

AISLAMIENTO DE *Clostridium perfringens* EN UN TERNERO DE VENEZUELA

Isolation of *Clostridium perfringens* in One Calf from Venezuela

Yuraima Pineda¹, Fanny de Aponte² y Jorge Santander²

¹Investigador . ²Técnicos asociados a la investigación. Laboratorio de Bacteriología. Instituto de Investigaciones Veterinarias. CENIAP-INIA, Las Delicias, Apartado 70, Maracay 2101, estado Aragua, Venezuela.
E mail: ypineda@inia.gov.ve

RESUMEN

Clostridium perfringens se aisló de un becerro de nueve meses de edad, procedente de una finca ubicada en el estado Anzoátegui, Venezuela. El aislamiento se obtuvo del medio líquido selectivo de carne picada, agar sangre ovina y agar feniletanol. La identificación bioquímica se realizó con el sistema de placas presunto para la identificación de bacterias anaeróbicas. Se realizaron pruebas de patogenicidad y toxigenicidad en acures y ratones, respectivamente. La identificación bacteriana definitiva se basó en el estudio de las características morfológicas, culturales, bioquímicas, patogénicas y de toxicidad del aislado. Mediante este estudio se asocia la presencia de *C. perfringens* a enterotoxemia en un ternero de Venezuela.

Palabras clave: *Clostridium perfringens*, aislamiento, terneros, enterotoxemia.

ABSTRACT

Clostridium perfringens was isolated from a nine month old calf on a farm in Anzoátegui state, Venezuela. The isolation was realized in a selective media of chopped meat broth, blood ovine agar and phenylethanol agar. The biochemical identification was made with the presumptive plate method for anaerobic bacterial identification. The pathogenicity and toxigenicity were evaluated in guinea pigs and mice respectively. The definitive bacteria identification was carried out by means of morphologic, cultural, biochemical, pathogenetic and toxigenic study of its characteristics. This report associated the presence of *C. perfringens* to enterotoxemia in one calf in Venezuela.

Key words: *Clostridium perfringens*, isolation, calves, enterotoxemia.

INTRODUCCIÓN

Clostridium perfringens es un bacilo esporulado, anaeróbico, pero estrictas condiciones anaeróbicas no son requeridas para su crecimiento [10]. Las cepas de esta especie se dividen en cinco tipos: A, B, C, D y E, basado en su habilidad de producir las toxinas alfa, beta, epsilon e iota. Los tipos B, C y D afectan a los bovinos [1, 2] y producen enteritis hemorrágica, enterotoxemia (enteritis) necrótica y enterotoxemia clásica respectivamente en los terneros [10]. *C. perfringens* es el agente causal de varias condiciones tóxicas en animales y humanos [1, 2, 8].

La infección clostridial en bovinos, producida por *C. perfringens*, puede ser de tipo histotóxico o enterotóxico. En ambos casos la acción de las toxinas producidas determina el cuadro de la enfermedad. La histotoxicidad se manifiesta clínicamente por mionecrosis debida a invasión del agente a nivel de heridas, condición en la que se ha involucrado al *C. perfringens* tipo A; así como en humanos en casos de intoxicación alimentaria.

Las enterotoxemias aparecen como una intoxicación aguda causada por los tipos de *C. perfringens* B, C, D y existen algunos autores que involucran al tipo A [1, 2, 8]; sin embargo, esta última condición aún no ha sido comprobada [10].

En todas las enterotoxemias clostridiales la forma de entrada del *C. perfringens* toxigénico es por ingestión. En algunos casos, las cepas causales pueden estar presentes largo tiempo en el tracto intestinal, antes que condiciones predisponentes activen el inicio de la enfermedad y será la interacción bacteria-toxina-huésped la que determine el inicio y éxito de las variadas enterotoxemias [6, 10].

Los terneros son muy susceptibles a la infección durante las primeras semanas de vida y pueden presentar varios signos: diarrea fétida, tetania, convulsiones y la muerte puede sobrevenir en pocas horas. Se puede presentar en animales en

buenas condiciones sin manifestaciones ni signos clínicos, hasta pocas horas antes de la muerte [2, 3].

La enfermedad producida por *C. perfringens* es de distribución mundial. Este agente está ampliamente diseminado en la naturaleza (suelo, aguas, medio ambiente) y forma parte de la flora bacteriana normal del intestino de los animales y el hombre. Las cepas tipo B, C y D están restringidas al tracto intestinal, y sólo han sido aisladas del suelo en áreas donde estas enterotoxemias son enzootias [1, 2, 3].

En Venezuela no existen reportes oficiales de la presencia de *C. perfringens* causando enterotoxemia en bovinos. Sin embargo, se presume que ante factores predisponentes, se pueda desencadenar la enfermedad, causando pérdidas económicas a los productores.

El presente trabajo señala el aislamiento de *C. perfringens* asociado a un cuadro enterotóxico en un ternero de una finca del estado Anzoátegui.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en terneros de una finca ubicada al norte del estado Anzoátegui, Venezuela, municipio Libertad, coordenadas N: 10° 76' E: 3° 31'. La finca, semintensiva y de doble propósito, conformada por un rebaño mestizo (Pardo suizo, Brahman, Holstein) con una población de 230-250 reses, pero para el año 1999 se reportan pérdidas de casi la totalidad de la población de terneros y actualmente la población consta de 90 bovinos, alimentados a pastoreo en potreros desforestados. Los planes de vacunación incluyen vacunas contra aftosa, septicemia hemorrágica, triple, rabia, leptospirosis, anaplasma y ántrax. Los becerros menores de un año eran los más afectados por la enfermedad que se presenta generalmente a la entrada y salida de las lluvias, en animales en buen estado y aparentemente sanos. Los signos clínicos fueron disnea, pulso yugular fuerte, heces sanguinolentas, hemoglobinuria y la muerte se presenta súbitamente.

Se evaluó la población de becerros y se tomaron dos que mostraban ser los más afectados para el momento de la visita, cuyas edades oscilaron entre cinco y nueve meses. Los signos clínicos observados fueron repentina depresión, tristeza, anorexia, disnea marcada, pulso yugular intenso, postración y muerte a las pocas horas de observados los signos clínicos.

Inmediatamente después de la muerte, a los animales se les realizó la necropsia y al examen macroscópico se observó congestión pulmonar fuerte, hipertrofia cardíaca, hepatomegalia, riñón congestivo con acúmulo de grasa medular, enteritis hemorrágica, ganglios mesentéricos congestionados y abundante líquido ascítico de color amarillento en la cavidad abdominal.

Estos hallazgos, aunados al cuadro clínico, a los antecedentes clínicos, epidemiológicos así como la presencia de fac-

tores predisponentes como grupo etario afectado, y las condiciones extremas de alimentación permitieron asociar la patología presente con enfermedad clostridial.

Muestras

Las muestras recolectadas fueron vísceras (corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón, intestino), ganglios mesentéricos, sangre, líquido ascítico y heces. Estas muestras fueron conservadas y transportadas de acuerdo a los procedimientos descritos para el estudio de agentes bacterianos aeróbicos y anaeróbicos [5, 7].

Para el estudio anaeróbico se tomaron precauciones para proteger las muestras de la exposición al oxígeno mediante el uso del sistema para anaerobiosis gaspak (BBL). Las muestras de sangre para hemocultivo fueron recolectadas en botellas de medio tioglicolato enriquecido (difco), selladas al vacío con CO₂. Posteriormente todas las muestras fueron trasladadas con la mayor rapidez al laboratorio de Bacteriología del Instituto de Investigaciones Veterinarias, Maracay, estado Aragua, para su análisis.

Como apoyo a las muestras se les realizó evaluación parasitológica e histopatológica.

Aislamiento e Identificación

En el laboratorio se realizaron análisis bacteriológicos aeróbicos y anaeróbicos. Las muestras fueron sembradas cada una directamente en agar tripticasa soya (difco) adicionado con 5% de sangre ovina y agar Mac Conkey (difco) e incubadas aeróbicamente a 37°C por 48 horas. Las siembras anaeróbicas se realizaron en agar tripticasa soya enriquecido (difco), adicionado con 5% de sangre ovina, agar feniletanol (difco) y en los caldos selectivos de tioglicolato enriquecido (difco) y carne picada (difco) e incubados en sistema gaspak (BBL) a 37°C por un lapso de 72 a 96 horas.

Los aislados bacterianos aeróbicos fueron identificados por los métodos bacteriológicos estándar [5] y la identificación bioquímica de *C. perfringens* se realizó mediante el método de placas presunto I, II y III, desarrollado por el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) [5, 12]. Este sistema consiste de tres tipos de placas divididas en cuadrantes con medios diferenciales para la identificación bioquímica de bacterias anaerobias, lo que en conjunto con otras características como la relación de la bacteria con el oxígeno, morfología de las colonias, reacción frente al Gram, hemólisis, características microscópicas, desarrollo en los medios selectivos de tioglicolato enriquecido y carne picada permitieron la identificación de *C. perfringens*.

Pruebas de patogenicidad

Se realizaron en acures mediante inoculación de 1,5 cc de cultivo puro por vía intramuscular [4], siendo los animales observados hasta el momento de su muerte.

Pruebas de toxicidad

La presencia de toxina se determinó por inoculación de 0,5 cc del sobrenadante de un cultivo puro y filtrado, en cuatro ratones vía intraperitoneal, manteniendo un grupo control [4, 5].

Finalmente la identificación bacteriana se basó en el estudio de las características morfológicas, culturales, bioquímicas [4, 7, 12], de patogenicidad y toxicidad [4, 5].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las siembras directas aeróbicas en general fueron negativas a patógenos significativos, en las muestras del contenido intestinal se aislaron bacterias de la flora normal, sin embargo al estudio microscópico se observaron abundantes bacilos Gram positivos con extremos redondeados, solos o en pares. Las siembras anaeróbicas de material intestinal no fueron consideradas, por ser este agente parte de la flora normal y su aislamiento de esta zona no puede considerarse un diagnóstico definitivo [2].

Las siembras directas anaeróbicas de vísceras, ganglios, sangre y líquido ascítico en medios sólidos no revelaron cultivos sospechosos a *C. perfringens*. Sin embargo, a las 96 horas de incubación, de corazón, pulmón e hígado se observó un crecimiento caracterizado por turbidez y abundante producción de gas en el caldo selectivo de carne picada.

Los subcultivos realizados de este caldo a los medios de agar sangre ovina en placa y agar feniletanol revelaron la presencia de colonias circulares, lisas, pequeñas y translúcidas, que a mayor incubación se tornaron grises y sus bordes irregulares. Las colonias fueron β hemolíticas en doble halo, hemólisis característica producida por *C. perfringens*. Estas colonias correspondieron a bacilos Gram positivos de aspecto uniforme solos o en pares, características que coinciden con las experiencias señaladas por otros autores para esta bacteria [1, 5].

En el presente estudio, este aislado exhibió cierta aerotolerancia, similar a lo sugerido por Nilo [10], en contradicción con la condición anaeróbica estricta que le adjudican otros autores [1, 4, 5, 6, 9].

Aunque *C. perfringens* es una bacteria esporulada, no se logró observar las esporas, aun después de estimular su producción. Sin embargo, este hecho es posible y está ampliamente citado en la literatura para este agente [1, 2, 7, 10, 11].

La caracterización bioquímica realizada en las placas pre-sumpto se indica en la TABLA I, donde se puede observar características bioquímicas fundamentales que permiten identificar el aislado, como la fermentación de determinados hidratos de carbono, hidrólisis enzimática de diferentes sustratos y la producción de hidrógeno sulfurado y gas, características asociadas con la actividad proteolítica del aislado y con su virulencia.

Las pruebas de patogenicidad permitieron reproducir la enfermedad en los acures; la sintomatología observada fue

decaimiento, tristeza, anorexia y muerte a las 48 horas post-inoculación. En la necropsia se observó hemorragia subcutánea y necrosis caseosa en el sitio de inoculación, así como en el tejido subcutáneo, hepatomegalia y congestión hepática. Corazón, pulmón e intestino se observaron hemorrágicos. A partir de las muestras recolectadas de estos acures se aisló *C. perfringens*, manteniendo las características descritas del aislado original.

Aunque no se realizó la identificación con antitoxinas, las pruebas de toxicidad sugieren la presencia de una toxina, por la mortalidad de los ratones inoculados con el sobrenadante del cultivo puro y filtrado, manteniéndose normal el grupo control, similar a lo indicado por algunos autores [4, 5].

Los resultados obtenidos mediante el estudio de las características morfológicas, culturales, bioquímicas, patogénicas y de toxigenicidad permitieron confirmar la presencia de *C. perfringens* en las muestras de uno de los terneros evaluados. La falta de aislamiento en el otro animal estuvo relacionada con fallas por exposición involuntaria de las muestras al oxígeno ambiental durante el transporte.

En los dos terneros evaluados los resultados parasitológicos fueron negativos y la evaluación histopatológica reveló colitis crónica erosiva, enteritis erosiva superficial con abundantes bacilos Gram positivos en la luz intestinal, que en conjunto con las lesiones hepáticas, pulmonares y renales sugieren ser respuesta a una toxina biológica circulante que podría estar asociada a un cuadro de enterotoxemia clostridial en estos animales.

TABLA I
IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA
DE *Clostridium perfringens*

Pruebas	Resultados
Fermentación de azúcares:	
Glucosa	Positivo
Lactosa	Positivo
Ramnosa	Negativo
Manitol	Negativo
Hidrólisis de:	
Almidón	Positivo
Gelatina	Positivo
Esculina	Positivo
Caseína	Positivo
DNA	Positivo
Lecitina	Positivo
Producción de	
Hidrógeno sulfurado	Positivo
Indol	Negativo
Gas	Positivo

El cuadro clínico presente, los hallazgos de necropsia, los antecedentes clínicos y epidemiológicos, los estudios histopatológicos aunados al aislamiento de *C. perfringens* indica que la causa de muerte del animal fue por enterotoxemia, lo que pudiera estar relacionado con las condiciones nutricionales (cambios bruscos de alimentación) de los terneros en determinadas épocas del año donde se presenta con mayor frecuencia la enfermedad, por haber mayor disponibilidad de pastos siendo más apetecido por los animales, así como con la virulencia del agente y las condiciones inmunológicas del huésped.

Aunque la presentación clínica de esta infección es esporádica, su importancia y riesgo en la población animal dependerá en gran medida de las condiciones intrínsecas del huésped (nutricionales e inmunológicas) así como de la virulencia del agente.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados confirman la presencia en Venezuela de *C. perfringens* como agente causal de enterotoxemia en un ternero.

Las condiciones especiales de toma de muestras, transporte y cultivo en laboratorio requeridas para el estudio de bacterias anaeróbicas pudieran explicar la ausencia de reportes de este tipo en nuestro país.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento a los laboratorios de Bacteriología de Peces, Parasitología, Patología, a la Unidad de Epidemiología del Instituto de Investigaciones Veterinarias CENIAP-INIA, al laboratorio de Histopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela por el apoyo brindado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CARTER, C.R.; CHENGAPPA, M.M. Clostridia. Chapter 14. In: **Essentials of Vet. Bacteriol and Micol.** 4th Ed. Lea & Febiger. 135-137 pp. 1991.
- [2] CARTER, C.R.; CHENGAPPA, M.M. Clostridial enterotoxemia of calves. In: **Microb. Dis.** 1st Ed. Iowa State University Press. Ames 79-81 pp. 1993.
- [3] CASILLAS, E.P. Principales enfermedades causadas por *Clostridium* en bovinos y su prevención. **Bol. Téc. Pfizer Salud Anim** 1-7 pp.
- [4] CATO, EP.; LANCE, G.; FINEGOLD, SM. Clostridium perfringens. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriol.** Vol. 4. Williams & Wilkins 1141-1144 y 1179-1183 pp. 1989.
- [5] KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.N.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. Bacterias anaerobias. Capítulo 14. In: **Diag. Microbiol.** Lippincott Company 278-299 pp. 1999.
- [6] MANTECA, C.; JANIAUX, T.; DAUBE, G.; CZAPLICKI, G.; MAINIL, J.G. Isolation of *Clostridium perfringens* from three neonatal calves with haemorrhagic abomasitis. **Revue de Med. Vet.** 152: 8-9, 637-639. 2001
- [7] MARS, S.L.; MELLI, A.; KASS, P.H. Evaluation of methods to diagnose *Clostridium perfringens* associated to diarrhea in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 214: 357-360. 1999.
- [8] MCCLANE, B.A.; ROOD, J.I.; BAHL, H.; DURRE, P. Clostridial toxins involved in human enteric and histotoxic infections. In: **Clostridia Biotech. and Med. Applicat.** Ed. Bahl, H. 169-209 pp. 2001.
- [9] MPAMUGO, O.; DONOVAN, T.; BRETT, M.M. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* as a cause of sporadic diarrhea. **J. Med. Microbiol** 43:442-445. 1995.
- [10] NILO, L. Enterotoxemic *Clostridium perfringens*. In: **Pathogenesis of Bact. Infect. in Anim.** Chapter 11 2nd Ed. Ed. Gyles, C y Thoen, C. Iowa State University press 114-123 pp. 1993.
- [11] STANLEY, L.M.; MELLI, A.; KASS, P.H.; JANG, S.S.; BARKHOODARIAN, A.; HIRSH, D.C. Influence of storage and temperature on endospore and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* in dogs. **J. Vet. Diagn. Invest.** 12: 63-67. 2000.
- [12] WHALEY, D.N.; WIGGS, L.S.; MILLER, P.H.; SRIVASTAVA, P.V.; MILLER, J.M. Use of Presumptive plates to Identify Anaerobic Bacteria. **J. Clin. Microbiol.** 33(5):1196-1202. 1995.