicas de hemoaglutinación rápida en placa y hemoaglutinación lenta en microplacas, a diferentes temperaturas de incubación (40°C 16H, 22°C 2H y 37°C 2H).

DISCUSION

1.- Después de todos los exámenes clínicos a nivel de campo, así como las infecciones experimentales realizadas en el laboratorio con las diferentes virus aislados, creemos que estamos ante un nuevo proceso respiratorio en conejos de etiología vírica, con complicaciones de agentes secundarios (Bordetella, Pasteurella, Estafilococos, etc).

2.- En todos los casos el aislamiento del agente etiológico sobre la línea celular RK13, así como la infección experimental en conejos ha sido satisfactoria. El reaislamiento de virus en animales infectados experimentalmente ha resultado ser favorable.

3.- En las infecciones experimentales por diferentes vías de inoculación (Intraparpebral-Intranasal e Intradérmica) se ha conseguido reproducir la enfermedad. Y en la necropsia hemos observado la aparición de hemorragias puntiformes y circulares en pulmón.

4.- Tanto los animales no vacunados, como los vacunados de Mixomatosis con vacuna heteróloga (Fibroma de Shope), son sensibles a la infección experimental con los virus problema.

En animales vacunados frente al complejo respiratorio (vacuna Bordetella-Pasteurella inactivada con adyuvante oleoso) parecenser más resistente a la infección esperimental, lo que se confirma en las pruebas de campo ante una infección natural.

5.- El efecto citopático de los virus problema sobre la línea celular RK13, ha sido idéntico al observado con el virus Sanarelli campo y la cepa homóloga de Mixomatosis.

6.- En cuanto al tamaño del virus, según las pruebas

realizadas en el laboratorio es inferior al virus Sanarelli campo y a la cepa homóloga vacunal de Mixomatosis.

Esto parece confirmarse por estudios realizados en microscopia electrónica.

7.- Todos los virus se inactivan a 56°C durante 1H.

8.- Con las pruebas realizadas con solvente orgánicos, se demuestra que es un virus con envuelta lipídica.

9.- Virus no hemoaglutinante frente a glóbulos rojos de pollo.

10.- Diagnóstico clínico diferencial: Este proceso lo debemos distinguir de las siguientes enfermedades.

Mixomatosis: Los síntomas son parecidos, no obstante podemos diferenciarlo, o bien sospechar de uno u otro proceso, al palpar los nódulos de las orejas, que en el caso de la Mixomatosis son esféricos y bien delimitados y en este otro proceso son como intensas zonas edematosas.

Complejo respiratorio: En las afecciones respiratorias no se observan nódulos en orejas, sólo exudaciones muco-purulentas en ojos y fosas nasales, y en caso de presentarse algún absceso, al presionar saldrá pus.

Estreptococias-Estafilococias: Procesos infecciosos bacterianos producidos por Estreptococos o Estafilococos. Suelen producir abscesos purulentos en el ojo, en gazapos incluso antes del destete; o bien abscesos en diferentes partes del organismo.

No obstante, aunque éstos síntomas nos puedan servir de orientación, hará falta un diagnóstico de Laboratorio para precisar el agente causal.

11.- Tratamiento y Profilaxis: Si bien no podemos hablar todavía de un tratamiento o de una Profilaxis concreta, si que podemos, basados en la experiencia de los casos en los cuales hemos intervenido, dictar unas normas generales de actuación al presentarse

este proceso.

Aparte de realizar un correcto diagnóstico, debemos inclinar nuestra atención en los siguientes puntos:

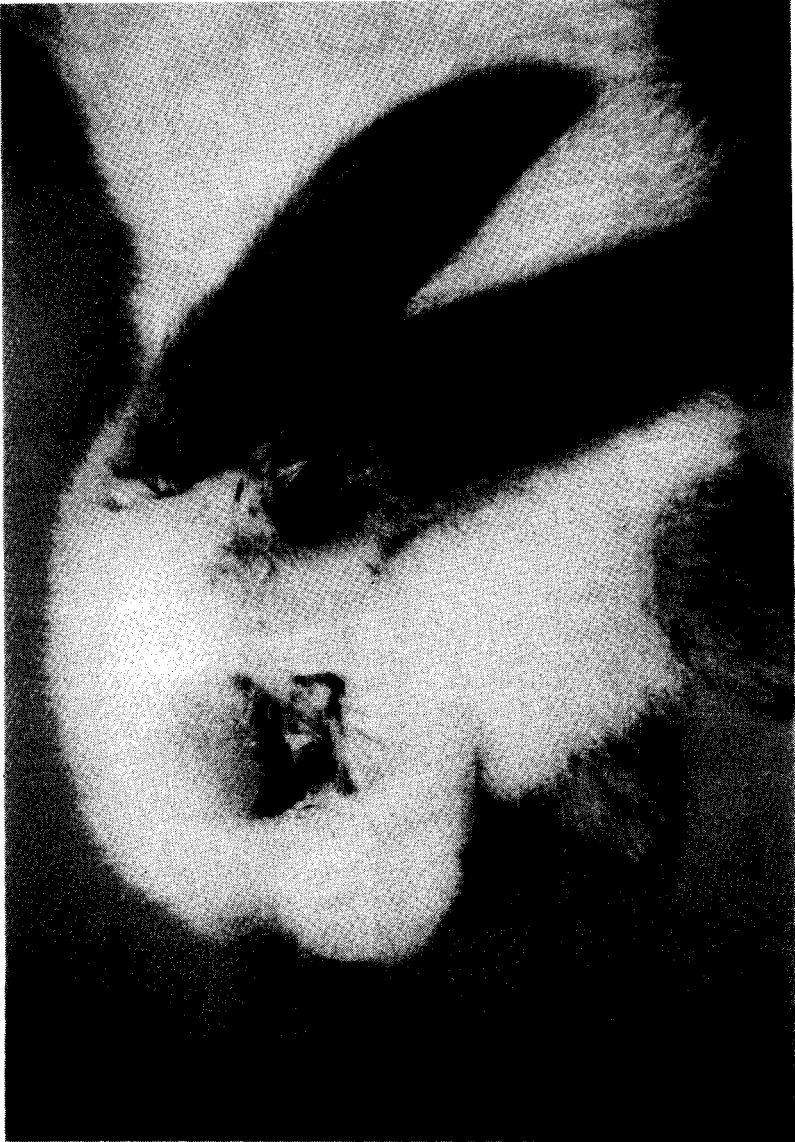
- Eliminación de los animales afectados: Dada la contagiosidad del agente en cuestión que, según parece, se transmite por contacto de animal enfermo a animal sano, deberemos ejercer una fuerte vigilancia de todo el efectivo a fin de poder eliminar todos los animales que aparezcan con síntomas.

- Desinfecciones: Una vez eliminados los animales enfermos debemos limpiar y desinfectar convenientemente las jaulas y demás utensilios que hayan estado en contacto con ellos. A su vez, procuraremos limpiar y desinfectar bien nuestras manos para que no sean vehículo de infección para los conejos sanos.

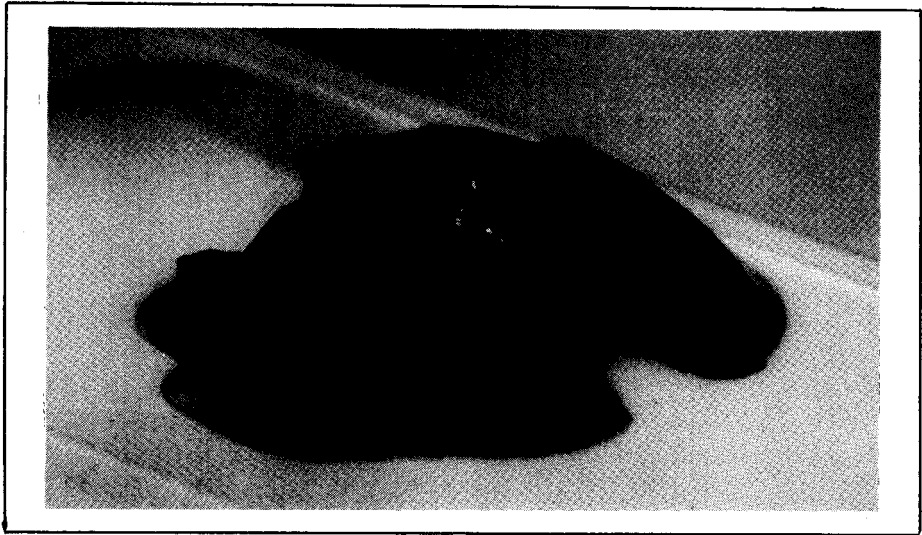
- Vacunación: Dada la mayor resistencia a la enfermedad, demostrada en el Laboratorio y en el campo, de los animales vacunados a base de Pasteurella multocida y Bordetella brochiseptica, con excipiente oleoso, se procederá a vacunar todo el efectivo, tanto reproductores como gazapos de engorde, y los que se vayan destetando se vacunarán en el mismo momento del destete.

Para evitar el posible peligro de contagio por la aguja de inoculación, y en granjas afectadas será recomendable utilizar una aguja diferente para cada animal y, a lo sumo, en el engorde, una para cada jaula, camada o grupo poco numeroso.

- Otros tratamientos: Con el fin de coadyuvar en la lucha contra los agentes bacterianos secundarios pueden administrarse antibióticos como la Eritromicina, Kitasamicina, Tetraciclina, etc., así como choques vitamínicos. Al seguir con rigor estas pautas generales de actuación, hemos conseguido buenos resultados en lo referente a la erradicación de éste proceso vírico en las explotaciones afectadas.



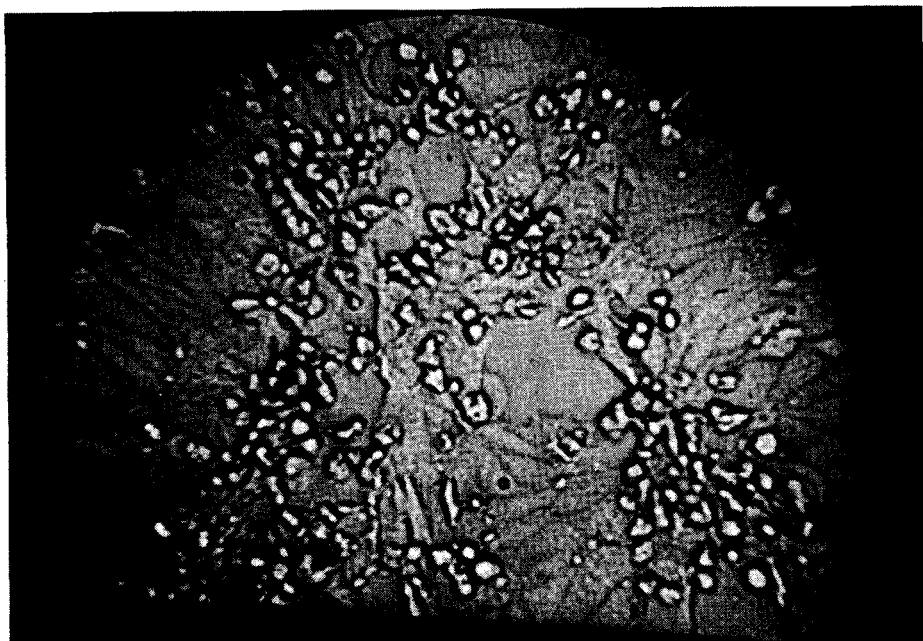
Fot. n.º 1.- Predominio, en animales de cebo, de conjuntivitis purulenta.



Fot. nº2.- Lesiones macroscópicas observadas en pulmones procedentes de animales reproductores con sintomatología respiratoria



Fot. nº3.- Hemorragias puntiformes y circulares típicas, en pulmón.



Fot. nº4.- Efecto citopático que producen los virus aislados sobre la línea celular RK13

