



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster

Importancia de rotavirus tipo A en conejo de cebo: estudio comparativo entre animales con procesos entéricos y animales sanos.

Autor/es

Paula Domingo Tomás

Director/es

Dra. Gema Chacón Pérez

Dr. Ignacio de Blas Giral

Facultad de Veterinaria

Junio 2015

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	
1. Situación del sector cunícola en España	6
2. Fisiología del Aparato Digestivo del conejo	7
3. Enfermedades digestivas	9
- Etiología parasitaria	9
- Etiología bacteriana	11
- Etiología vírica	13
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA	27

RESUMEN

Las enfermedades entéricas tienen un papel importante en cunicultura, causando graves pérdidas económicas debido a la mortalidad, disminución del crecimiento y empeoramiento del índice de conversión. Diversos agentes etiológicos como rotavirus, *Escherichia coli* o coccidios (*Eimeria* spp.) se presentan de forma endémica en las explotaciones, lo que junto con otros factores ambientales o de manejo hacen que los procesos patológicos en conejos de cebo tengan generalmente un origen multifactorial. La infección por rotavirus tipo A suele aparecer en gazapos de 35-50 días y está caracterizada por alta morbilidad y signos clínicos no específicos (diarrea, anorexia, depresión).

El objetivo de este estudio es valorar la importancia de rotavirus tipo A dentro del diagnóstico diferencial de diarreas en conejos de cebo y su posible relación con otros agentes.

Para ello, se analizaron 90 casos de conejos de cebo (entre 35 y 55 días de vida) con sintomatología digestiva y 40 casos sin aparente sintomatología digestiva. Se realizó el cultivo microbiológico de las muestras; se detectó rotavirus tipo A y gen *eae* de *E. coli* mediante PCR a tiempo real (qPCR). *Eimeria* spp. fue detectada mediante análisis coprológico y se valoró la presencia de *Clostridium spiroforme* y *C. perfringens* mediante tinción de Gram a partir de improntas de digestivo.

El 57,8% de las muestras de animales sintomáticos fueron positivas a rotavirus frente al 25% de las muestras de animales asintomáticos ($p=0,001$). La presencia de un solo agente estudiado no superó el 2,2% de las muestras de animales sintomáticos, evidenciando el carácter multifactorial de los procesos entéricos. La presencia de rotavirus tipo A en animales sintomáticos conllevó un aumento significativo de la proporción de otros agentes etiológicos como *Eimeria* spp. y *E. coli* enteropatógeno (EPEC). En conclusión, rotavirus tipo A es un agente implicado en los procesos entéricos de los conejos de cebo siendo necesario incluir su análisis en el diagnóstico diferencial.

Es necesario realizar más estudios para profundizar en el papel patogénico que desarrolla el rotavirus A en procesos entéricos.

ABSTRACT

Enteric diseases produce serious economic losses in cuniculture due to mortality, decreased growth and worsening conversion rate. Various etiological agents such as rotavirus, *Escherichia coli* or coccidium (*Eimeria* spp.) appear endemically in farms, along with other environmental or management factors cause pathological processes in fattening rabbits usually have a multifactorial origin. The rotavirus infection is more frequent in growing rabbits (35 to 50 days old) and is characterised by high rate of morbidity with non-specific clinical signs (diarrhoea, anorexia, depression).

The aim of this study was to assess the importance of rotavirus in the differential diagnosis of diarrhoea in fattening rabbits and the relation with other etiological agents.

Therefore, digestive tract samples of 90 cases with gastrointestinal symptoms and 40 cases without gastrointestinal symptoms in fattening rabbits between 35 and 55 days of age were analyzed. Samples were microbiologically cultured and PCR real time assay (qPCR) was used for the detection of rotavirus and *Escherichia coli eae* gene. *Eimeria* spp. was detected by coprology study and the presence of *Clostridium spiroforme* and *C. perfringens* was assessed by Gram strain.

Rotavirus was detected in 57,8% of cases of symptomatic samples, nevertheless just 25% of healthy samples were positive ($p=0,001$). The presence of a single agent did not exceed 2,2%, demonstrating the multifactorial nature of enteric processes. The presence of rotavirus in sick animals increases the presence of other agents: coccidia and enteropathogenic *E. coli*. To conclude, rotavirus type A is involved in enteric processes in fattening rabbits being necessary to include it in the differential diagnosis.

Further studies are needed to deepen the pathogenic role of rotavirus A in enteric processes.

INTRODUCCIÓN

1. SITUACIÓN DEL SECTOR CUNÍCOLA EN ESPAÑA

La cunicultura, como actividad pecuaria, ha experimentado en los últimos años una importante evolución y ha alcanzado una considerable relevancia y un creciente interés. España constituye uno de los principales productores de carne de conejo a nivel mundial, siendo junto a Italia y Francia parte del grupo líder de países a nivel continental (MAGRAMA, 2014).

La carne de conejo representa el quinto tipo de carne más consumida tras el porcino, aves, vacuno y ovino-caprino. A su vez el conejo también se explota económicamente para la producción de piel y pelo y es utilizado como animal de compañía, de experimentación animal y para la realización de repoblaciones cinegéticas (conejo silvestre) (MAGRAMA, 2014).

La preocupación por una alimentación sana ha supuesto un aumento del consumo de carne de conejo en las sociedades occidentales, aumentando la producción de 1,1 millones de t en 2004 hasta llegar a las 1,8 millones de t en 2012. China es la mayor productora alcanzando las 735.000 t siguiéndole Venezuela (275.000 t). Italia se posiciona en tercer lugar mundial y primer productor en la Unión Europea con 130.000 t, tras ellos se ubica Corea del Norte (149.500 t), Francia (85.500 t), España (62.745 t), Egipto (56.000 t) y finalmente República Checa (11.000 t), Bélgica (10.000 t) y Malta no superando las 4.000 t (MAGRAMA, 2014).

La producción de conejo en España se redujo un 2,8% pasando de 64.578 t en 2012 a 62.754 t en el 2013. La utilización interior total también se redujo mientras que tanto las exportaciones como las importaciones se incrementaron ligeramente. España tiene un grado de autoabastecimiento del 108,9%, permitiendo la exportación de unas 5.000 t anuales dirigidas preferentemente hacia otros países de la Unión Europea como Portugal y Francia. Las importaciones apenas alcanzan las 500 t (MAGRAMA, 2014).

El censo de conejos en España alcanzó en abril de 2014 según los datos del Registro General de Explotaciones Ganaderas (REGA) los 6,2 millones de animales, de los cuales 4,83 millones son animales de cebo y aproximadamente 1 millón son

reproductores. El 24,2% del censo se sitúa en Cataluña, seguida por Galicia con el 19,0% y Castilla y León con el 17,0% (MAGRAMA, 2014).

Desde 2007 el número de explotaciones ha disminuido de 5.195 a 3.315 en 2014, pero el censo ha incrementado un 12,9%. El consumo per capita estatal de carne de conejo alcanza el 1,2 kg/habitante siendo inferior al 1,6 kg/habitante que se consumían en 2007 (MAGRAMA, 2014).

2. FISIOLÓGÍA DEL APARATO DIGESTIVO

El conejo es un animal monogástrico (Dihigo, 2005) que presenta un tubo digestivo que llega a medir aproximadamente 4,5-5 m de longitud en su vida adulta (Rosell, 2000).

El conejo de cebo corresponde a la edad comprendida entre el período de destete y el sacrificio. El destete se lleva a cabo entre los 28 y los 35 días de vida, una vez alcanzados como mínimo los 600 g de peso, y el sacrificio se realiza alrededor de los dos meses, alcanzando pesos vivos medios de 2-2,2 kg (Caravaca *et al.*, 2006).

El aparato digestivo del conejo presenta particularidades estructurales especializadas para la digestión y aprovechamiento de alimentos de naturaleza herbácea o leñosa (Lleonart *et al.*, 1980; Lebas, 1996). En él distinguimos la adaptación a un régimen roedor, la secreción del apéndice cecal, el funcionamiento dual del colon y el ejercicio de la cecotrofia (Lleonart *et al.*, 1980; Dihigo, 2005).

El régimen roedor se caracteriza por la lentitud con la que el conejo ingiere los alimentos. En general ingiere pequeños y frecuentes bolos de alimento mediante la trituración por la acción inicial de los incisivos y posteriormente los molares (Lleonart *et al.*, 1980).

El ciego es el mayor lugar de degradación de nutrientes, de fibra y donde se lleva a cabo la fermentación de los alimentos (Dihigo, 2005). Su pared está constituida por un tejido linfoide (Lebas, 1996) y presenta un pH entre 5,5 y 6,4, según el ritmo nictemeral. La acidificación del medio se debe a la continua liberación de ácidos orgánicos que se producen a consecuencia de las fermentaciones y la ausencia de un sistema tampón eficaz (Lleonart *et al.*, 1980).

La microflora cecal está compuesta por la flora pectinolítica (10^8 a 10^9 ufc/g), la hemicelulolítica y por último la celulolítica (10^6 a 10^7 ufc/g) (Gidenne, 2000). La fermentación llevada a cabo por la microflora cecal a partir de los azúcares y aminoácidos degradados previamente, da como resultado ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y NH_3 . Un 30% de los ácidos grasos de cadena corta se absorben y pasan al metabolismo basal donde constituirán parte de la flora cecal. A diferencia de los rumiantes, los patrones de fermentación son acético (60-80 mmol/100 mol), butírico (8-20 mmol/100 mol) y propiónico (3-1025 mmol/100 mol) (Dihigo, 2005).

El intestino grueso tiene un importante papel en la formación de las heces y la reabsorción de agua, a medida que el contenido avanza a lo largo del intestino grueso se va reduciendo progresivamente la humedad (Lleonart *et al.*, 1980).

La dualidad de las funciones del colon se basa en el momento del día en el cual el contenido pasa por dicho tramo del digestivo y gracias a ello forma dos tipos de heces, las heces duras y los cecotrofos.

Si el contenido cecal se introduce en el colon durante las primeras horas de la mañana, este sufre pocas transformaciones bioquímicas (Lebas, 1996). Las bolas formadas por el efecto de las contracciones cólicas se envolverán con el moco segregado por las glándulas mucíparas de la mucosa de la pared del colon (Lleonart *et al.*, 1980; Lebas, 1996). Dichas bolas se encuentran agrupadas en racimos alargados, llamados cecotrofos (Rosell, 2000). Por otro lado, si el contenido cecal se introduce en el colon en cualquier otro momento de la jornada, sufrirá otras modificaciones. Es decir, en el colon se observan sucesivas contracciones en sentido alterno, unas tienden a evacuar el contenido con normalidad y progresivamente hacia el recto, mientras que otras tienden a empujarlo hacia el ciego (Lebas, 1996; Rosell, 2000). Debido a la diferencia de potencia y velocidad de desplazamiento de las contracciones, el contenido más líquido es redirigido hacia el ciego, mientras que la parte más sólida se agrupa en partículas más grandes y duras para ser evacuadas (Rosell, 2000). Finalmente las heces duras son evacuadas en la cama, mientras que los cecotrofos son recuperados por el animal en el momento en el que salen del ano (Faure, 1963).

La composición química de los cecotrofos difiere de la composición química de las heces duras: los cecotrofos tienen el 27,1% de materia seca y el 29,5% de proteína,

mientras que las heces duras presentan el 58,3% de materia seca y el 13,1% de proteína (Proto, 1980).

De este modo, la cecotrofia le permite al conejo incorporar proteína microbiana, de elevado valor biológico, y vitaminas hidrosolubles principalmente producidas en el ciego (Dihigo, 2005). En un conejo sano y con una alimentación completa y equilibrada, la cecotrofia aporta del 15 al 25% de las proteínas ingeridas diariamente y la totalidad de las vitaminas B y C (Gidenne *et al.*, 1987; Lebas 1989).

Las particularidades del aparato digestivo del conejo descritas anteriormente (el régimen roedor, la secreción del apéndice cecal, la función dual del colon y la cecotrofia) hacen que se trate de un sistema muy complejo. Esta complejidad conlleva a ser un aparato digestivo más susceptible a desequilibrios y se altere con más frecuencia que en otras especies (Dihigo, 2005).

3. ENFERMEDADES DIGESTIVAS

Las enfermedades entéricas tienen un papel importante en cunicultura, causando graves pérdidas económicas debido a la mortalidad, disminución del crecimiento y empeoramiento del índice de conversión (Schoeb *et al.*, 1986).

Diversos agentes etiológicos como rotavirus, *E. coli* o coccidios (*Eimeria* spp.) se presentan de forma endémica en las explotaciones cunícolas, lo que junto con otros factores ambientales o de manejo hacen que los procesos patológicos en conejos de cebo tengan generalmente un origen multifactorial (Rosell, 2000; Cerioli *et al.*, 2004).

3.1. Etiología parasitaria

Los principales endoparásitos que afectan al tracto digestivo en conejos de cebo son *Passalurus ambiguus* y *Eimeria* spp. (Rosell, 2000).

Passalurus ambiguus es un helminto perteneciente a la familia de los oxiuros intestinales que habita en el ciego y el colon de los conejos domésticos, conejos salvajes y liebres (Boucher, 1996; Hendrix, 1999). La infección se produce por la ingesta de huevos eliminados junto a las heces que contaminan alimentos, agua, suelo, etc. Por ello

la autoinfección del hospedador se asegura con la práctica de la cecotrofia (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Las larvas de *P. ambiguus* invaden la mucosa del ciego, provocando irritación del intestino grueso, incluido el ano. Dicha invasión favorece que se produzcan infecciones concomitantes por otros parásitos, como *Eimeria* spp. o *Cryptosporidium parvum*, y/o bacterias como *E. coli* (Rosell, 2000). La sintomatología está relacionada con la edad y la cantidad de oxiuros presentes. Raramente causa mortalidad, pero en infecciones intensas suele provocar anorexia, adelgazamiento, prurito anal e incluso disminución del índice de conversión y el rendimiento reproductivo (Lleonart, 1996; Vázquez *et al.*, 2006).

Los protozoos que infectan el tracto gastrointestinal de los conejos son coccidios del género *Eimeria*. Se han descrito hasta 25 especies de coccidios en el conejo, aunque en la actualidad solo se aceptan once: *E. coecicola*, *E. exigua*, *E. perdorans*, *E. vej dovskiyi*, *E. media*, *E. magna*, *E. irresidua*, *E. piriformis*, *E. stiedai*, *E. intestinalis* y *E. flavescens* (Coudert *et al.*, 1995).

De las once especies aceptadas, todas infectan el intestino y producen coccidiosis intestinal a excepción de *E. stiedai* que afecta a los conductos biliares intrahepáticos (Hendrix, 1999).

Los coccidios de género *Eimeria* presentan gran patogenicidad en conejos (Licois *et al.*, 1982; Coudert *et al.*, 1989; Ceré *et al.*, 1996) por lo que se consideran un problema importante ya que causan grandes pérdidas económicas (Singla *et al.*, 2000; Pakandl, 2009).

El ciclo de vida de *Eimeria* spp. es directo (Sürsal *et al.*, 2014). Son monoxenas (solo tienen un hospedador por ciclo parasitario) (Rosell, 2000), parásitos intracelulares obligados que invaden los enterocitos y tienen bastante especificidad con relación a su hospedador (Rose *et al.*, 1992). Es raro encontrarnos con infecciones de una sola especie de *Eimeria* (Mehlhorn, 2006). Los ooquistes son eliminados con las heces, una vez en el exterior esporulan para poder ser infectantes. El hospedador se infecta al ingerir los ooquistes esporulados. En su interior llegan al intestino donde producirán la gametogonia, fase sexual, que terminará con la formación de los ooquistes los cuales se

eliminarán de nuevo por las heces y volverá a empezar el ciclo (Rosell, 2000; Sürsal *et al.*, 2014).

Hacia el décimo día post infección se observa falta de absorción de sodio en las zonas donde el parásito lleva a cabo la multiplicación. Dichas pérdidas se compensan con el mecanismo de intercambio de iones Na-K de la zona distal del tracto digestivo (colon). Las pérdidas de potasio darán lugar a una grave hipokalemia que puede llegar a desencadenar la muerte del animal (Rosell, 2000).

Los síntomas típicos de la enfermedad son la diarrea y la deshidratación, que puede incluso llegar a desencadenar una septicemia secundaria y finalmente la muerte (Vitovec *et al.*, 1989).

La coprología es el método de elección para el diagnóstico de la coccidiosis. Tenemos que tener en cuenta la corta duración de la fase de excreción de ooquistes, ya que un animal enfermo después de 3 o 4 días ya no excreta gran cantidad de ooquistes. Por ello debe hacerse a partir de varias muestras de heces (Coudert *et al.*, 1995). Es importante realizar un examen cuantitativo para determinar si es necesario aplicar profilaxis médica. El límite se halla en 4.000-5.000 ooquistes/g, a partir del cual se observa una disminución del rendimiento y un riesgo de complicaciones infecciosas (Coudert, 2000).

Cryptosporidium spp. aunque parasita al menos a 260 especies de animales vertebrados no es considerado un patógeno importante en cunicultura, a excepción de su presencia en gazapos lactantes (Rosell, 2000; Fayer, 2010). En los gazapos destetados puede provocar enteritis subclínica, transcurriendo la enfermedad sin signos clínicos obvios, únicamente con empeoramiento del índice de conversión, una discreta diarrea y disminución del crecimiento (Rosell, 2000).

3.2. Etiología bacteriana

El principal patógeno entérico que da lugar a mayor morbilidad y mortalidad en conejos destetados es *E. coli* (Blanco *et al.*, 1996).

Escherichia coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae, caracterizada por ser una bacteria Gram-negativa de forma bacilar con un tamaño de 0.4-0.6 x 2-3 μm ,

anaerobia facultativa y fermentadora. Forma parte de la flora intestinal del aparato digestivo de los mamíferos y es excretada a través de las heces, donde puede sobrevivir, al igual que en partículas de polvo y agua durante semanas e incluso meses (Markey *et al.*, 2013).

En la especie cunícola, la virulencia de *E. coli* parece estar asociada con la capacidad que tiene la bacteria para adherirse a las células epiteliales de la pared intestinal y colonizar el tracto digestivo eliminando las microvellosidades. Se ha identificado el gen cromosómico (gen *eae*) que codifica la intimina, proteína necesaria para desarrollar las funciones de adhesión y eliminación. Las cepas gen *eae* positivas se clasifican como cepas de *E. coli* enteropatógenas (EPEC). Las cepas de *E. coli* también pueden caracterizarse en función de sus patrones de fermentación de azúcares (Blanco *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 2011) o en función de su serotipo (clasificación de un microorganismo según los antígenos que presentan en la superficie celular). Las cepas pertenecientes a los serotipos O15:K2:H2, O26:K2:H11 y O103:K2:H2 son altamente patógenas para los conejos destetados, pudiendo llegar a causar una mortalidad del 50% o mayor (Blanco *et al.*, 1996).

La colibacilosis afecta principalmente a animales lactantes y animales destetados entre las 4 y 7 semanas de vida dependiendo de los serotipos infectantes (Rosell, 2000). Se asocia con la colonización y proliferación de EPEC en la zona distal del íleon, en el ciego y el colon proximal, siendo las cepas más virulentas capaces de causar la muerte en pocos días. Caracterizándose por una severa diarrea la cual desencadena una importante deshidratación (Licois *et al.*, 1992). En la necropsia se aprecia el contenido cecal totalmente líquido, a veces incluso hemorrágico, y el epitelio congestivo (Maertens *et al.*, 2006).

Otra causa bacteriana que puede llevar a una elevada mortalidad en cebo es la enterotoxemia producida por *Clostridium* spp., debido a una disbiosis de la microflora normal del ciego. *Clostridium* spp. son bacterias Gram-positivas con un tamaño aproximado de 0,3-1,3 x 3-10 µm, anaerobias, productoras de esporas. Todas las especies patógenas presentan forma de varilla mientras que *C. spiroforme* tiene forma curva o espiral. La mayoría de las especies patógenas producen una o más exotoxinas dependiendo de su patogenicidad (Quinn. *et al.*, 1994; Markey *et al.*, 2013).

Las especies de *Clostridium* que producen enterotoxemias son *C. perfringens* tipo A-E, *C. difficile*, *C. colinum* y *C. spiroforme*. Las enterotoxinas se forman en el intestino y pasan al torrente sanguíneo produciendo una toxemia generalizada (Markey *et al.*, 2013).

Clostridium spiroforme afecta principalmente a gazapos recién destetados y se asocia al uso abusivo de antibióticos. El cuadro clínico característico es postración, disminución del crecimiento y diarrea acuosa. Además su presencia suele complicar los cuadros producidos por EPEC (Rosell, 2000).

3.3. Etiología vírica

Hasta el momento hay pocos estudios sobre la implicación de virus entéricos en procesos digestivos en conejos, siendo de gran importancia en otras especies domésticas como porcino o bovino. El agente viral más descrito en cunicultura causante de cuadros digestivos es el rotavirus. Los rotavirus, perteneciente a la familia Reoviridae, están compuestos por un genoma segmentado de doble cadena de RNA, envuelto en tres capas de proteínas (Kapikian *et al.*, 2001). La proteína VP6 conforma la cápside interna, y por sus características antigénicas, se clasifica en grupos de la A-G y subgrupos (SG) I, II, I y II, no I y no II, detectándose con mayor frecuencia los grupos de la A a la C con el subgrupo I en los animales (Cardoso *et al.*, 2000).

El rotavirus tipo A es considerado una de las principales causas de gastroenteritis virales agudas en conejos (Kapikian *et al.*, 2001). La infección por rotavirus tipo A es más frecuente en conejos en crecimiento (35 a 50 días de edad) y está caracterizada por una alta tasa de morbilidad, con signos clínicos no específicos (diarrea, anorexia y depresión) (Lavazza *et al.*, 2008). Al tratarse de un virus aerógeno y endémico de las explotaciones cunícolas, los principales problemas por rotavirus ocurren cuando la densidad de los animales no es la adecuada, la ventilación es insuficiente y la temperatura es inferior a 12 °C (Rosell, 2000).

Sin embargo, a pesar de que su presencia es endémica en las explotaciones cunícolas, hay pocas referencias sobre su patogenicidad en conejos.

Otro virus descrito en conejos son los coronavirus. Los coronavirus presentan dos cuadros clínicos en conejos: la forma sistémica (conocida como efusión pleural y

cardiomiopatía) y la forma gastroentérica. En Europa solo se ha descrito la forma entérica en una granja alemana. También se ha descrito algún caso de coronavirus en conejos en Canadá y EEUU. El complicado y costoso diagnóstico por microscopía electrónica dificulta determinar con exactitud la importancia de coronavirus en los procesos entéricos cunicultura (Rosell, 2000; Ceroli *et al.*, 2006).

Se ha descrito la infección por parvovirus en conejos. Sin embargo, carece de importancia en cunicultura debido a su escasa patogenicidad y prevalencia tanto en animales sanos como enfermos (Ceroli *et al.*, 2006). Un estudio realizado en Bélgica y Holanda para determinar la prevalencia de parvovirus en conejos con diarrea constató la baja amenaza que supone el virus para la especie cunícola, ya que únicamente el 0,3% de los animales testados fueron positivos (Rosell, 2000).

Otros virus aislados ocasionalmente en heces de conejos con diarreas son adenovirus, astrovirus y calicivirus. Hasta el momento, nunca se han aislado reovirus ni enterovirus en conejos (Ceroli *et al.*, 2006).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las enfermedades entéricas tienen un papel importante en cunicultura, ya que causan graves pérdidas económicas debido a la mortalidad, la disminución del crecimiento y el empeoramiento del índice de conversión.

Los procesos entéricos en conejos de cebo presentan generalmente un origen multifactorial en el que influyen factores ambientales, de manejo, propios del individuo y la persistencia de agentes etiológicos como rotavirus, *E. coli* o coccidios (*Eimeria* spp.) de forma endémica en las explotaciones.

Hasta el momento hay pocos estudios sobre la implicación virus entéricos en procesos digestivos en conejos de cebo. Junto a los muchos problemas digestivos que se diagnostican los cuales aún tratándolos no se llegan a solucionar, y el carácter multifactorial de la patología, nos ha llevado a plantearnos la hipótesis de que puede estar implicado algún otro agente causal infradiagnosticado.

De este modo, el objetivo principal que se pretenden alcanzar con el estudio es valorar la importancia de rotavirus tipo A dentro del diagnóstico diferencial de diarreas en conejos de cebo y su posible relación con otros agentes.

Como objetivos específicos nos planteamos los siguientes:

- Determinar la presencia de rotavirus tipo A asociada a procesos entéricos causantes de diarrea en conejo de cebo y estimar la prevalencia de infección a partir de muestras en *pool*.
- Estudiar la posible relación entre rotavirus tipo A con otros agentes causales parasitarios e infecciosos y su implicación en problemas digestivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

RECOGIDA DE MUESTRAS

Para llevar a cabo el estudio se procesaron 90 casos de conejos de cebo con sintomatología digestiva y 40 casos de conejos de cebo sin aparentemente sintomatología digestiva entre 35 y 55 días de vida. Diferenciamos animales sintomáticos con cuadros de diarrea frente a animales asintomáticos sin presencia de la misma. Cada caso comprendía de muestras del tracto digestivo de 1 a 6 animales de una misma explotación, y fueron analizadas de forma conjunta (*pool*).

Los casos de animales sintomáticos se seleccionaron a partir de los casos clínicos que llegaron al laboratorio con sintomatología diarreica, mientras que los casos de animales asintomáticos fueron remitidos por veterinarios de campo procedentes de animales recién sacrificados sin presencia de diarrea. La mayoría de las muestras se tomaron entre mayo y octubre de 2014, y procedieron de explotaciones de toda España. En el laboratorio se procedió a la necropsia de los animales y toma de muestras.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Se realizó un diagnóstico completo que incluyó estudio microbiológico, parasitario y detección de rotavirus tipo A por qPCR de las muestras en *pool*.

Como causas parasitarias hemos incluido en el estudio la presencia de protozoarios y nematodos digestivos. La detección de protozoarios (*Eimeria* spp.) y/o nematodos digestivos (*P. ambiguus*) se realizó mediante coprología por el método de flotación en sulfato de zinc. Consideramos que la concentración debía ser superior a 5.000 ooquistes/g para poder llegar a ser causante de diarreas, disminución del rendimiento y/o riesgo de complicaciones infecciosas (Coudert *et al.*, 2000).

En cuanto a las causas bacteriológicas estudiamos la presencia de *E. coli*, EPEC, *C. spiroforme* y *C. perfringens*.

El aislamiento de *E. coli* se realizó cultivando microbiológicamente las muestras en medios selectivos (Agar Sangre, Agar MacConkey y Agar XLD) y posteriormente las placas sembradas se incubaron en una estufa a 37 °C durante 24-48 h. También se

estudió el número de cepas de *E. coli* implicadas en cada caso mediante la caracterización de los aislamientos en función de la cinética de las reacciones bioquímicas que se producen con la fermentación de los diferentes azúcares (Fernández *et al.*, 2011).

A su vez se determinó la presencia del factor de virulencia gen *eae* mediante la técnica de qPCR para valorar la presencia de cepas enteropatógenas (EPEC) (Blanco *et al.*, 1996).

Para valorar la presencia de *C. spiroforme* y *C. perfringens* se realizó la tinción de Gram de improntas de intestino delgado y ciego. Se llevó a cabo un estudio semicuantitativo mediante la observación a microscopio óptico, donde se tomaron como significativos aquellas muestras con una elevada carga de *Clostridium* spp.

La identificación de rotavirus tipo A fue realizada mediante qPCR (límite inferior de detección de 50 copias/reacción). El punto de corte para considerar una muestra positiva es un valor de Cq (nº de ciclo de amplificación) menor o igual a 38.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y EPIDEMIOLÓGICO

Las variables cualitativas se describieron como proporciones y la asociación de dos variables cualitativas se contrastó con la prueba de Chi-cuadrado de Pearson analizando las tablas de contingencia.

Para calcular las prevalencias estimadas a partir de muestras combinadas (*pool* de muestras) y sus intervalos de confianza se utilizaron las fórmulas propuestas por Hauck en 1991 (Muniesa *et al.*, 2014) usando la calculadora epidemiológica de Ausvet (<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=PPVariablePoolsize>).

Las variables cuantitativas (ej, Cq) se describieron usando la media y la desviación estándar (s). Para comparar medias se utilizó ANOVA (previa comprobación de la normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov).

Una correcta estimación de la pérdida de sensibilidad al analizar en *pool* permitirá estimar de forma más precisa el tamaño de muestra necesario, y en

consecuencia garantizar la eficacia de los programas de vigilancia epidemiológica que utilizan esta estrategia (Muniesa *et al.*, 2014).

Los programas IBM SPSS 19.0 y Microsoft Excel 2010 fueron las herramientas utilizadas para realizar los cálculos estadísticos. El nivel de significación se estableció en 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la Tabla 1, se detectó rotavirus tipo A en el 57,8% de los casos de animales sintomáticos. Nuestros resultados son superiores a los encontrados por Cerioli *et al.* en 2008, dónde analizaron 243 muestras entre 2002 y 2007 mediante microscopía electrónica encontrando un 16% de muestras positivas a rotavirus tipo A. Sin embargo estos resultados no son comparables ya que en el estudio de Cerioli se trataba de muestras individuales. En apartados posteriores discutiremos con más detalle estos resultados.

En cuanto a los animales asintomáticos, únicamente el 25% de los casos fueron positivos a rotavirus tipo A. Este resultado apoya la hipótesis de que rotavirus tipo A es un agente implicado en las diarreas de cebo, ya que la frecuencia de aislamiento en animales con diarrea fue significativamente superior que en animales sin sintomatología ($p=0,001$).

Tabla 1. Frecuencia de casos positivos a los agentes etiológicos analizados.

	Sintomáticos		Asintomáticos		P
	Casos	%	Casos	%	
Rotavirus tipo A	52	57,8%	10	25,0%	0,001
<i>E. coli</i>	74	82,2%	23	57,5%	0,003
EPEC ¹	20	22,2%	0	0,0%	nc
<i>E. coli</i> con gen <i>eae</i>	28	31,1%	0	0,0%	nc
<i>C. spiroforme</i>	37	41,1%	0	0,0%	nc
Coccidios ²	21	23,3%	3	7,5%	0,004

¹ Cepa mayoritaria EPEC; ² >5.000 ooquistes/g; nc: no calculable.

Escherichia coli se aisló en el 82,2% de los casos de animales con presencia de diarrea (Tabla 1). Debido a que *E. coli* forma parte de la flora intestinal del conejo, su aislamiento no implica obligatoriamente que sea la causa de diarrea, por ello se analizó

la presencia de gen *eae*. El 31,1% de los casos eran gen *eae* positivo, es decir, portadores de *E. coli* enteropatógeno (EPEC) con capacidad para adherirse al epitelio y producir la diarrea (Blanco *et al.*, 1996). Al estudiar la diversidad de cepas presentes en cada caso solo el 22.2% presentaba una cepa mayoritaria EPEC, que sugiere la presencia de una cepa virulenta que ha proliferado dando lugar al proceso de colibacilosis.

Por otra parte, en el 57,5% de los casos asintomáticos se aisló *E. coli* siendo todos negativos al gen *eae* (Tabla 1). A pesar de que la detección de *E. coli* fue significativamente inferior ($p=0,003$) en casos de animales sin sintomatología respecto a casos de animales sintomáticos, es necesaria la detección del gen *eae*. Se pudo constatar que no se encontró cepas EPEC en animales asintomáticos y por tanto este análisis aporta información de gran valor al evaluar la patogenicidad de las cepas de *E. coli* aisladas y su implicación en el proceso digestivo (Blanco *et al.*, 1996).

No se observó presencia de *C. spiroforme* en concentraciones significativas en ninguno de los casos de animales asintomáticos, contrastando con el 41% presente en casos de animales con diarrea. De este modo, se confirmó la implicación de este agente en las diarreas en conejo de cebo. No encontrar *C. spiroforme* en casos de animales sin diarrea no implica que la explotación sea libre, sino que la aparición de síntomas está asociada a la proliferación de este agente.

En algunos casos tanto de animales con presencia o ausencia de diarrea se ha detectado *C. perfringens*, pero las concentraciones en las que se ha detectado no se consideran significativas como para causar un cuadro entérico en conejo de cebo.

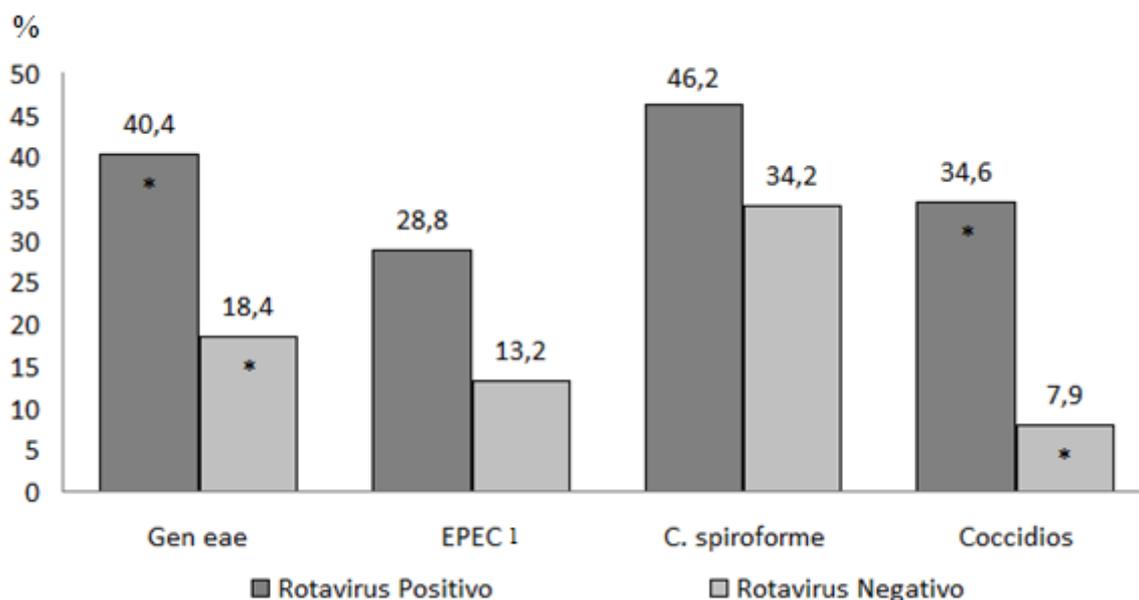
La diferencia en la presencia de coccidios entre casos de animales sintomáticos y asintomáticos resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,004$) (Tabla 1). De este modo, se corrobora la capacidad patógena que tienen los coccidios en el conejo de cebo, debido al poder de multiplicación y la creación de resistencias de los coccidios frente a los coccidiostáticos (Rosell, 2000).

Passalurus ambiguus no se detectó ni en animales enfermos ni en animales con ausencia de diarrea tal y como esperábamos, ya que *P. ambiguus* es un nemátodo poco patógeno y preferentemente parasita a animales adultos (Hendrix, 1999).

Al analizar de forma conjunta todos los agentes, se observó que en el 97,8% de los casos de animales sintomáticos se identificaron dos o más agentes, evidenciando el carácter multifactorial de los procesos entéricos en conejo de cebo.

En los casos correspondientes a animales con sintomatología digestiva la presencia de rotavirus tipo A estuvo asociada con un incremento significativo en la presencia de coccidios ($p=0,012$) y de *E. coli* gen *eae* positivo ($p=0,026$) (Figura 1 y Tabla 2). Como se observa en la Figura 1, también hay un incremento la presencia de una cepa mayoritaria EPEC y *C. spiroforme* cuando rotavirus tipo A es positivo, en cambio no llegan a ser diferencias significativas (cepa mayoritaria EPEC tiene un valor $p=0,077$ y *C. spiroforme* un valor $p=0,344$). Lo que nos hace sospechar que el tamaño de N no es lo suficientemente grande como para poder hacer esta comparativa.

Figura 1. Asociación entre rotavirus y otros agentes enteropatógenos.



¹ Cepa mayoritaria EPEC; * Diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p<0,05$)

En los casos de animales asintomáticos no se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia de rotavirus tipo A con la frecuencia de otros agentes analizados (Tabla 2).

Teniendo en cuenta que las frecuencias de coinfección con rotavirus en casos sintomáticos son medias-altas, y que no hemos observado coinfecciones en casos asintomáticos, sería indicativo de la importancia que presenta rotavirus tipo A en los procesos digestivos de conejos de cebo dentro del cuadro multifactorial.

Tabla 2. Frecuencia de detección de agentes entéricos según la presencia de rotavirus tipo A, en casos sintomáticos y asintomáticos

Rotavirus	Sintomáticos			Asintomáticos		
	Positivo	Negativo	P	Positivo	Negativo	P
<i>E. coli</i> con gen <i>eae</i>	40,4%	18,4%	0,026	0,0%	0,0%	nc
EPEC ¹	28,8%	13,2%	0,077	0,0%	0,0%	nc
<i>C. spiroforme</i>	46,2%	34,2%	0,344	0,0%	0,0%	nc
Coccidios ²	34,6%	7,9%	0,012	0,0%	10,0%	0,298

¹ Cepa mayoritaria EPEC; ² >5.000 ooquistes/g; nc: no calculable.

En la Tabla 3 se muestran las prevalencias aparentes calculadas a partir de los resultados de los *pools* correspondientes a cada caso, que comprenden de 1 a 6 muestras cada uno. Los resultados anteriormente descritos nos pueden inducir a confusión, ya que se debe distinguir entre la prevalencia estimada (proporción de animales donde se detectaría un agente causal) y la frecuencia de casos positivos (formados entre 1 y 6 muestras individuales), por lo que encontramos resultados diferentes y no comparables entre sí.

Por ejemplo, rotavirus tipo A tiene una prevalencia aparente del 23,7% (Tabla 3) si se analizasen de forma individual (por muestra), mientras que si analizamos en *pool* (por caso) ascendía al 57,8%. Esto es debido a que al haberse analizado en *pool*, no todas las muestras podrían estar infectadas, quizás de un caso con 5 muestras únicamente una de ellas podría estar infectada y ya daríamos el caso como positivo. Las prevalencias al analizar de forma individual cada *pool* es un resultado estimado, y no sabemos con exactitud los resultados que hubiésemos obtenido si se hubiesen analizado de forma individual. Además la prevalencia real puede ser superior a la prevalencia

aparente calculada ya que al procesar las muestras de forma conjunta se produce un efecto dilución que puede conllevar una reducción de la sensibilidad diagnóstica (y por tanto la existencia de falsos negativos).

Al analizar los resultados con este enfoque se aprecia que las prevalencias aparentes son significativamente superiores para todos los agentes analizados al comparar las muestras procedentes de casos sintomáticos con las procedentes de casos asintomáticos.

Tabla 3. Prevalencias aparentes de los agentes etiológicos analizados estratificando según clínica observada.

	Sintomáticos		Asintomáticos		P
	Prev	IC95%	Prev	IC95%	
Rotavirus tipo A	23,7%	(18,3%, 29,8%)	12,5%	(6,5%, 20,9%)	0,033
<i>E. coli</i> con gen <i>eae</i>	11,3%	(7,7%, 15,7%)	0,0%	(0,0%, 100,0%)	<0,001
<i>C. spiroforme</i>	14,9%	(10,8%, 19,76%)	0,0%	(0,0%, 100,0%)	<0,001
Coccidios ¹	8,1%	(5,1%, 11,8%)	3,5%	(0,9%, 9,1%)	0,020

¹ >5.000 ooquistes/g

En cuanto al efecto dilución antes citado, hemos realizado un análisis estadístico adicional para los rotavirus tipo A considerando el efecto del tamaño de *pool* en la prevalencia aparente. En la Tabla 4 se observa una pérdida en la sensibilidad diagnóstico a medida que vamos diluyendo la muestra en el caso de animales sintomáticos. A partir de un *pool* constituido por 4 muestras, se presentan diferencias significativas ($p < 0,001$) en la prevalencia aparente frente la estimada a partir de un *pool* de 3 muestras. A pesar de que pueden existir diferencias en las prevalencias reales en las poblaciones de las que proceden las muestras utilizadas en el estudio, los resultados obtenidos permiten sospechar de forma fundamentada que a partir de un *pool* con 3 muestras disminuiría de forma significativa la sensibilidad de la técnica de diagnóstico. Sin embargo en los casos asintomáticos no se registra ningún cambio significativo.

Tabla 4. Prevalencia aparente de rotavirus tipo A según el tamaño de pool utilizado.

Pool	Sintomáticos			Asintomáticos		
	Prev	IC95%	P*	Prev	IC95%	P*
1	16,7%	(0,9%, 53,4%)	-	33,3%	(9,0%, 61,3%)	-
2	42,3%	(24,6%, 55,8%)	0,220	11,5%	(4,2%, 22,9%)	0,080
3	37,0%	(23,2%, 47,4%)	0,518	20,6%	(3,2%, 39,7%)	0,583
4	13,1%	(6,2%, 21,2%)	<0,001	0,0%	(1,2%, 22,1%)	0,224
5	11,6%	(4,5%, 20,3%)	0,888	0,0%	(1,0%, 18,1%)	nc

* Comparación de cada prevalencia con la de la fila superior (*pool*-1); nc: no calculable

Retomando los resultados del trabajo de Cerioli *et al.* (2008), observamos que la prevalencia de rotavirus tipo A (16%) es muy similar a las que hemos calculado en nuestro estudio a partir de muestras individuales (16,7%) (Tabla 4) y ligeramente inferior a la que hemos obtenido al calcularla de forma global (23,7%) (Tabla 3).

En casos clínicos con sintomatología digestiva no influye tanto trabajar con *pools* de muestras. La carga de infección y la prevalencia son más altas y por ello hay mayor probabilidad de detectar el agente causal. Aunque trabajando con *pool* no sabemos la proporción de muestras infectadas y la carga de cada una.

En caso de estudio de presencia de agentes infecciosos en explotaciones sin sintomatología, la pérdida de sensibilidad es más crítica y debería tenerse en cuenta la toma de muestras, ya que si un *pool* procedente de animales asintomáticos ha salido negativo al diagnóstico de cualquier agente causal, no implica que el agente causal no esté en la explotación, podría darse el caso de haber muy poca carga infecciosa (por ejemplo un único animal infectado dentro del *pool*) y no llegarse a detectar.

Debido a la heterogeneidad en la procedencia de las muestras no se ha podido hacer una estimación de la sensibilidad relativa en función del tamaño del *pool*. Sería interesante plantear un diseño experimental donde se trabajase con muestras individuales procedentes de poblaciones con diferentes prevalencias.

Para futuros estudios, sería necesario realizar el estudio histopatológico de las lesiones para valorar la importancia de rotavirus como agente primario de las diarreas en conejos.

CONCLUSIONES

En base a las condiciones de nuestro estudio hemos establecido las siguientes conclusiones:

PRIMERA: Existen fundadas sospechas de que la presencia de rotavirus tipo A se localiza de forma endémica en las explotaciones cunícolas españolas ya que ha sido detectado frecuentemente tanto en casos sintomáticos como asintomáticos.

SEGUNDA: Los rotavirus tipo A desempeñan un papel relevante en la etiología de procesos entéricos en conejos ya que la presencia de rotavirus tipo A ha sido significativamente mayor en casos con procesos digestivos que en casos asintomáticos, por lo que es importante incluir el análisis de rotavirus tipo A dentro del diagnóstico diferencial de procesos digestivos en animales de cebo.

TERCERA: Los procesos entéricos en conejos de cebo tienen un marcado carácter multifactorial, donde la presencia de rotavirus tipo A en animales con diarrea conlleva un aumento de la proporción de otros agentes causantes de procesos digestivos, tales como coccidios y cepas de *E. coli* enteropatógenas.

CUARTA: El gen *eae* es un buen indicador de la virulencia del *E. coli*, ya que en casos asintomáticos donde se ha detectado *E. coli* no se ha detectado el gen *eae*, mientras que en los casos sintomáticos la frecuencia de detección del gen *eae* fue del 31,1%.

QUINTA: Para poder comparar los resultados obtenidos en diferentes estudios se deben estimar las prevalencias considerando el tamaño del *pool* valorando además la posible pérdida de sensibilidad asociada a este tipo de procedimiento diagnóstico.

BIBLIOGRAFÍA

- Blanco J.E., Blanco M., Blanco J., Mora A., Balaguer L., Mourin M., Juarez A., Wim H.J. 1996. O serogroups, biotypes and eae genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *Journal of clinical microbiology*, 34(12):3101-3107.
- Boucher S., Nouaille L. 1996. *Maladies des Lapins*. Éditions France Agricole.
- Caravaca F., González P. 2006. *Sistemas de Producción animal*, 30:379-393.
- Cardoso D.D., Soares C.M., Azevedo M.S., Leite J.P., Munford V., Rácz M.L. 2000. Serotypes and subgroups of rotavirus isolated from children in Central Brazil. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 18:39-43.
- Céré N., Humbert J.F., Licois D., Corvione M., Afanassieff M., Chanteloup N. 1996 A new approach for the identification and the diagnosis of *Eimeria media* parasite of the rabbit. *Experimental Parasitology*, 82:132–138.
- Cerioli M., Cordioli P., Palotta C., Lavazza A. 2004. Survey on enteric viruses identified in diarrhoeic rabbits. Project COST 848: *Workshop Pathology and Nutrition*, Spain, 26.
- Cerioli M., Lavazza A. 2006. Viral enteritis in Rabbits. En: Maertens L., Codert P. *Recent advances in rabbit Sciences*. Editorial Ilvo Publishers, Belgium.
- Cordero del Campillo M., Rojo F., Meana A. 1999. *Parasitología veterinaria. Parte VII: Parasitosis del conejo*. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid, pp. 742-743.
- Coudert P. 1989. Some peculiarities of rabbit coccidiosis. *Coccidia and intestinal coccidiomorphs, proceedings of the fifth international coccidiosis conference*. France, pp. 17-20.
- Coudert P., Licois D., Drouet-Viard F. 1995. *Eimeria* and Isospora. *Eimeria* species and strains of rabbits. *Biotechnology. Guideline on techniques in coccidiosis*

- research. Office for Official Publications of the European Communities. Luxembourg, pp. 52-73.
- Coudert P, Licois D., Drouet-Viard F., Provôt F. 2000. Coccidiosis. *En: Enfermedades del conejo*. Tomo II. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, Barcelona, México, pp. 219-234.
- Dihigo L.E. 2005. Avance en los estudios de fisiología digestiva del conejo en Cuba con el uso de fuentes de alimentos no tradicionales. Consideraciones fisiológicas. La Habana. Disponible en:
http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/encuentros/viii_encuentro/luise.htm
- Faure J. 1963. Le sommeil “paradoxal” du lapin ans ses aspects anatomo-fonctionnels et les hormonaux. Colloque intern du CNRS. Lyon, 127:241-283.
- Fayer, R. 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 124:90–97.
- Fernández A., Chacon G., Baselga R. 2011. Utilización del sistema Pheneplate para la caracterización de cepas de *Escherichia coli* y el diseño de autovacunas en conejos. *XXVI Symposium de Cunicultura de ASESCU*. Peñíscola, España, pp. 151-155.
- Gidenne T., Lebas F. 1987. Estimation quantitative de la caecotrophie chez le lapin en croissance: variations en donctions de l’âge. *Annales de Zootechnie*, 36:225-236.
- Gidenne T. 2000. Recent advance in Rabbit nutrition: emphasis on fibre requirements. *World Rabbit Science*, 8:23-32.
- Hendrix C.M. 1999. Diagnóstico parasitológico veterinario. Segunda edición. Harcourt Brace, Madrid, España.
- Kapikian A.Z., Hoshino Y., Chanoc R.M. 2001. *Virology*. 4th ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, USA.

- Lavazza A., Cerioli M., Martella V., Tittarelli C., Grilli G., Brivio R., Buonavoglia C. 2008. Rotavirus in diarrheic rabbits: Prevalence and characterization of strains in Italian farms. *9th World Rabbit Congress*. Verona, Italia, pp. 993-998.
- Lebas F. 1989. Besoins nutritionnels des lapins: Revue bibliographique et perspectives. *Cuni-science*, 5(2):1-28.
- Lebas F. 1996. El conejo: Cría y patología. Colección FAO: Producción y sanidad animal, pp. 19-21.
- Licois D., Coudert P. 1982. Coccidioses et diarrhées du lapin à l'engraissement. *Bull. GTV*, 5:109-122.
- Licois D., Guillot J.F., Mouline C., Reynaud A. 1992. Susceptibility of the rabbit to an enteropathogenic strain of *Escherichia coli* 0103: effect of animals' age. *Ann. Rech. Vet.*, 23:225-232.
- Lleonart F. 1996. Nematodiasis intestinales. *Boletín de cunicultura*, 86:38-39.
- Lleonart F., Campo J.L., Valls R., Castelló J.A., Costa P., Pontes M. 1980. Anatomía y fisiología del aparato digestivo. Tratado de cunicultura: principios básicos, vol. 1(4):61-85.
- Maertens L., Coudert P. 2006. Recent advances in Rabbit sciences. ILVO. Ed. COST. Belgium.
- MAGRAMA, 2014. <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/cunicola/default.aspx>
- Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinane A., Maguire D. 2013. *Clinical Veterinary Microbiology*, second edition. Ed. Elsevier.
- Mehlhorn H. 2006. *Parasitology in Focus, Facts and Trends*. Tercera edición. Editorial Springer, Berlin.
- Muniesa A., Ferreira C., De Blas I. 2014. ¿Es asumible la pérdida de sensibilidad analizando en *pool*?. SIEVMP.

- Pakandl M. 2009. Coccidia of rabbit: a review. *Folia Parasitology*, 56:153–166.
- Proto V. 1980. Alimentazione del coniglio da carne. *Conigliocultura*, 7:17-32.
- Quinn P.J., Carter M.E., Merkey B., Carter G.R. 1994. Clinical veterinary microbiology. Editorial Elsevier. 2(15-16), 191-236.
- Rose M.E., Millard B.J., Hesketh P. 1992 Intestinal changes associated with expression of immunity to challenge with *Eimeria vermiformis*. *Infection and Immunity*, 60:5283–5290.
- Rosell J.M. 2000. Enfermedades del conejo, vol. 2. Ediciones Mundi-Prensa. España.
- Schoeb T.R., Casebolt D.B., Walker V.E., Potgieter L.N.D., Thouless M.E., Di Giacomo R.F. 1986 Rotavirus-associated diarrhea in a commercial rabbitry. *Laboratory Animal Science*, 36(2):149-152.
- Singla L.D., Juyal P.D., Sandhu B.S. 2000 Pathology and therapy in naturally *Eimeria stiedae*-infected rabbits. *Journey Protozoology*, 10:185–191.
- Sürsal N., Gökpınar S., Yıldız K. 2014. Prevalence of intestinal parasites in hamsters and rabbits in some pet shops of Turkey. *Turkiye Parazitol Derg*, 38:102-105.
- Vázquez L., Dacal V., Panadero R. 2006. Principales parasitosis internas de los conejos: medidas de control y prevención. *Boletín de cuniculara*, 146:25-30.
- Vitovec J., Pakandl M. 1989 The pathogenicity of rabbit coccidium *Eimeria coecicola*. *Folia Parasitology*. Praga, 36:289–293.