

Enterococcus hirae asociado a diarreas en conejos lactantes

Fernández A.^{1*}, Moreno B.¹, Chacón G.¹,
Villa A.¹, Casamayor A.², Vela A.I.²,
Fernández-Garayzábal J.F.², Comenge J.³

¹ Exopol. Autovacunas y Diagnóstico. Pol. Río Gállego, c/D, Parc. 8. 50840 San Mateo de Gállego. Zaragoza.

² Centro VISAVET. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid.

³ Nanta. SA. Ronda de Poniente 9m. 28760 Tres Cantos. Madrid.

*afernandez@exopol.com

Resumen

En este trabajo se describe por primera vez un caso de diarrea en conejos lactantes de 5-7 días de edad con desarrollo posterior de alopecia en gazapos de 10-18 días asociado a *Enterococcus hirae*. El proceso afectó principalmente a camadas de hembras primerizas con una prevalencia del 85%. Se analizaron un total de 45 muestras, 29 muestras digestivas y 16 de origen ambiental. Histológicamente se observó la presencia de numerosos cocos Gram positivos adheridos a la superficie epitelial del intestino delgado sin lesiones inflamatorias. *E. hirae* fue aislado en el 100% de gazapos diarreicos de 5-7 días de edad, en el 70% de los gazapos de 10-18 días y en varias muestras de origen ambiental. Ningún otro agente patógeno fue identificado. Mediante PFGE, los 42 aislamientos, incluyendo los aislados de diferentes muestras ambientales, mostraron idéntico patrón de restricción. No ha sido posible determinar el origen de la infección.

Palabras clave: conejo, *Enterococcus hirae*, diarrea.

Abstract

This is the first description of a disease in rabbits associated with *Enterococcus hirae* infection. *E. hirae* was isolated from 5-7 days old diarrhoeic suckling rabbits and from 10-18 days old suckling rabbits that also showed alopecia. They came from an industrial rabbit farm. The offspring of primiparous lactating does were the most affected ones with a prevalence of 85%. A total of 45 samples were analyzed, 29 from digestive origin and 16 from farm premises. The brush border of small intestine villi in affected animals was multifocally coated with numerous adherent gram-positive cocci and no significant inflammation was observed. *E. hirae* was isolated from 100% of 5-7 days old affected rabbits, from 70% of 10-18 days old animals and from several ambient samples. No other pathogens were detected. Forty-two *E. hirae* isolates were analyzed by sequencing the 16S rRNA gene revealing that all were genotypically identical. They were also genetically characterized by PFGE and dis-

played undistinguishable PFGE macrorestriction patterns indicating that all clinical isolates represent a single strain.

Key words: rabbit, *Enterococcus hirae*, diarrhoea.

Introducción

El género *Enterococcus* está formado por 40 especies de bacterias Gram positivas, de forma cocoide, catalasa negativas y anaerobias facultativas. Se trata de microorganismos considerados generalmente comensales no patógenos, presentes en el tracto gastrointestinal. Aunque su clasificación está constantemente cambiando, según el análisis de su 16S rRNA es posible distinguir dentro del género 5 grupos de especies (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. avium*, *E. gallinarum* y *E. cecorum*) además de otras especies que permanecen sin asociar a ninguno de estos grupos (Köhler, 2007). *E. hirae* pertenece al grupo de *E. faecium* y presenta gran similitud fenotípica con algunas especies del grupo como *E. faecium*, *E. durans* y *E. villorum* (Vancanneyt *et al.*, 2001, Devriese *et al.*, 2002), por lo que la historia bibliográfica de estas especies no puede tratarse por separado. Así, se han descrito procesos entéricos patológicos asociados a dichas especies en ratas lactantes (Etheridge *et al.*, 1988), potros (Tzipori *et al.*, 1984), gatitos lactantes (Lapointe *et al.*, 2000), perros y cachorros de perro (Collins *et al.*, 1988), terneros (Rogers *et al.*, 1992), pollos (Kondo *et al.*, 1997) y lechones antes del destete (Cheon y Chae, 1996; Vancanneyt *et al.*, 2001).

Entre las causas de problemas digestivos en conejos nunca se ha descrito a una especie de enterococo como agente etiológico. En el presente trabajo se describe un caso clínico de diarrea en conejos lactantes asociado a *Enterococcus hirae*.

Material y Métodos

Explotación. Se trata de una explotación industrial de cría de conejo compuesta por 7 naves de madres más una de reposición y otra mixta. Las primíparas entran en la sala de reposición a las 8 semanas y cuando alcanzan las 21 semanas son introducidas en las salas de partos. Los nidales son de madera y se les administra paja poco antes del parto para que hagan el nido, de modo que las hembras se comen parte de la paja. A las hembras se les permite el acceso a los nidos 3 días antes del parto y una vez se desteta la camada, a los 28 días, los nidales se limpian y desinfectan.

Historia clínica. A finales de 2006 se observa un incremento de camadas afectadas por diarrea. Esta aparecía en gazapos de entre 5 y 7 días de edad y se acompañaba de alopecia generalizada en aquellos gazapos que lograban sobrevivir cuando estos alcanzaban los 10-15 días de vida. Se constató que eran las camadas de hembras primerizas las más

afectadas por el problema alcanzando una morbilidad del 85% de las camadas afectadas y una mortalidad del 50% de los gazapos. En las hembras múltiparas la morbilidad en las camadas era de un 6-7%, mientras que la mortalidad se situaba en el 30% de los gazapos.

Análisis laboratoriales. La relación del total de muestras recibidas en Exopol fue la expuesta en la **Tabla 1**. La sospecha de un posible origen ambiental tras los primeros análisis realizados en los gazapos afectados hizo que además se tomaran otras muestras (de madres, pienso, paja y nidales).

Todas las muestras recibidas fueron sembradas en agar sangre Columbia, agar McConkey, agar XLD (Oxoid) y se incubaron a 37°C durante 24-48 horas. A partir de los animales se sembró tanto intestino delgado como ciego. Las bacterias aisladas se identificaron mediante pruebas bioquímicas convencionales y con el sistema comercial Rapid ID32 Strep (Biomerieux). La identificación bioquímica de los aislamientos fue confirmada mediante la secuenciación del 16S rRNA de cada aislamiento tal y como ha sido descrito previamente (Vela *et al.*, 2007). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las de otros microorganismos Gram positivos catalasa negativos en la base de datos GenBank utilizando el program BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Los aislamientos también fueron caracterizados genéticamente mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) de acuerdo al protocolo de Vela *et al.* (2003), utilizando las enzimas de restricción *ApaI* y *SmaI* de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

En los órganos e hisopos digestivos se realizó además una inmunocromatografía para detección de *Cryptosporidium* mediante el sistema comercial IC Cryptosporidium (Exopol) y en 6 de los gazapos de entre 5 y 7 días se realizó la detección de rotavirus y coronavirus mediante inmunoperoxidasa indirecta tal y como ha sido descrito previamente (Villa *et al.*, 2002), utilizando como anticuerpos primarios un monoclonal anti Rotavirus (Chemicon) a dilución 1:100 y un monoclonal anti Coronavirus (Biogénesis) a dilución 1:200. Como conjugado se utilizó un anticuerpo anti IgG de ratón Fab específico marcado con peroxidasa (Sigma A-2304).

En 24 animales se realizó la necropsia completa, tomándose muestras para histopatología de intestino delgado y ciego en 12 de ellos (6 de cada grupo de edad) y de piel en 4 de los gazapos alopécicos. Las muestras se procesaron de forma rutinaria tiñéndose con Hematoxilina-Eosina y, en algunos, con tinción de Gram.

Resultados y Discusión

Las lesiones macroscópicas observadas en los gazapos necropsiados fueron muy inespecíficas y se circunscribían al aparato digestivo. Éstas se correspondían habitualmente con ligera congestión intestinal, en ocasiones moderada a intensa, y contenido cecal acuoso o semifluido de color amarillento. En la piel únicamente se observaba alopecia generalizada sin presencia de más lesiones. Histológicamente, en los gazapos de 5-7 días, se observó en intestino delgado la presencia de fenómenos vasculares sin inflamación, con ligera a moderada congestión y edema de la lámina propia y numerosas bacterias cocoides Gram positivas adheridas al epitelio y ocupando la luz intestinal. El ciego presentaba zonas con exudado neutrofílico en la luz asociado a bacterias cocoides y congestión y edema de la lámina propia. En los gazapos alopécicos, las lesiones a nivel digestivo variaron desde la ausencia total de ellas a la presencia de grupos de bacterias cocoides en la luz intestinal y focos de enteritis necrótica. En la piel se observó hiperqueratosis ortoqueratótica, atrofia de la dermis, menor densidad de folículos y ausencia de inflamación.

Los resultados microbiológicos quedan reflejados en la **Tabla 1**. En el 100% de los gazapos de 5-7 días analizados (todos ellos con diarrea) y en el 70% de los de 10-18 días que presentaban alopecia, algunos de ellos ya sin diarrea, se aisló únicamente una especie bacteriana en cultivo puro y masivo, tanto a partir de intestino delgado como de ciego, que se identificó bioquímicamente y genéticamente como *E. hirae*. A partir de ese momento se realizó la búsqueda de la misma especie en el resto de muestras. En ninguna de las muestras se detectaron virus ni parásitos.

Tabla 1. Muestras y agentes etiológicos encontrados (muestras positivas/total muestras analizadas)

Tipo de muestra	nº muestra	<i>E. hirae</i>	Rotav.	Coron.	Crypt.
Gazapos de 5-7 días diarreicos	11	11/11 (100%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/11 (0%)
Gazapos de 10-18 días alopécicos	13	9/13 (69,2%)	N.R*	N.R	0/13 (0%)
Digestivo hembra múltipara sin problemas en camada	1	0/1 (0%)	N.R	N.R	0/1 (0%)
Digestivo hembra primípara asintomática con camada afectada	1	1/1 (100%)	N.R	N.R	0/1 (0%)
Hisopo cecal camada no afectada	2	0/2 (0%)	N.R	N.R	0/2 (0%)
Hisopo cecal camada afectada	1	1/1 (100%)	N.R	N.R	0/1 (0%)
Paja (antes de contacto con animales)	1	0/1 (0%)	N.R	N.R	N.R
Heces de pájaros en comederos de madres	6	6/6 (100%)	N.R	N.R	N.R
Hisopo pared nidal con diarrea	3	3/3 (100%)	N.R	N.R	N.R
Hisopo pared nidal no afectado	1	1/1 (100%)	N.R	N.R	N.R
Hisopo nidales limpios y desinfectados	4	0/4 (0%)	N.R	N.R	N.R
Pienso (antes de contacto con animales)	1	0/1	N.R	N.R	N.R
TOTAL	45	32/45 (71,1%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/29 (0%)

*N.R. No realizado; *E. hirae*: Enterococcus hirae; Rotav.: Rotavirus; Coron.: Coronavirus; Crypt.: *Cryptosporidium*

De las 32 muestras positivas a *E. hirae* se obtuvieron un total de 42 aislamientos, todos ellos fenotípicamente idénticos (código numérico 3213551111 Rapid ID 32 Strep). El análisis del 16S rRNA (casi la secuencia completa, con más de 1400 nucleótidos) reveló que los todos los aislamientos eran genotípicamente idénticos, mostrando una similaridad del 100% con la cepa tipo de *E. hirae* (número de acceso AJ301834). El análisis mediante PFGE mostró un único patrón de restricción para todos ellos, lo que indica que todos los aislamientos pertenecen a una única cepa de *E. hirae*, presente en los gazapos afectados, la hembra primeriza asintomática, los nidales que contenían camadas de gazapos afectados y no afectados y las heces de pájaro recogidas en los comederos de las hembras, puesto que la explotación no estaba bien cerrada.

Los enterococos son considerados parte de la flora intestinal de los animales y el hombre y generalmente no se les atribuye un papel patógeno en muestras de origen digestivo (Hardie y Whiley, 1997). Sin embargo, los resultados obtenidos en este caso, en el que se observan lesiones a nivel histológico claramente asociadas al único agente aislado, *E. hirae*, hacen pensar que éste pueda tener un poder patógeno hasta ahora desconocido para la especie cunícula, aunque algunos casos similares han sido descritos en otras especies animales (Jubb *et al.*, 1993). Etheridge *et al.* (1988) describen un caso de diarrea en ratas lactantes y Lapointe *et al.* (2000) de enteropatía con colangitis y pancreatitis en un gato lactante. Otras especies de enterococo estrechamente emparentadas con *E. hirae* como *E. durans* o *E. villorum* también han sido descritas como causantes de procesos entéricos en potros (Tzipori *et al.*, 1984), perros (Collins *et al.*, 1988), terneros (Rogers *et al.*, 1992), pollos (Kondo *et al.*, 1997) y lechones antes del destete (Cheon y Chae, 1996; Vancanneyt *et al.*, 2001). Todos ellos tienen en común que afectan a animales neonatos, al igual que ocurre con los gazapos de este estudio, afectando más severamente a los animales más jóvenes y en ellos se han descrito lesiones similares a las observadas en este caso, con presencia de numerosos cocos Gram positivos adheridos a la superficie del epitelio del intestino delgado con escasa o nula inflamación y predominio de fenómenos vasculares (Jubb *et al.*, 1993). El mecanismo por el cual se produce la diarrea no está claro del todo. Tzipori *et al.* (1984) afirman que la bacteria se une al epitelio mediante estructuras similares a fimbrias, pero en ninguno de los trabajos publicados ha podido demostrarse daño estructural del borde de las vellosidades ni la presencia de toxinas. No obstante, se ha sugerido que la infección puede afectar a la actividad enzimática del epitelio (Cheon y Chae, 1996) sugiriendo así un síndrome de mala absorción, lo que provocaría a su vez la alopecia en los animales afectados durante más tiempo. En casos de colibacilosis en gazapos lactantes se ha descrito alopecia secundaria a mala absorción (Rosell, 2000). La ausencia de *E. hirae* y de lesiones intestinales en algunos gazapos alopecicos indica una posible recuperación de la infección inicial quedando sin embargo las secuelas del proceso. Aunque se ha demostrado que es una única cepa la implicada en este proceso, para poder demostrar su poder patógeno serían necesarios otros estudios que permitiesen reproducir la enfermedad y determinar sus factores de patogenicidad.

El hecho de que sean las camadas de hembras primerizas las más afectadas sugiere que la infección está presente en la explotación y que las primíparas se infectan al entrar en la nave con hembras de varios partos por lo que no tienen tiempo de que su sistema inmune sea capaz de transmitir inmunidad a sus primeros gazapos. Con los resultados obtenidos no ha sido posible demostrar el origen ambiental de la infección puesto que en el pienso y la paja no se aisló *E. hirae* y la desinfección de nidales parece ser efectiva frente a esta bacteria. No obstante, el análisis de única muestra de paja con resultado negativo no excluye necesariamente la posibilidad de que *E. hirae* estuviese presente en ella. La presencia de la misma cepa en las heces de pájaros y en los conejos hace pensar en una posible relación pero serían necesarios análisis más exhaustivos y un análisis epidemiológico más completo para poder afirmarlo.

Referencias Bibliográficas

- Collins J.E., Bergeland M.E., Lindeman C.J., Duimstra J.R. 1988. *Enterococcus (Streptococcus) durans* adherence in the small intestine of a diarrheic pup. *Veterinary Pathology*, 25: 396-398.
- Cheon D.S, Chae C. 1996. Outbreak of diarrhea associated with *Enterococcus durans* in piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8: 123-124.
- Devriese L.A, Vancanneyt M., Descheemaeker P., Baele M., Van Launduyt H.W., Gordts B., Butaye P., Swings J., Haesebrouck F. 2002. Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 821-827.
- Etheridge M.E., Yolken, R.H., Vonderfecht, S.L. 1988. *Enterococcus hirae* implicated as a cause of diarrhea in suckling rats. *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 1741-1744.
- Fernández E., Blume V., Garrido P., Collins M.D., Mateos A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F. 2004. *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* subsp. nov., isolated from mastitis in small ruminants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004: 2291-6.
- Hardie J.M., Whiley R.A. 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology*. Symp. Suppl., 83: 1S-11S.
- Köhler W. 2007. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 297:133-50.
- Kondo H., Abe N., Tsukuda K., Wada, Y. 1997. Adherence of *Enterococcus hirae* to the duodenal epithelium of chicks with diarrhoea. *Avian Pathology*, 26: 189-194

- Jubb K.V.F, Kennedy P.C., Palmer N. 2007. Pathology of Domestic Animals. 5ª edición. Ed. Elsevier.
- Lapointe J.M., Higgins R., Barrette N., Milette S. 2000. *Enterococcus hirae* enteropathy with ascending cholangitis and pancreatitis in a kitten. *Veterinary Pathology*, 37: 282-284.
- Rogers D.G., Zeman D.H., Erickson E.D. 1992. Diarrhea associated with *Enterococcus durans* in calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4: 471-472.
- Rosell J.M. 2000. Enfermedades del conejo. Tomo II. Ed. Mundi Prensa.
- Tzipori S., Hayes J., Sims L., Withers M. 1984. *Enterococcus durans*: unexpected pathogen of foals. *Journal of Infectious Diseases*, 150: 589-593.
- Vancanneyt M., Snauwaert C., Cleenwerck I., Baele M., Descheemaeker P., Goossens H., Pot B., Vandamme P., Swings J., Haesebrouck F., Devriese L.A. 2001. *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 393-400.
- Vela A. I., Goyache J., Tarradas C., Luque I., Mateos A., Moreno M.A., Borge C., Perea J.A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F. 2003. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 2498-2502.
- Vela A. I., García N., Latre M.V., Casamayor A., Sánchez-Porro C., Briones V., Ventosa A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F. 2007. *Aerococcus suis* sp. nov., isolated from clinical specimens from swine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57:1291-1294.
- Villa A., Fernández A., Gracia E. 2002. Abortos por *Coxiella Burnetti* en el Ganado Ovino y Caprino. XXVII Jornadas científicas y VI Jornadas internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia SEOC. Valencia. •