

COMPLEJO ENTERITIS MUCOIDE DEL CONEJO. II INTERRELACION CAUSAL DE LAS AFLATOXINAS Y EL *C. perfringens**

José Darío Mogollón G.**
Néstor E. Peña B.
Martha C. de Jimeno
Germán Rodríguez M.

1. INTRODUCCION

La industria cunícola nacional ha alcanzado un notable desarrollo, llegando a ocupar un lugar destacado dentro de la explotación de las especies menores. Sin embargo, algunos problemas patológicos y otros factores como la falta de crédito y de asistencia técnica han limitado su fortalecimiento.

Dentro de los problemas patológicos, la Enteritis Mucoide se ha constituido en una de las limitantes más serias, determinando como en el caso del período 1975-1976 grandes pérdidas económicas a esta industria, representadas por una elevada morbilidad y mortalidad y por el fracaso de varios planteles comerciales.

Con base en estas consideraciones y por los hallazgos de laboratorio obtenidos a partir de los casos de ocurrencia natural de la enfermedad, se decidió realizar el presente trabajo que tuvo como objetivos cuantificar el *Clostridium perfringens* en el contenido gastrointestinal de conejos desde el nacimiento hasta el destete y esclarecer el papel de este microorganismo y de las aflatoxinas en la patogénesis de la entidad, con el fin de incrementar los conocimientos sobre su etiología y características de presentación, condiciones necesarias para establecer las medidas adecuadas de prevención y control.

2. REVISION DE LITERATURA

La Enteritis Mucoide (E.M.) es una enfermedad subaguda, fatal, que afecta en especial a los conejos de 6 a 10 semanas de edad, aunque también puede afectar a animales de mayor edad y la cual se conoce también con los nombres de Enteritis, Complejo Enteritis del Conejo e Hipoamilasemia Neonatal de los Conejos (7, 13, 16, 17, 22, 24, 35, 36).

La etiología aún no está definida, Whitney (35, 36), considera que esta condición junto a la tiflitis, la tiflitis-diarrea y la enteritis hemorrágica, tienen un origen multifactorial, representado por: cambios en el manejo, cambios en la dieta, bacterias como *E. coli* y *C. perfringens*, hongos como *Saccharomyces guttulatus* y protozoarios como coccidias. McCuiston (17), sugirió que era ocasionada por una hipoamilasemia neonatal, pero Arrington y Wallace (2) demostraron suministrando diastasa a conejos jóvenes que ésta no la contrarrestaba. Mack (15), considera que la enfermedad es más frecuente en planteles seleccionados genéticamente y cuya alimentación está esencialmente constituida por concentrados. En el país, Mogollón y colaboradores (20), a partir de casos de ocurrencia natural, sugieren que las aflatoxinas y algunos microorganismos como el *C. perfringens* y *E. coli* pueden estar involucrados en la etiología de la enfermedad.

Clínicamente, la E.M. se caracteriza por anorexia, somnolencia, pelaje áspero y erizado, polidipsia, timpanismo y evacuación intestinal de un material mucoide, semejante a gelatina; los conejos dan muestras de padecer gran dolor, toman una posición sentada típica con apariencia jorobada y permanecen inclinados sobre la vasija de agua, también se observa rechinar de dientes y la temperatura casi siempre es subnormal (7, 11, 13, 15, 17). Macroscópicamente el estómago se observa distendido hasta dos veces su tamaño, su contenido es translúcido o acuoso. El ciego aparece impactado con un contenido seco. El colon se encuentra distendido y contiene un moco claro de aspecto gelatinoso, cuya consistencia varía de semilíquida al de un tapón pegajoso. El intestino delgado también se encuentra distendido y contiene un material líquido semimucoide que puede reconocerse a través de la pared (7, 13, 16, 22, 24, 26). Los ganglios

* Contribución de los Programas Nacionales de Patología-Toxicología y Enfermedades Infecciosas y Epidemiología (División de Ciencias Veterinarias), Instituto Colombiano Agropecuario, ICA.

** Respectivamente: Médicos Veterinarios, Químico y Médico Veterinario Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias (LIMV). Apartado Aéreo 29743 Bogotá.

linfáticos mesentéricos pueden encontrarse ligeramente aumentados de tamaño y puede presentarse hepatomegalia; la vesícula biliar puede encontrarse distendida (13, 35).

Microscópicamente se aprecia hiperplasia de las células caliciformes especialmente a nivel del ileón, aunque ésta también puede observarse en el duodeno y yeyuno (3). Meshorer (18), describe además en casos agudos edema de la lámina propia y de la submucosa, acompañado por reacción inflamatoria y en los casos subagudos se observa también gran número de células plasmáticas y linfoides en la lámina propia. El intestino grueso presenta una mucosa hiperplásica con células epiteliales hiperromáticas, predominando las células caliciformes; en la lámina propia se observa congestión y pequeñas áreas hemorrágicas. En la luz intestinal se encuentran restos celulares resultado de la descamación intestinal y escasos neutrófilos (13).

Whitney (36), afirma que la dieta es una de las múltiples causas de la enfermedad y es bien conocido que muchas de las materias primas y granos que se emplean en la fabricación de alimentos están expuestos a sufrir contaminación por diversos hongos en el campo y durante su almacenamiento (12, 14, 34, 37).

Las aflatoxinas, son un grupo de metabolitos altamente tóxicos y carcinogénicos, producidos por cerca del 30% de las cepas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* que frecuentemente contaminan los piensos, alimentos cosechados y otros granos y productos fermentables (3, 4, 5, 10, 25, 33). La más tóxica en condiciones naturales es la aflatoxina B₁ y químicamente son cumarinas altamente sustituidas.

Estas toxinas son patógenas para casi todas las especies animales; los animales jóvenes son más susceptibles (5). En el conejo las lesiones iniciales se presentan en el hígado y corresponden a hemorragias y necrosis de los hepatocitos en las áreas midzonales de los lobulillos. Los sobrevivientes al efecto letal de una dosis única desarrollan hiperplasia moderada de los conductos biliares como se observa en otras especies (23). Hasta el presente para la especie cunícula no se ha informado de experimentos realizados con alimentos contaminados natural o artificialmente con estas toxinas; sin embargo, Torres (31, 32) y Mogollón y colaboradores (20), consideran que éstas pueden actuar como causa predisponente en la presentación de la E.M.

Por otra parte, a pesar de que el estómago y el intestino delgado del conejo desde el nacimiento hasta los 20 días de edad, se caracteriza por la completa ausencia de microorganismos, debido a la presencia de ácidos grasos libres como el n-decanoico y el n-octanoico que actúan como sustancias antimicrobiales, además de la alta acidez (pH 1.9) del contenido estomacal que impide el desarrollo de gérmenes que requieren de un medio ligeramente alcalino para su desarrollo (7, 28, 29), Torres (31, 32), Mogollón y colaboradores (20), encontraron altas concentra-

ciones ($1 \times 10^9/g$) de *C. perfringens* en los tapones de mocó y fragmentos de hígado de los conejos muertos durante los casos de ocurrencia natural de E.M. Aislamientos similares a los realizados por Whitney (36) y que sugieren el compromiso de este microorganismo en la patogenesis de la enfermedad.

3. MATERIALES Y METODOS

Para cuantificar el *C. perfringens* en la materia fecal de conejos desde el nacimiento hasta el destete, se seleccionaron al azar seis grupos de cinco animales provenientes de diferentes camadas de la raza Nueva Zelanda Blanco, los cuales se distribuyeron en los siguientes grupos de edad: 0-5 días, 6-10 días, 11-15 días, 25-40 días y 40-50 días. En el laboratorio los conejos se sacrificaron y del estómago e intestino se extrajo contenido en cantidad aproximada a un gramo. Para el recuento se utilizó el medio básico perfringens (MBP), modificación del medio Sahidi-Ferguson perfringens (SFP) (1). La confirmación bioquímica se realizó inoculando las colonias típicas crecidas en MBP, en tubos que contenían medio lactosa motilidad nitrato (LMN), modificación del medio lactosa-motilidad (LM) (1).

Para estudiar la interrelación entre las aflatoxinas y el *C. perfringens*, se diseñaron tres ensayos biológicos. En los dos primeros se administraron a varios grupos de conejos, concentraciones conocidas de aflatoxina B₁ y en el tercero se administraron también cantidades conocidas de toxina de *C. perfringens*.

Para el primer ensayo, se utilizaron 12 conejos de la raza Nueva Zelanda Blanco de 40 días de edad, los cuales se distribuyeron al azar en cuatro grupos de tres animales en jaulas experimentales. El ensayo tuvo un período de pretratamiento de cinco días, durante el cual los animales recibieron alimento concentrado libre de aflatoxinas detectables, según análisis previo y agua a voluntad. Posteriormente se les administró aflatoxina B₁ estándar*, de acuerdo al diseño experimental (Tabla 1) y al peso promedio de cada grupo. Como vehículo se utilizaron 2 ml de glicerol-etanol (1:1) (23). La administración se realizó diariamente por 10 días, mediante el empleo de sonda gástrica. El grupo control recibió únicamente el vehículo.

La observación se realizó a diario durante el experimento y a medida que se presentaba mortalidad se practicaba necropsia. Los sobrevivientes se sacrificaron a los 20 días de comenzar el ensayo. Se tomaron muestras de todos los órganos, las cuales se procesaron de acuerdo con las técnicas establecidas por el Laboratorio de Histopatología del LIMV, empleándose además las coloraciones de PAS para mucopolisacáridos y tricrómica de Masson para tejido conectivo. También se recolectó contenido de

* Aflatoxina B₁ estándar Calbiochem. San Diego, California, 9211 USA.

las diferentes porciones del tracto gastrointestinal en cantidad aproximada a un gramo, a fin de realizar recuentos de *C. perfringens* por las técnicas mencionadas.

En el segundo ensayo, se procedió de manera similar, pero modificando dos de las concentraciones de aflatoxina B₁ administradas (Tabla 1). Para el tercer ensayo se seleccionaron nueve conejos de características similares, a los cuales se les administró mediante sonda gástrica cantidades conocidas de toxinas de *C. perfringens* obtenidas de cepas aisladas de casos de ocurrencia natural y sometidas a esporulación en medio Duncan Strong, la cantidad de proteína se evaluó por medio de densidad óptica a una longitud de 280 nm (Tabla 2).

4. RESULTADOS

Se comprobó la ausencia total de *C. perfringens* en gazapos desde el nacimiento hasta el destete, día a partir del cual se observó un incremento progresivo del microorganismo, que coincidió con la iniciación del consumo de alimento concentrado (Tabla 3).

Los conejos de los dos primeros ensayos, presentaron en general los siguientes síntomas: decaimiento, inapetencia, pelo erizado, tendencia a permanecer en el mismo sitio por tiempo prolongado, algunos presentaron polidipsia y los conejos de los grupos 1 y 3 del primer ensayo mostraron evacuación de heces diarreicas con vestigios de moco (Figuras 1 y 2).

TABLA 1. Diseño experimental. Primero y segundo ensayo.

Grupo	Conejo No.	Concentración de Aflatoxina B ₁ administrada (ppb)	
		Ensayo 1	Ensayo 2
1	1	50	50
	2	50	50
	3	50	50
2	4	150	100
	5	150	100
	6	150	100
3	7	350	150
	8	350	150
	9	350	150
4	10		
	11	Control	Control
	12		

TABLA 2. Tercer ensayo. Toxinas de *C. perfringens* administradas.

Conejo (No.)	Cepa (No.)	1a. dosis proteína (mg/ml)	2a. dosis proteína (mg/ml)
10	24	0,9	4,5
15	21	0,12	1,2
17	21	1,2	6,0
18	24	9,0	45,0
19	16	1,0	5,0
20	4	0,13	1,3
21	4	0,13	1,3
22	16	0,10	1,0
23	24	0,9	9,0

TABLA 3. Recuento de *C. perfringens* en el tracto intestinal de gazapos desde el nacimiento hasta el destete.

Grupo de edad (días)	Animales experimentales (No.)	pH del quimo estomacal (X)	Recuento dilución $10^1 - 10^5$ (colonias/g)
0 - 5	5	5,0	—
6 - 10	5	4,5	—
11 - 15	5	4,5	—
16 - 25	5	4,5	—
26 - 40	5	4,5	—
41 - 50	5	3,0	1×10^1 - DNC*

* DNC Demasiado numeroso para contar.



FIGURA 1. Evidencias de diarrea con moco. Conejo del Grupo 1.



FIGURA 2. Comparación entre un conejo con diarrea del Grupo 1 con un conejo del grupo control.

Los conejos de los dos primeros ensayos, presentaron en general los siguientes síntomas: decaimiento, inapetencia, pelo erizado, tendencia a permanecer en el mismo sitio por tiempo prolongado, algunos presentaron polidipsia y los conejos de los grupos 1 y 3 del primer ensayo mostraron evacuación de heces diarreicas con vestigios de moco (Figuras 1 y 2).

Un conejo del grupo 1 presentó a partir del día ocho del tratamiento, rinitis mucopurulenta con posterior complicación pulmonar que lo condujo a la muerte en el día 10. Igualmente dos conejos del grupo 2 presentaron secreción nasal bilateral con disnea de inspiración y muerte en el término de dos días. Los conejos de los grupos 4 (controles), se observaron clínicamente normales durante todo el experimento.

Al examen macroscópico, en los conejos del grupo 1 del primer ensayo se observaron el tejido subcutáneo y las mucosas externas visibles de un aspecto normal. En dos animales, se encontró que el pulmón a nivel de los lóbulos apical y cardíaco presentaba áreas de consolidación neumónica, además de la presencia de un material blanquecino en la tráquea y bronquios. El contenido estomacal se observó de consistencia líquida o ligeramente semisólida. En la superficie hepática de uno de los animales se encontraron focos blanquecinos de forma irregular, aunque en su mayoría el órgano se apreció normal, al igual que en los otros animales. La vesícula biliar se encontró distendida. El intestino delgado en sus tres porciones presentó un contenido mucoide de color amarillo parduzco obser-

vándose también arborización de la serosa. En dos animales el colon contenía tapones de moco de color blanquecino. El ciego de dos animales se encontró aparentemente normal, mientras que el del tercero presentó un contenido semisólido de apariencia mucoide.

Microscópicamente en el hígado de dos animales, se observó dilatación sinusoidal por glóbulos rojos hacia la zona perilobulillar y cambios de metamorfosis grasa en algunos hepatocitos. El hígado del tercer conejo presentó algunos focos de necrosis de coagulación en la periferia de los lobulillos con desorganización de los cordones de hepatocitos. En el bazo se observó depresión de los nódulos linfoides con hiperplasia de las células reticulares. En el riñón se encontró degeneración parenquimatosa de las células de los túbulos contorneados proximales y distales, con presencia de un material de aspecto protenáceo en la luz de algunos túbulos. Los pulmones de uno de los conejos presentaron lesiones de bronconeumonía purulenta la cual fue ocasionada por *Pasteurella multocida*, según se comprobó por aislamiento.

A nivel del cerebro, cerebelo, miocardio, porción fúndica del estómago y páncreas no se observaron cambios. En el intestino delgado, a nivel del duodeno se observó pérdida total de la estructura de las vellosidades con presencia de células epiteliales de descamación en la luz, moco y colonias de bacterias de forma bacilar (Figura 3). Además se observaron cé-

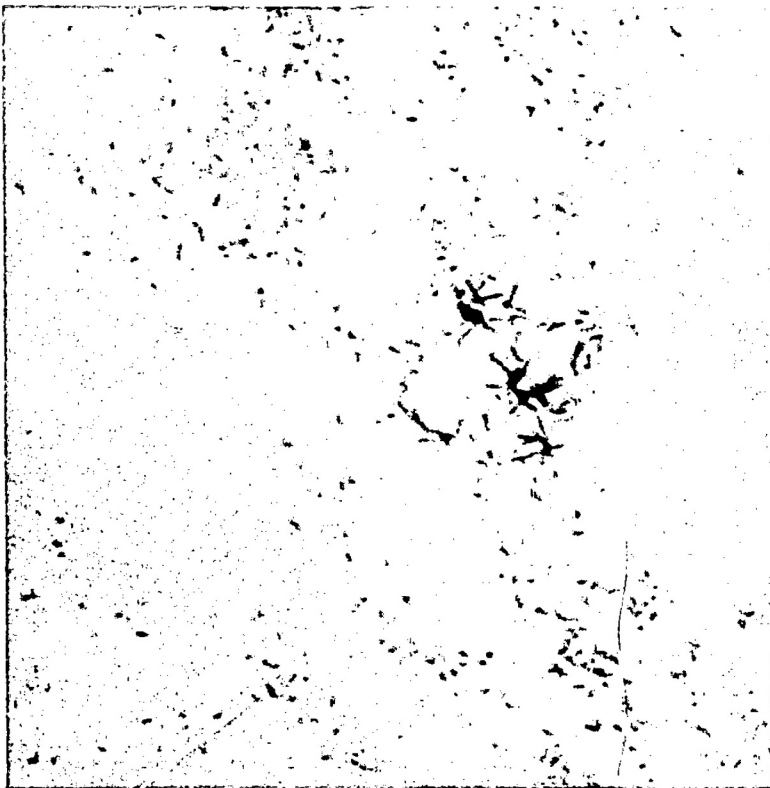


FIGURA 3. Duodeno de un conejo del Grupo 1, nueve días después de estar recibiendo aflatoxina B1. Obsérvense los microorganismos gram positivos de forma bacilar en el moco presente en la luz del órgano. Gram 400X.

lulas epiteliales con diversos grados de necrosis de coagulación y con presencia de polimorfonucleares fragmentados (Figuras 4, 5) e infiltración de la lámina propia por células plasmáticas, linfocitos y heterófilos (Figura 6). También se observó hiperplasia de las glándulas de Brunner con presencia de congestión de la submucosa. En el yeyuno, se apreció necrosis de coagulación de las vellosidades intestinales con descamación de células epiteliales e infiltración de células polimorfonucleares y mononucleares en la lámina propia, en algunas criptas se observó acúmulo de moco y aumento del tamaño de las células caliciformes. En el ileón, se observaron detritus celulares y restos de vegetales en la luz. También se parecieron aumento de la celularidad de la lámina propia y ligeros cambios necróticos en las células epiteliales, con marcada evidencia de las células caliciformes.

El intestino grueso, en el colon presentó hiperplasia de las células caliciformes con presencia de moco, observándose también colonias de bacterias de forma bacilar y estructuras levaduriformes en la luz del órgano. El ciego no presentó cambios morfológicos significativos.

Los animales del grupo 2, presentaron macroscópicamente las siguientes lesiones: tejido subcutáneo ligeramente amarillo, áreas de consolidación neumóni-

ca de color rojo, en los lóbulos pulmonares apical y cardíaco, con presencia de un material blanco-amarillento en la tráquea y bronquios de dos animales. El hígado de uno de ellos se observó de color amarillo pálido, en los otros dos fue aparentemente normal. En los tres la vesícula biliar se encontró distendida. El estómago no presentó cambios significativos. Las diferentes porciones del intestino delgado contenían un material mucoide amarillento, pardo oscuro o rojo claro. El colon tenía una ligera cantidad de moco y el ciego se encontró aparentemente normal.

Microscópicamente, el hígado presentó necrosis de coagulación en la periferia de los lobulillos con desorganización de los cordones de hepatocitos. Contiguamente a las áreas de necrosis se encontró metamorfosis grasa en los hepatocitos y distensión de los sinusoides por glóbulos rojos en la periferia lobulillar. Además, en dos animales se encontró aumento del tejido conectivo de las áreas portales con ligera hiperplasia de conductos biliares, mientras que en el tercero ésta fue moderada. En el bazo, se observó moderada depleción linfoide. En los pulmones de dos animales se observaron lesiones de bronconeumonía purulenta aguda. Los estudios bacteriológicos de este órgano permitieron el aislamiento de *P. multocida*.



FIGURA 4. Duodeno de un conejo del grupo control. Nótese la estructura normal de la mucosa intestinal (m). H-E. 160X.

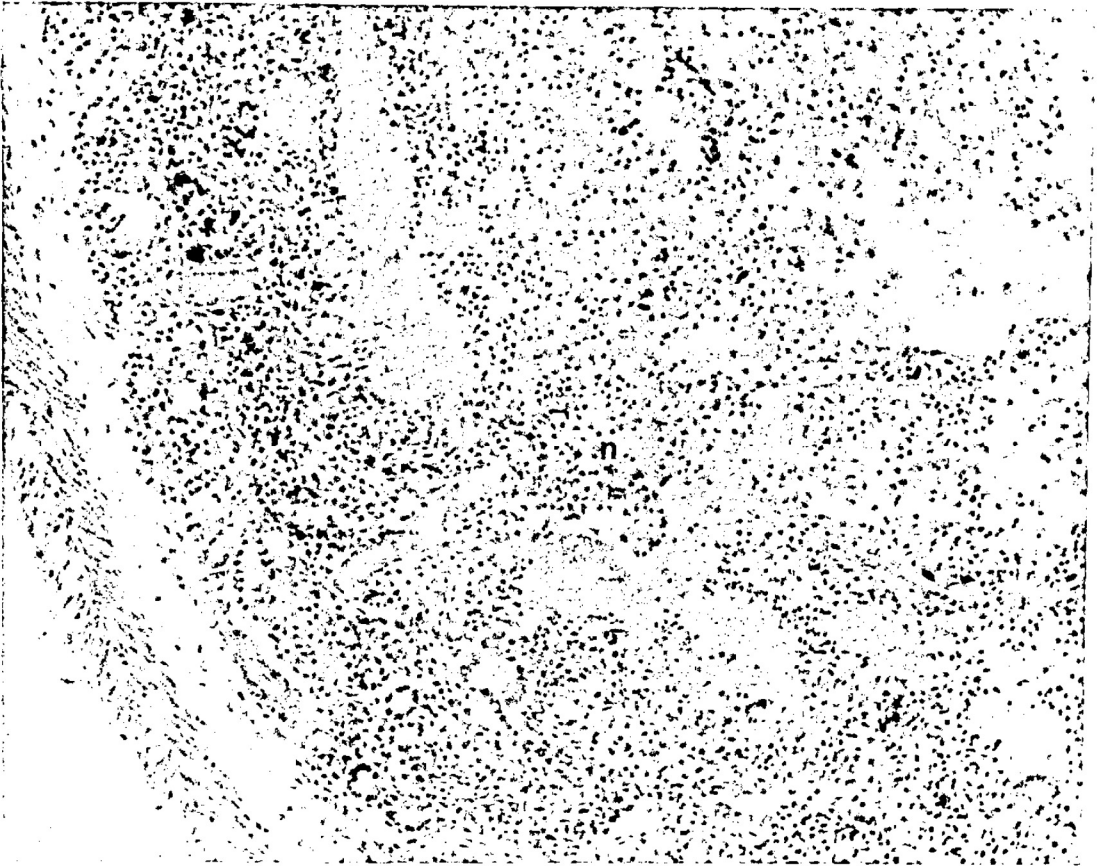


FIGURA 5. Duodeno de un conejo del Grupo 1, nueve días después de estar recibiendo aflatoxina B1. Nótese la pérdida de la estructura de las vellosidades y células epiteliales en diversos estados de necrosis (n). H-E. 100X.



FIGURA 6. Duodeno de un conejo Grupo 1, nueve días después de estar recibiendo aflatoxina B1. Nótese las áreas de necrosis de coagulación (n), la presencia de moco (m) y la infiltración de la lámina propia por heterófilos y linfocitos (i). H-E. 160X.

El cerebro, cerebelo, miocardio, páncreas, porción fúndica del estómago y los riñones no presentaron cambios apreciables. En el intestino delgado, la mucosa del duodeno y yeyuno presentó descamación epitelial, ligeros cambios necróticos en la extremidad de las vellosidades intestinales y presencia de moco en la luz de los órganos. También se observó un incremento de la celularidad de la lámina propia por heterófilos y linfocitos, además de congestión de los vasos sanguíneos de las submucosas. En el ileón, se encontró destrucción de las vellosidades por procesos necróticos. En algunas áreas se detectó la presencia de bacterias de forma bacilar en la luz de las criptas, algunas de las cuales se disponían perpendicularmente sobre las células epiteliales; las células calciformes se hallaron muy evidentes.

En el intestino grueso, los cambios más significativos se encontraron en el colon y consistieron en hiperplasia de las células calciformes, aumento del tamaño de las mismas por la cantidad de moco que contenían y presencia de un material mucoso de aspecto basófilo en la luz del órgano. El ciego no presentó cambios detectables.

En los conejos pertenecientes a los grupos 1, 2 y 3 del segundo ensayo, se apreció que los cambios macroscópicos eran similares a los descritos para los grupos 1 y 2 del primer ensayo.

Los conejos del grupo 3 presentaron evidencias de diarrea en la región perineal y restos de moco en el recto. Las conjuntivas presentaron un tinte subictérico y el tejido subcutáneo se observó de color amarillo pálido. La cavidad torácica contenía un líquido de color rojo claro, los lóbulos pulmonares en general presentaron un aspecto normal, pero la tráquea y el árbol bronquial contenían un material espumoso blanquecino. En el miocardio la grasa coronaria presentó una consistencia gelatinosa, un color amarillento y las cavidades cardíacas contenían sangre sin coagular. En la cavidad abdominal, el hígado era de color amarillo, de consistencia blanda y la vesícula biliar se observó distendida. El contenido estomacal era de consistencia semisólida. La serosa del intestino delgado se observó muy arborizada y con presencia de hemorragias petequiales a lo largo del tubo intestinal. El contenido intestinal era semimucoso y de color blanco amarillento o rojizo. El colon contenía tapones blancos de moco, mientras que el contenido cecal era semisólido. Los órganos linfoides presentaron un aspecto normal. Los vasos meníngeos del cerebro y cerebelo se apreciaron congestionados y las meninges presentaron un tinte amarillento.

Microscópicamente, en el hígado se observó congestión sinusoidal con marcada disociación de las laminillas epiteliales, particularmente hacia la periferia de los lobulillos. En algunos casos se apreció retención de la bilis en los canalículos biliares. En los hepatocitos perilobulillares se observaron cambios grasos, algunos hepatocitos mostraron diversos grados de necrosis de coagulación. Frecuentemente, se observó aumento del tejido conectivo portal, perilobulillar y alrededor de la vena central (Figuras 7, 8), hi-

perplasia de moderada a marcada de los conductos biliares (Figura 9), acompañada de infiltración portal mononuclear, principalmente de linfocitos y células plasmáticas (Figura 10). El bazo, presentó depresión linfoide de los corpúsculos de Malpighy e hiperplasia de células retículoendoteliales en dos animales. En los riñones, se observó congestión moderada de los vasos sanguíneos corticales y medulares y presencia de cilindros hialinos en algunos túbulos contorneados distales. Los pulmones se observaron congestionados y en uno de los animales se apreció edema y presencia de eritrocitos y macrófagos en la luz alveolar.

En el páncreas y en el miocardio no se observaron cambios morfológicos. El cerebro y el cerebelo de los animales se encontraron aparentemente normales, mientras que en el tercero se observaron focos granulomatosos dispersos en la sustancia gris, con infiltración perivascular de tipo mononuclear en la sustancia gris y en las meninges.

Al efectuar una coloración especial para organismos ácido-alcohol resistentes se apreciaron algunos pseudoquistes con organismos Zuehl-Neelsen positivos en su interior, compatibles con *Nosema cuniculi*.

En el intestino delgado, se encontró en el duodeno descamación epitelial con necrosis de las vellosidades y presencia de moco en la luz. La lámina propia presentó aumento de la celularidad por heterófilos y linfocitos. Los vasos sanguíneos de la submucosa se encontraron congestionados. Las glándulas de Brunner se apreciaron muy evidentes, con el citoplasma de las células acinares distendidas por moco. En el yeyuno se observó necrosis de coagulación de las células epiteliales y congestión de los vasos sanguíneos de la submucosa. En el intestino grueso, el colon presentó hiperplasia de las células calciformes con presencia de abundante moco en dos animales. Algunos oquistes inmaduros se observaron en la luz de este órgano en uno de los animales. El ciego no presentó cambios microscópicos apreciables.

Los animales de los dos grupos controles, se observaron clínicamente normales a través del experimento y no presentaron lesiones macro o microscópicas detectables.

Al efectuarse el recuento de *C. perfringens* de las diferentes porciones del tracto gastrointestinal de los conejos de los grupos 1, 2 y 3 de los ensayos, se observó un incremento en la concentración de este organismo, en comparación con los recuentos realizados en los animales de los grupos controles (Tablas 4, 5). Al realizar recuentos totales para otros microorganismos, se encontraron concentraciones que no excedieron a 10^6 (recuento de coliformes) colonias/g de contenido. Dentro de los aislamientos y tipificaciones realizados los más comunes fueron: *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus* sp.

La administración de toxina preformada de *C. perfringens*, al grupo de animales del tercer ensayo, no ocasionó efectos clínicos y tampoco se encontraron lesiones macro o microscópicas apreciables.

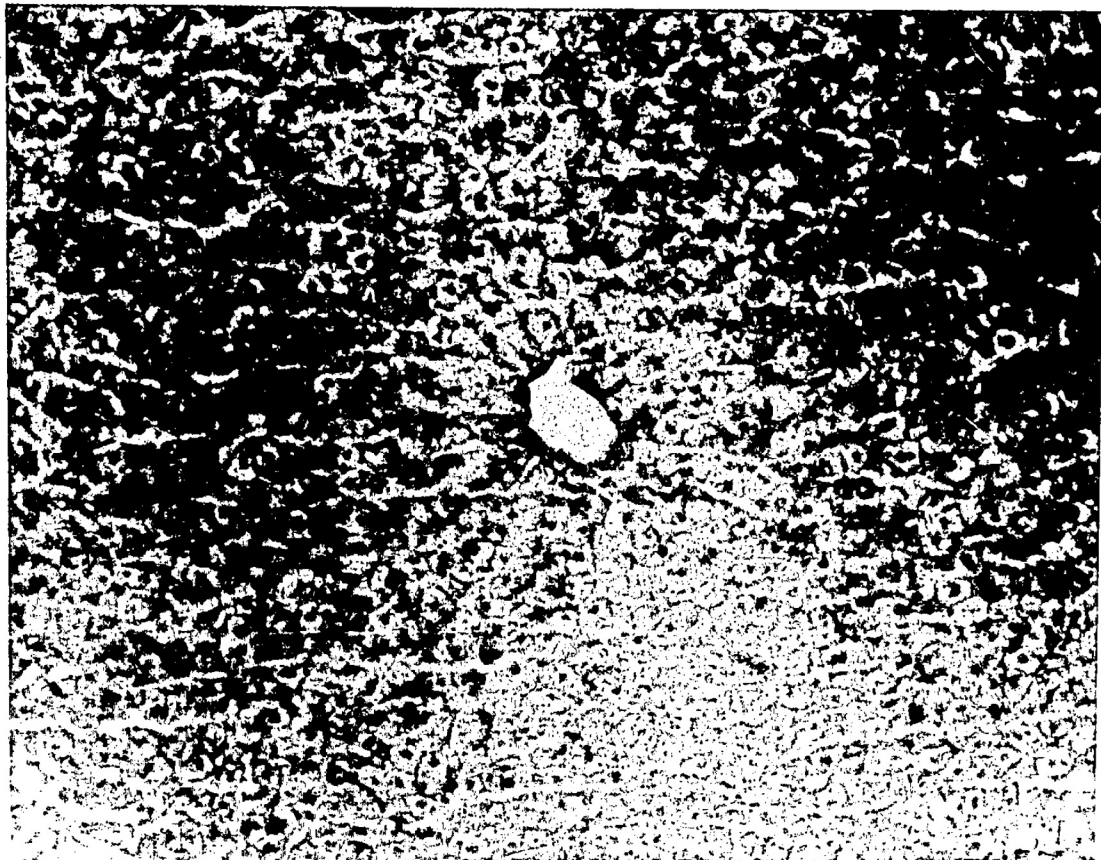


FIGURA 7. Hígado de un conejo del grupo control. Area centrolobulillar. Tricrómica de Masson. 100X.

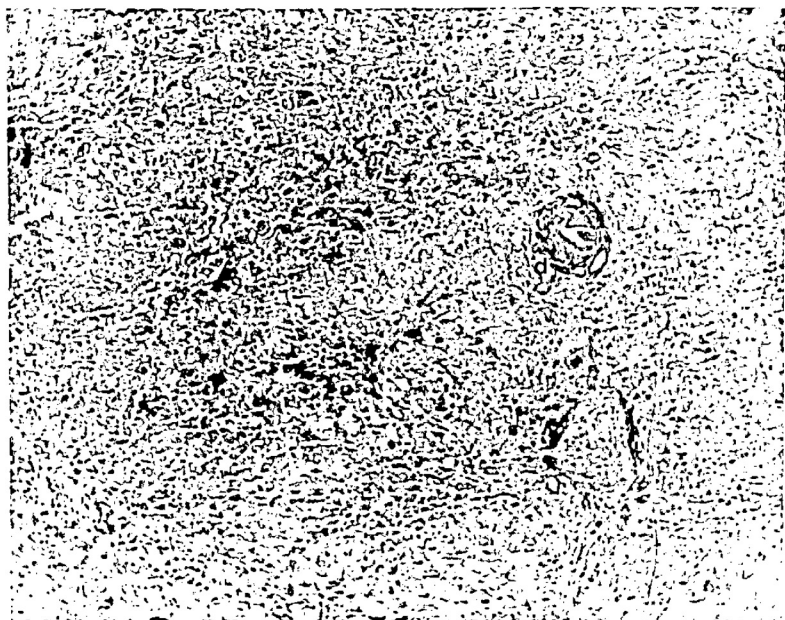


FIGURA 8. Hígado de un conejo del Grupo 3, ocho días después de estar recibiendo aflatoxina B1. Nótese el aumento de tejido conectivo alrededor de las venas centrales (v) y en las áreas portales (p). Tricrómica de Masson. 100X.

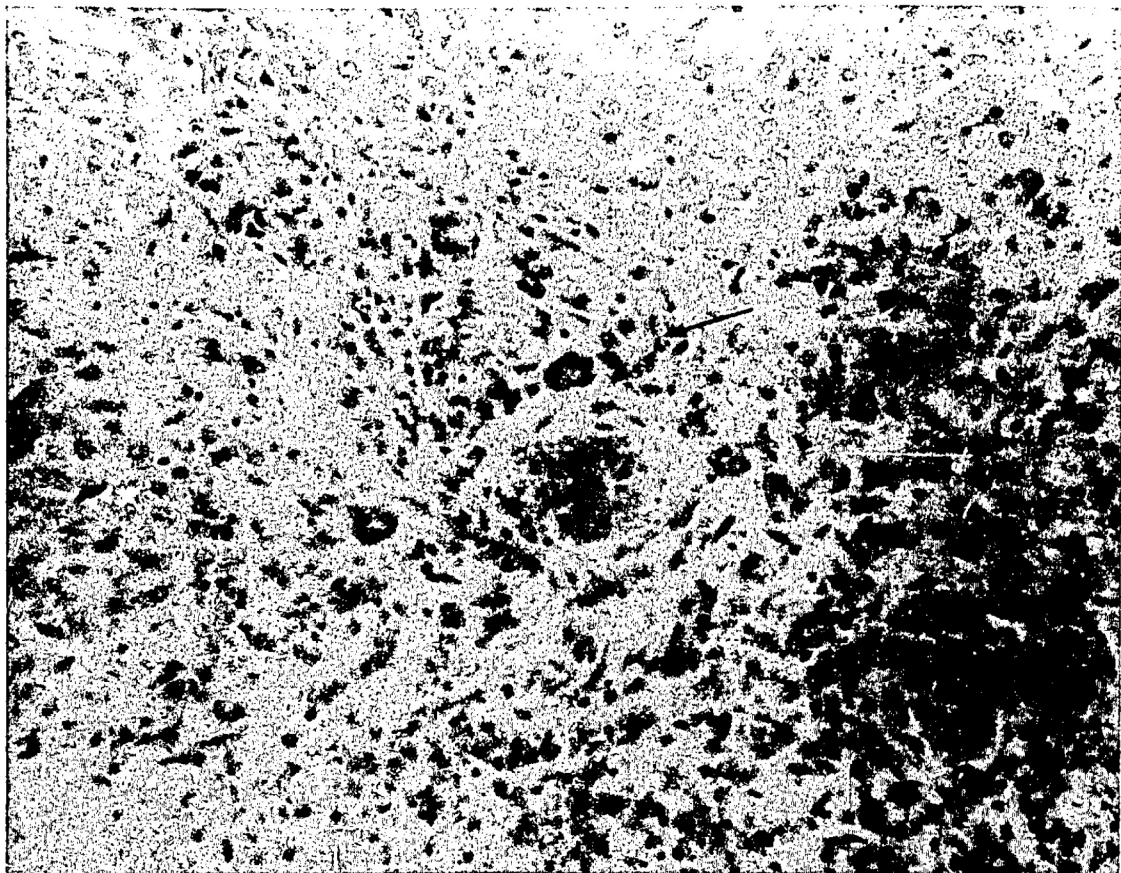


FIGURA 9. Hígado de un conejo del Grupo 3, ocho días después de estar recibiendo aflatoxina B1. Nótese la hiperplasia de conductos biliares (flecha). H-E. 160X.

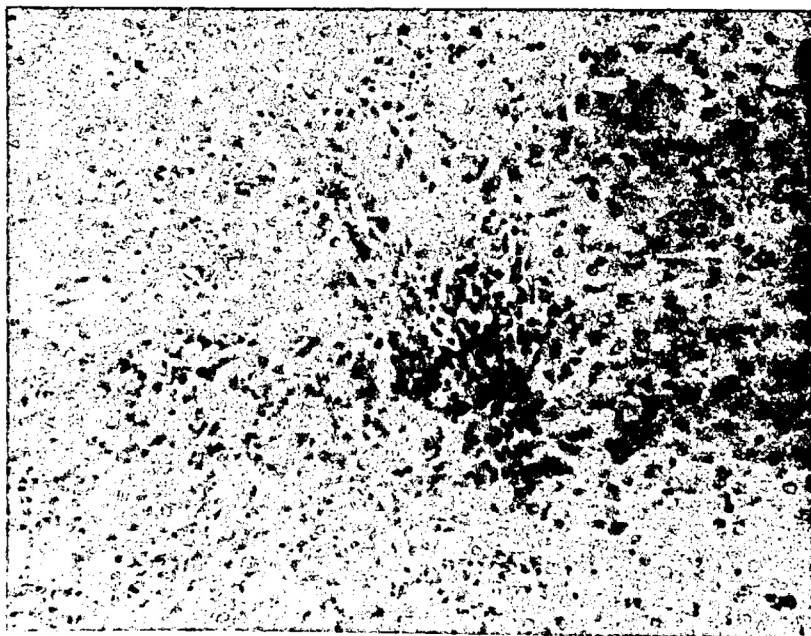


FIGURA 10. Hígado de un conejo del Grupo 3, ocho días después de estar recibiendo aflatoxina B1. Nótese la infiltración portal por células mononucleares (i). H-E. 160X.

TABLA 4. Recuento de *C. perfringens* (colonias/gramo de contenido) en las diferentes porciones del tubo digestivo. Ensayo 1.

Grupo	Conejo (No.)	Región del tubo digestivo				
		Estómago	Duodeno	Yeyuno	Ileón	Intestino grueso
1	1	—	$3,6 \times 10^2$	$1,8 \times 10^6$	$7,6 \times 10^5$	$1,3 \times 10^7$
	2	$1,8 \times 10^3$	$3,1 \times 10^5$	$7,5 \times 10^4$	$1,3 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$
	3	$1,0 \times 10^1$	$3,6 \times 10^2$	$2,3 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$	$6,3 \times 10^5$
2	4	—	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^3$
	5	$1,0 \times 10^1$	$4,2 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$
	6	$2,0 \times 10^1$	$1,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$8,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$
3	7	—	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$7,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^3$
	8	$1,0 \times 10^1$	$4,2 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^6$
	9	$2,0 \times 10^1$	$1,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$8,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$
4	10	—	—	—	$3,0 \times 10^1$	—
	11	—	—	$6,0 \times 10^1$	$1,7 \times 10^3$	—
	12	—	—	$7,0 \times 10^1$	$6,0 \times 10^1$	—

TABLA 5. Recuento de *C. perfringens* (colonias/gramo de contenido) en las diferentes porciones del tubo digestivo. Ensayo 2.

Grupo	Conejo (No.)	Región del tubo digestivo				
		Estómago	Duodeno	Yeyuno	Ileón	Intestino grueso
1	1	—	$2,1 \times 10^3$	$4,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4$
	2	$6,0 \times 10^1$	$4,2 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$
	3	—	—	$6,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^4$
2	4	$3,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^5$	$4,5 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$	$4,9 \times 10^7$
	5	$6,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^5$	$8,6 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$
	6	$3,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$
3	7	—	—	—	—	—
	8	—	$3,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^5$	—
	9	$4,2 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	—
4	10	—	—	—	$1,6 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$
	11	—	—	$3,0 \times 10^2$	$1,7 \times 10^3$	$1,5 \times 10^5$
	12	$4,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	$2,9 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$

5. DISCUSION

La no observación de formas vegetativas de *C. perfringens* en gazapos desde el nacimiento hasta el destete y su incremento progresivo en las diferentes porciones del tracto digestivo a partir de este momento, se podrían explicar por la iniciación del consumo de alimentos concentrados, o por la ingestión de bolos fecales maternos que contienen el *C. perfringens* durante la seudorumiación que practica la especie cu-

nícula. Estas observaciones concuerdan con los estudios de Smith (28, 29), quien demostró que en los estadios iniciales del conejo lactante existen en el estómago sustancias antimicrobiales y una alta acidez del contenido que impiden la colonización de organismos tipo *C. perfringens*. Sin embargo, también es factible que al llegar al animal a la época del destete la actividad antimicrobial disminuya facilitando el crecimiento de este tipo de organismos.

Por otra parte, los resultados de los recuentos de *C. perfringens* realizados en las diferentes porciones del tracto gastrointestinal de los grupos de conejos que recibieron aflatoxina B₁, permitieron también demostrar el incremento de este microorganismo, situación similar a la descrita por Torres y colaboradores (31), Mogollón y colaboradores (20) y Whitney (36) en casos de ocurrencia natural de la enfermedad, junto con los aislamientos y tipificaciones realizadas para otros microorganismos en el contenido gastrointestinal de estos animales. De otra parte, la presentación de otros desórdenes causados por agentes tales como: (*Nosema cuniculi*, *Pasteurella multocida*, *coccidias* y levaduras tipo *Sacharomycopsis* sp.,) podría explicarse por la acción lesiva de las aflatoxinas sobre el sistema inmunológico, factor éste demostrado en estudios anteriores en otras especies (6, 9, 19, 21, 30). Condición que determina que el organismo no pueda responder adecuadamente al stress ocasionado por algunos factores como cambios bruscos en la dieta, cambios en el manejo o a la acción de agentes infecciosos (6, 9, 19, 21, 30) y estaría de acuerdo con los postulados de Flatt y colaboradores y Sinkovics (7, 27), quienes afirman que los hallazgos clostridiales y de *E. coli* juegan un papel secundario en la presentación del complejo E.M. De igual forma, las toxinas de *C. perfringens* administradas a los conejos del tercer ensayo, no produjeron efectos patógenos posiblemente debido a que las cepas eran de baja patogenicidad o mejor a la ausencia de un factor predisponente que favoreciera su actividad.

De otro lado, los conejos que recibieron 50 ppb de aflatoxina B₁ en los dos primeros ensayos desarrollaron un cuadro clínico-patológico similar al descrito en la literatura para la E.M (3, 7, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 22, 24, 26, 36) y al descrito para la presentación natural de la enfermedad (20), no obstante que en esta forma las lesiones hepáticas se limitan sólo a cambios variables de metamorfosis grasa, mientras que en los casos experimentales éstas son ligeramente más severas, condición que podría explicarse por el carácter agudo de la enfermedad en su forma natural.

Los conejos de los grupos 2 y 3 que recibieron concentraciones de aflatoxina B₁ superiores a 100 ppb, desarrollaron un cuadro de aflatoxicosis entre sub-aguda y crónica, cuyas lesiones hepáticas son comparables a las descritas en la literatura para ésta y otras especies (10, 23), destacándose el aumento del tejido conectivo portal y perolobulillar el cual se hizo evidente por la realización de coloraciones especiales, como también la observación de que las lesiones necróticas lobulillares fueron más frecuentes en las zonas periféricas que en las paracentrales a diferencia de lo afirmado por algunos investigadores (23). De igual forma, merece destacarse que hasta donde se tiene conocimiento es la primera vez que se realiza la descripción de las alteraciones macro y microscópicas de los diferentes órganos y tejidos de conejos afectados por

aflatoxicosis, al mismo tiempo que es la primera vez que se relaciona a las aflatoxinas como causa predisponente de la E.M.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Por los resultados obtenidos, se concluye que las aflatoxinas, o al menos la aflatoxina B₁, desempeñan un papel muy importante en la presentación del Complejo Enteritis Mucoide del Conejo, ya que como se demostró pueden actuar como causa predisponente de la enfermedad, determinando el incremento de gérmenes tipo *C. perfringens*, que vendrían a complicar el cuadro clínico-patológico, sin descartar la posible patogenicidad de otros organismos que como el *E. coli* son considerados habitantes normales de la flora gastrointestinal de los conejos.

La ingestión de materias primas y/o alimentos concentrados contaminados con niveles de 50 ppb o más de aflatoxinas, constituyen de acuerdo a lo observado un riesgo para la salud de los animales, ya que además de predisponer a la presentación de la E.M., vendrían a alterar el sistema inmunológico, determinando un aumento en la susceptibilidad a sufrir otros desórdenes, bien sea por causas infecciosas o ambientales.

Con base en estas observaciones, se recomienda utilizar en la alimentación de esta especie, materias primas y/o alimentos concentrados libres de aflatoxinas, al mismo tiempo que debe evitarse el suministrar a los animales, productos que han sido almacenados por tiempos más o menos prolongados bajo condiciones de humedad y temperatura que favorecen el desarrollo de hongos toxigénicos.

En caso de presentarse un brote de la enfermedad, se aconseja cambiar de inmediato el alimento, adicionando a la nueva dieta antibióticos tipo clortetraciclina para tratar de contrarrestar la proliferación de microorganismos en el tubo digestivo.

Se podría estudiar también el efecto protectorio de toxoides a base de *C. perfringens*, los cuales fueron usados con algún éxito en el brote de la enfermedad durante 1975* y que podrían controlar en parte la mortalidad, aunque seguramente no la morbilidad.

7. RESUMEN

Se realizaron tres ensayos biológicos para tratar de esclarecer el papel del *Clostridium perfringens* y de las aflatoxinas en el "Complejo Enteritis Mucoide del Conejo" y se cuantificó la presencia de este organismo en el contenido gastrointestinal de gazapos desde el nacimiento hasta el destete.

Para los dos primeros ensayos se utilizaron 24 conejos, de 40 días de edad de la raza Nueva Zelanda Blanco (12 conejos por ensayo), los cuales se distribuyeron al azar en grupos de tres animales por jaula para efectos de administrarles vía oral y según el peso afla-

* Torres Angel, M.J. Efecto protectorio del *C. perfringens* en el control de la E.M. (Comunicación personal, 1978).

toxina B₁ estándar en las siguientes concentraciones 50, 100, 150 y 350 partes por billón (ppb). El experimento duró 20 días, los conejos de los grupos control recibieron sólo el vehículo y los parámetros estudiados fueron signos clínicos, cambios macro y microscópicos y recuentos de *C. perfringens* y otros microorganismos a partir del contenido gastrointestinal. En el tercer ensayo, a nueve conejos de características similares a los anteriores se les administró vía oral cantidades conocidas de toxinas *C. perfringens*.

No se demostró la presencia de *C. perfringens* en el contenido gastrointestinal de gazapos desde el nacimiento hasta el destete (40 días de edad), día a partir del cual se observó un incremento progresivo del mismo.

Las observaciones clínicas y las alteraciones macro y microscópicas encontradas en los dos grupos de conejos que recibieron 50 ppb de aflatoxina B₁ son muy similares a las descritas en la literatura para la enfermedad, permitiendo determinar que al menos la aflatoxina B₁ puede actuar como causa predisponente de la Enteritis Mucoide, facilitando a su vez la proliferación de otros microorganismos normales en el tubo digestivo de los conejos como el *C. perfringens* y el *E. coli*, los cuales vendrían a complicar el cuadro clínico-patológico. Los grupos de animales que recibieron concentraciones de la micotoxina superiores a 100 ppb desarrollaron un cuadro de aflatoxicosis entre sub-aguda y crónica, para la cual se describen en los diferentes órganos y tejidos las alteraciones macro y microscópicas.

Finalmente, se discute la interrelación entre las aflatoxinas y el *C. perfringens* en la presentación de la enfermedad y se sugieren algunas medidas de prevención y control de la misma.

8. SUMMARY

Complex mucoïd enteritis of rabbits II. Causative relationships between aflatoxins and *Clostridium perfringens*

Three experiments were carried out in order to determine what role *C. perfringens* and aflatoxin

play in the complex mucoïd enteritis of rabbits, and to measure quantitatively the presence of this organism in the gastrointestinal contents of young rabbits between birth and weaning.

In the first two experiments 24 New Zealand rabbits of 40 days of age (12 rabbits in each experiment) were divided into groups of three and given standard aflatoxin B₁ in concentrations of 50, 100, 150 and 350 parts per billion (ppb). The experiment lasted for 20 days and the rabbits in the control groups received only the vehicle by which the aflatoxin was administered.

The clinical signs, the macro and microscopical changes, the number of *C. perfringens* and other organisms in the gastrointestinal contents were recorded.

In the third experiment nine rabbits of similar type and age of those used in the first two experiments were given known oral quantities *C. perfringens* toxins.

The result of the counts of *C. perfringens* in the gastrointestinal contents of young rabbits showed the complete absence of the organism until 40 days of age, after which there was a progressive increase in the number of organisms.

The clinical observations and macro and microscopical changes showed that the group of rabbits receiving 50 ppb of aflatoxin B₁ were very similar to the descriptions of the disease in the literature.

It was therefore suggested that Aflatoxin B₁ was able to act as a predisposing factor of mucoïd enteritis, allowing the proliferation of other microorganisms which are normally found in digestive system of rabbits *C. perfringens* and *E. coli* which thus complicate the clinico pathological picture.

The groups of animals that received concentrations of micotoxins higher than 100 ppb developed a clinical aflatoxicosis which varied between the subacute and the chronic form. The macro and microscopical lesions in the various tissues and organs were described.

Finally the relationship between Aflatoxins and *C. perfringens* when the disease occurs was discussed together with the means of prevention and control.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALVAREZ, N.; TORRES, ANJEL, M.J.; OSPINA, B.O. Prevalencia de contaminación microbiológica en alimentos para aves y materias primas para su elaboración. Bogotá Universidad Nacional de Colombia. 1975. 15 p. (Sin publicar).
2. ARRINGTON, L.B.; WALLACE, L.J. The effect of diastase upon mucoïd enteritis and growth of rabbits. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*, v. 61. p. 1210-1212.
3. BUCK, W.B.; OSWEILER, G.D.; GELDER, G. A. VAN. *Clinical diagnostic veterinary toxicology* Kendall Hunt Publishing Company, Dubuke Iowa. 1973. 287 p.

4. CURA, M.; LOPEZ, C.; LOPEZ, R. Efecto de las aflatoxinas sobre las gallinas en postura. *Técnica Pecuaria en Méjico*. v. 20. 1972. p. 28-32.
5. EDDS, G.T. Acute aflatoxicosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 162. 1973. p. 304-309.
6. -----; NAIR, K.P.C.; SIMPSON, C.F. Effect of aflatoxin B₁ on resistance in poultry against cecal coccidiosis and Marek's Disease. *American Journal of Veterinary Research*. v. 34. 1973. p. 819-826.
7. FLATT, R.C.; WISBROTH, S.H.; KRAUS, A.L. The biology of the Laboratory Rabbit. Academic Press, New York. p. 188. 1974. 437-438.
8. GALLARDO, A. Tratamiento sintomático de la Enteritis Mucoide inespecífica en conejos de carne. *Revista de Medicina Veterinaria*. Buenos Aires. v. 48. 1967. p. 11-16.
9. GIAMBRONE, J.J.; WERT, D.L.; WYATT, R.D.; EDISON, C.S. Effect of Aflatoxin on the Humoral and cell mediated immune systems of the chicken. *American Journal of Veterinary Research*. v. 38. 1978. p. 305-308.
10. GOLDBLATT, L. Aflatoxin. 2 ed. Academic Press, New York. 1972. 472 p.
11. GREENHAM, N.L. Soms preliminary observations on rabbit mucooid enteritis. *Veterinary Record*. v. 74. 1962. p. 79-84.
12. HESSELTINE, C.W.; STOTWELL, O.L.; ELLIS, J.J.; SUBBLEFIELD, R.D. Aflatoxin formation by *Aspegillus flavus*. *Bacteriological Reviews*. v. 30. 1966. p. 795-804.
13. KRUININGEN, H.J.; WILLIAMS, C.B. Mucooid enteritis in rabbits *Veterinary Pathology*. v. 9. 1972. p. 53-77.
14. LOPEZ, C. Los hongos de las semillas y su relación con las micotoxicosis en aves. En Seminario Avícola Internacional. 10 Méjico. Julio 15-17. Memorias Secretaría de Agricultura y Ganadería. 1968. p. 67-73.
15. MACK, R. Disorders of the digestive tract of demesticated rabbit. *Veterinary Bulletin*. v. 32. 1962. p. 191-199.
16. MAZZETTI, R.L. L'uso del bacterium bulgaricum nell' enterite mucoide del coniglio. L'igiene dell' alimentazione e dell' ambiente come mezzi coadiuvneti della profilassi e della cura. *Instituti Zooprofilattice Sperimentali del Lazio e della Toscana*. 1970. p. 287-293.
17. McCUISTION, W.R. Rabbit Mucooid Enteritis (Neonatal hypoamilasemia). *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician*. v. 59. 1964. p. 815-818.
18. MESHORER, A. Histological finding in rabbits which died with symptoms of mucooid enteritis. *Laboratory Animals*. v. 10. 1976. p. 199-202.
19. MICHAEL, G.Y.; THAXTON, P.; HAMILTON, P.B. Impairment of the reticuloendothelial system of chickens during aflatoxicosis. *Poultry Science*. v. 52. 1973. p. 1206-1207.
20. MOGOLLON, J.D.; PEÑA, N.E.; JIMENO, M.C.; RODRIGUEZ, M.G. Complejo Enteritis Mucoide del Conejo. Parte I. Descripción de casos de ocurrencia natural. Bogotá. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. 1980. 16 p. (Sin publicar).
21. MOHOS, BAJAN LA RESISTENCIA DE LAS AVES A LAS ENFERMEDADES. *Industria Avícola*. v. 24, no. 3. 1977. p. 30-31.
22. Moreira, E.C.; SILVA, J. M.L.D.A.; VIANA, F.C.; MOREIRA, W.L.; SIGUEIRA, E.B. Surto de Enterite Mucoide en coelbos domesticos en minas gerais. *Arquivos Da escola de Veterinaria*. Universidad Federal de Minas Gerais. v. 25. 1973. p. 121-128.
23. NEWBERNE, P.M.; BUTLER, H.W. Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: A Review. *Cancer Research*. v. 29. 1960. p. 236-250.
24. PATTON, N.M.; HOMES, H.T.; RIGGS, R.J.; CHEEKE, P.R. Enterotoxemia in rabbits. *Laboratory Animal Science*. v. 1978. p. 536-540.
25. PELAEZ, A. Reducción de la incidencia de hongos productores de Aflatoxinas en incubadoras, nacedoras y recintos para almacenamiento de granos y alimentos. En: Seminario Avícola Internacional 10. Bogotá, diciembre 5-10. Memorias. Bogotá AMEVEA. 1975. p. 47-49. (Mimeografiado).
26. POUT, D. Mucooid Enteritis in Rabbits. *Veterinary Record*. v. 89. 1971. p. 214-216.
27. SINKOVICKS, G. Intestinal flora studies in rabbit mucooid enteritis. *Veterinary Record*. v. 98. 1976. p. 151-152.
28. SMITH, W. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *The journal of Pathology and Bacteriology*. v. 90. 1966. p. 495-515.
29. SMITH, W.- The antimicrobial activity of the stomach contents of suckling rabbits. *The journal of Pathology and Bacteriology*. v. 91. 1966. p. 1-9.

30. THATON, J.P.; TUNG, H.T.; HAMILTON, P.B. Immunosuppression in chickens by aflatoxin. *Oultry Science*. v. 53. 1974. p. 721-725.
31. TORRES, M.J.; BERNAL, A. *Clostridium perfringens* y enfermedad de Tizzer en el complejo anteropático mucoide del conejo. *En: Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia 10. Medellín Diciembre 7-11. Memorias Medellín COLVEZA*. 1975.
32. -----, Aflatoxicosis and example of food hygiene, *visa-vis storage*. WHO/FAO. Expert Committee on Microbiological Aspects of Food Hygiene, Ginebra. 1976.
33. VILLEGAS, P. Condiciones que favorecen el crecimiento de hongos. *En: Día de campo sobre Sorgo. Armero, diciembre 15. Memorias Distraco-FINCA*. 1975. p. 14-15. (Mimeografiado)
34. VILLEGAS, P. Micotoxinas en Avicultura. *Boletín divulgativo No. 8. Subgerencia de Producción Pecuaria, Instituto Colombiano Agropecuario*. 1975. p. 107-114. (Mimeografiado).
35. WHITNEY, J.C. Disease of the commercial rabbit. *Veterinary Record*. v. 10. 1977. p. 299-303.
36. -----, A review of non-specific enteritis in the rabbit. *Laboratory Animals*. v. 10. 1976. p. 209-221.
37. WOGAN, G. *Mycotoxins in foodstuffs*. 2a. ed. The Massachusetts Institute of Technology. Cambridge Massachusetts. 1966. p. 228.