

PREVALENCIA, INCREMENTO Y PATOGENICIDAD DE Clostridium perfringens  
(Welchii) y Clostridium paraperfringens EN EL TRACTO INTESTINAL DE LOS  
OVINOS INFANTES

T E S I S

Presentada al Programa de Estudios para Graduados en Ciencias Agrarias  
Universidad Nacional - Instituto Colombiano Agropecuario

P o r

//

GERMAN RODRIGUEZ MARTINEZ

Como requisito parcial para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE


Bogotá, Colombia

1976

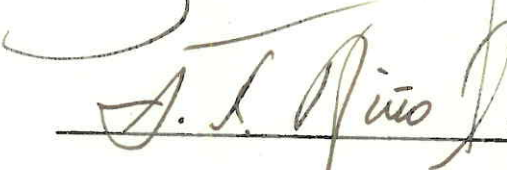
TESIS APROBADA POR

COMITE CONSEJERO


MANUEL JOSE TORRES ANJEL



---

---

---

JULIAN NIÑO SALGADO

TIRSO DE PAULA MOLINA

El Presidente de Tesis y el Consejo Examinador de grado, no serán responsables de las ideas emitidas por el candidato. (Artículo 217 de los Estatutos de la Universidad Nacional).

A mis padres y hermanos

A mi esposa e hijos

## AGRADECIMIENTOS

A mi Comité Consejero, por sus importantes aportes en la realización de mi trabajo.

Al doctor Manuel José Torres-Anjel, por su valiosa orientación en la ejecución de mi trabajo.

Al doctor Héctor E. González, por su desinteresada colaboración en el estudio histopatológico de las lesiones producidas por el C. perfringens.

A COLCIENCIAS por la subvención parcial de mi trabajo, mediante la utilización de fondos del proyecto 10-03-28-74, que tiene al doctor Torres-Anjel, como investigador principal.

Al personal del Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias, por su valiosa colaboración durante el desarrollo de mi trabajo.

## MICROBIOGRAFIA

GERMAN RODRIGUEZ MARTINEZ, nació en Bogotá, Departamento de Cundinamarca el 5 de diciembre de 1944. Culminó sus estudios de bachillerato en el Colegio San Bernardo de Bogotá, y en la Universidad Nacional de Colombia, recibió el título de Médico Veterinario y Zootecnista en 1967.

Desde junio de 1968 se vinculó al Instituto Zooprofiláctico Colombiano por espacio de 6 meses, durante este tiempo ocupó el cargo de Director del Consultorio Veterinario de Cauca. En el año de 1969 pasó al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) donde ocupó el cargo de Médico Veterinario Auxiliar del Centro de Diagnóstico de Medellín, a partir de 1971, ocupó el cargo de Director del Centro de Diagnóstico de Pasto, hasta su ingreso al Programa de Estudios para Graduados en Ciencias Agrarias UN-ICA, en el Programa de Microbiología.

## CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1. Naturaleza del problema.	1
1.2. Objetivos generales.	1
2. REVISION DE LITERATURA	4
2.1. Generalidades	4
2.2. Enfermedades de los ovinos causadas por <u>C. perfringens</u> .	18
2.2.1. Enterotoxemia producida por el <u>C. perfringens</u> tipo A.	18
2.2.2. Enterotoxemia producida por <u>C. perfringens</u> tipo B.	20
2.2.3. Enterotoxemia producida por el <u>C. perfringens</u> tipo C.	21
2.2.4. Enterotoxemia causada por <u>C. perfringens</u> tipo D.	22
2.2.5. Enterotoxemia causada por <u>C. perfringens</u> tipo E.	24
2.3. Enfermedad experimental y técnica del asa intestinal	24
2.4. Reproducción y caracterización histopatológica de las lesiones producidas por <u>C. perfringens</u> por medio de la prueba histoquirúrgica del asa intestinal.	28

	Página
3. MATERIALES Y METODOS	30
3.1. Población muestreada.	30
3.1.1. Muestreo.	32
3.2. Caracterización e identificación de <u>C. perfringens</u> .	34
3.3. Procesamiento de datos.	44
3.4. Seguimiento prospectivo de una población cohorte de ovinos infantes con respecto al <u>C. perfringens</u> .	47
3.5. Localización cualitativa y cuantitativa del <u>C. perfringens</u> en las diferentes porciones del sistema digestivo ovino.	49
3.6. Reproducción y caracterización histológica de las diferentes cepas de <u>C. perfringens</u> aisladas de los ovinos, por medio de la técnica quirúrgico-histológica del asa intestinal ligada.	52
4. RESULTADOS	57
4.1. Población muestreada	57
4.2. Caracterización e identificación de <u>C. perfringens</u> .	72
4.3. Seguimiento prospectivo de una población cohorte de ovinos infantes con relación al <u>C. perfringens</u> .	81

	Página
4.4. Localización cualitativa y cuantitativa del <u>C. perfringens</u> en el sistema digestivo ovino.	105
4.5. Lesiones producidas por cepas de <u>C. perfringens</u> mediante el empleo de la técnica quirúrgico-histológica del asa intestinal ligada en ovinos.	113
5. DISCUSION	123
5.1. Población muestreada	123
5.2. Caracterización e identificación de <u>C. perfringens</u> .	125
5.3. Seguimiento prospectivo de una población cohorte de ovinos infantes con relación al <u>C. perfringens</u> .	129
5.4. Localización cualitativa y cuantitativa del <u>C. perfringens</u> en el sistema digestivo de los ovinos.	130
5.5. Lesiones producidas por cepas de <u>C. perfringens</u> mediante la utilización de la técnica quirúrgico-histológica en el asa intestinal de los ovinos.	131
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	133
7. RESUMEN	136
8. SUMMARY	139
BIBLIOGRAFIA	142

## LISTA DE TABLAS

TABLA No.		Página
1	Principales diferencias y similitudes de las especies de <u>C. perfringens</u> y <u>C. paraperfringens</u> .	7
2	Distribución de las toxinas entre los diferentes tipos de <u>C. perfringens</u> .	9
3	Efecto de la esporotoxina (enterotoxina) sobre los ovinos, inoculados experimentalmente.	14
4	Formulario diseñado para la recopilación de datos demográficos de las granjas ovinas a estudiar.	31
5	Distribución de raza y sexo en 100 ovinos infantiles seleccionados para establecer prevalencia y cuantificación de <u>C. perfringens</u> en heces.	33
6	Distribución de edades durante el primer muestreo para aislamiento de <u>C. perfringens</u> .	35

7	Tipificación de <u>C. perfringens</u> por medio de Serotoxineu- tralización.	46
8	Ovinos inoculados con diferentes cepas de <u>C. perfringens</u> en medio MDS* vía intraluminal (asas). Controles nega- tivos: Medio MDS.	56
9	Capacidad de clasificación de las variables demográficas con respecto a sexo, en 100 infantes ovinos estudiados para <u>C. perfringens</u> .	61
10	Capacidad de clasificación de la raza con respecto a sexo, en 100 infantes ovinos estudiados para <u>C. perfringens</u> .	62
11	Capacidad de clasificación del peso (promedio e incremento en seis mediciones) con respecto al sexo, en 100 infantes ovi- nos estudiados para <u>C. perfringens</u> .	63
12	Parámetros de Discriminación del peso (inicial, final e in- cremento) con respecto a sexo.	64

TABLA No.		Página
13	Capacidad de clasificación de las variables bacteriológicas ( <u>C. perfringens</u> en heces) con respecto a sexo, en 100 infantes ovinos estudiados.	68
14	Parámetros de Discriminación de las variables Bacteriológicas ( <u>C. perfringens</u> en heces) con respecto a sexo.	70
15	Capacidad de clasificación de los recuentos de esporas de <u>C. perfringens</u> con respecto a razas de ovinos.	71
16	Parámetros de discriminación de las variables bacteriológicas ( <u>C. perfringens</u> en heces) con respecto a razas de ovinos.	73
17	Resultado de las pruebas presuntiva en Medio Básico <u>Perfringens</u> + Yema de Huevo y confirmativa en Lactosa Motilidad Nitrato, en los diferentes recuentos.	74
18	Resultados de la caracterización de cepas de <u>C. perfringens</u> en medio LMM.	76
19	Cajas (seleccionadas) de los recuentos en medio MBP para el estudio de características individuales de las colonias.	78

TABLA No.		Página
20	Relación de las características individuales de las colonias en medios básico perfringens y agar sangre ovino.	79
21	Resultados de la Serotoxineutralización en ratones para tipificación del <u>C. perfringens</u> tipo A.	82
22	Resumen de la tipificación para 80 cepas de <u>C. perfringens</u>	83
23	Log <sub>10</sub> de los recuentos por gramo de heces de <u>C. perfringens</u> en infantes ovinos estudiados consecutivamente en seis muestreos diferentes con un mes de intervalo.	85
24	Ajuste de la distribución de recuentos de esporas (Log <sub>10</sub> ) de <u>C. perfringens</u> del primer muestreo en ovinos neo-natos.	92
25	Parámetros de distribución normal de recuentos de esporas de <u>C. perfringens</u> (Log <sub>10</sub> ) para cada una de las seis muestras sucesivas en los 100 infantes ovinos muestreados.	93
26	Matriz de coeficientes de correlación (r) y su cuadrado (r <sup>2</sup> ) entre los recuentos de <u>C. perfringens</u> encontrados en seis muestras consecutivas.	96
27	Habilidad del recuento de <u>C. perfringens</u> de las muestras (1, 2, 3, 4, 5) para predecir la sexta.	97

TABLA No.		Página
28	Logaritmo de los recuentos ( $\text{Log}_{10}$ ) en 10 ovinos muestreados entre los 8 y 10 meses de edad, con intervalos de 15 días .	103
29	Resultado de los exámenes parasitarios de los diferentes muestreos.	104
30	Estratificación del sistema digestivo de ovinos para ubicación cuantitativa de <u>C. perfringens</u> por intervalos de $3 \times 10^n$ .	106
31	$\text{Log}_{10}$ de los recuentos por gramo de <u>C. perfringens</u> en las estratificaciones del sistema digestivo de ovinos.	107
32	Variaciones del pH en el contenido del sistema digestivo de los ovinos estudiados para <u>C. perfringens</u> .	108
33	Resultado de las lesiones producidas por diferentes cepas de <u>C. perfringens</u> mediante la técnica quirúrgica-histológica en asas intestinales ovinas.	114

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA No.		Página
1	Reacción típica del <u>C. perfringens</u> en el medio básico perfringens.	37
2	Procesamiento de las muestras de heces para el recuento de colonias de <u>C. perfringens</u> .	38
3	Reacción de <u>C. perfringens</u> en el medio Lactosa Motilidad Nitrato.	40
4	Relación de la producción de lecitinasa y la capacidad hemolítica de cepas crecidas en el medio básico <u>perfringens</u> .	42
5	Reacción típica del <u>C. perfringens</u> en el agar sangre de ovino. Hemólisis alfa (A), Hemólisis beta (B).	43
6	Esquema de procedimientos seguidos en la prueba de la sero- toxineutralización.	45
7	Esquema del procesamiento de datos según los recuentos.	48

FIGURA No.		Página
8	Esquema seguido para la localización cualitativa y cuantitativa del <u>C. perfringens</u> en el sistema digestivo de los ovinos.	50
9	Esquema del muestreo del sistema digestivo para la localización cualitativa y cuantitativa del <u>C. perfringens</u> .	51
10	Técnica quirúrgico-histológica para caracterización de cepas de <u>C. perfringens</u> .	54
11	Gráfico discriminatorio de la variable peso con respecto a sexo. La variable canónica No. 1 aparece en la abcisa, la No. 2 en la ordenada (M = machos; H = hembras).	65
12	Gráfico discriminatorio de las variables demográficas con respecto a sexo. La variable canónica No. 1 aparece en la abcisa, la No. 2 en la ordenada.	67
13	Gráfico discriminatorio de las variables bacteriológicas (Log <sub>10</sub> esporas de <u>C. perfringens</u> por gramo de heces) VS sexo (M= machos; H=hembras). La variable canónica No.1 aparece en la abcisa, la No.2 en la ordenada.	69

FIGURA No.		Página
14	Relación directa de las características individuales de las colonias en los medios MBP y ASO .	80
15	Histogramas obtenidos por computador (BMD-OSD) de los diferentes recuentos de <u>C. perfringens</u> .	91
16	Gráfico de la curva de regresión entre los datos medios para cada muestra, contra el $\text{Log}_{10}$ del número de días correspondientes al muestreo.	94
17	Gráfico por computador de cada uno de los recuentos de <u>C. perfringens</u> (abcisa) VS los residuales (ordenada), utilizando el muestreo No.6 como variable dependiente.	99
18	Localización del <u>C. perfringens</u> en cavidad bucal, esófago, panza, bonete, librillo y cuajar, utilizando el medio básico <u>perfringens</u> .	109
19	Localización del <u>C. perfringens</u> en hígado, vesícula biliar y ciego; utilizando el medio básico <u>perfringens</u> .	110

FIGURA No.		Página
20	Localización del <u>C. perfringens</u> en seis porciones diferentes (descendentes) del intestino delgado; utilizando el medio básico <u>perfringens</u> .	111
21	Localización del <u>C. perfringens</u> en seis porciones diferentes (descendente) del intestino grueso; utilizando el medio bá - sico <u>perfringens</u> .	112
22	Caso experimental. Intestino ligado de oveja 18 horas post-inoculación. Apariencia macroscópica de asas intestinales inoculadas con diferentes cepas de <u>C. perfringens</u> ; nótese los distintos grados de dilatación en los segmentos ligados.	117
23	Caso experimental. Intestino ligado de oveja. Control. Mucosa intestinal normal, el epitelio de revestimiento y la lámina propia, no presenta ninguna alteración morfológica. Hematoxilina-Eosina 600 x.	118
24	Caso experimental. Intestino ligado de oveja 18 horas post-inoculación: Necrosis de coagulación del epitelio (N) y aumento de celularidad en la lámina propia(C). Hematoxi- lina-Eosina 600 x.	119

- 25 Caso experimental. Intestino ligado de oveja 18 horas post-inoculación. Dilatación de los vasos linfáticos (D) y edema de la submucosa (E). Ligera congestión de vasos sanguíneos (C). Hematoxilina-Eosina 600 x. 120
- 26 Caso experimental. Intestino ligado de oveja 18 horas post-inoculación: Necrosis de coagulación (N) y descamación epitelial de las vellosidades intestinales (D). Hematoxilina-Eosina 600 x. 121
- 27 Caso experimental. Intestino ligado de oveja 24 horas post-inoculación: Necrosis de coagulación del epitelio de revestimiento; nótese la picnosis nuclear (P) y pérdida del contorno celular (C). Descamación epitelial de una vellosidad intestinal (D). Hematoxilina-Eosina 2.000 x. 122

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Naturaleza del problema.

En Colombia no se han realizado trabajos tendientes a identificar las diferentes cepas de Clostridium perfringens (welchii) presentes en la flora bacteriana normal del intestino de los ovinos. Este grupo de gérmenes puede originar en dichos animales así como en otras especies, enfermedades de tipo disenteria y enterotoxemia (37,40,51) , cuando se presentan alteraciones en el manejo y la alimentación, causando mortalidad alta tanto en animales jóvenes como en adultos.

En la actualidad no se tiene un conocimiento real de la concentración de C. perfringens enterotoxigénico en el tracto intestinal y su ubicación en los ovinos clínicamente normales, ni en animales que padecen la enfermedad asignada a este germen.

Por no existir una información precisa sobre las pérdidas causadas por C. perfringens en nuestro medio, se decidió realizar un estudio más a fondo orientado a conocer la situación de los C. perfringens toxigénicos en el intestino de los ovinos y relacionar tales gérmenes con el manejo y el estado sanitario del aprisco.

### 1.2. Objetivos generales.

#### 1.2.1. Evaluar las condiciones demográficas, sanitarias y de manejo del aprisco y

su posible causalidad asociativa o predisponente para la prevalencia e incidencia de patogenización del C. perfringens en el intestino de ovinos infantes y destetos.

1.2.2. Caracterizar las cepas de C. perfringens presentes en el tracto intestinal ovino, buscando algunos patrones fisiológicos y bioquímicos de aplicación práctica, particularmente en los que respecta a C. perfringens toxigénico presente en la flora intestinal de ovinos sanos.

1.2.3. Seguir prospectivamente a una población de ovinos infantes en el tiempo para ver los cambios en la flora intestinal con respecto a C. perfringens, estudiando variables demográficas que pudieran afectar la ecología intestinal.

1.2.4. Localizar cualitativamente y cuantitativamente el C. perfringens en las diferentes porciones del sistema digestivo ovino.

1.2.5. Reproducir y caracterizar histopatológicamente la lesiones producidas por C. perfringens por medio de la técnica quirúrgico-histológica del asa intestinal ligada en ovinos.

1.2.6. Aprovechar la datuística y casuística para establecer un modelo experimental respecto a lo que puede ser la situación de presencia, incremento y acción de

C. perfringens y sus toxinas, en infantes de otras especies, incluyendo la humana.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Generalidades.

Diferentes autores han determinado la presencia de varias especies del género Clostridium en el tracto gastrointestinal o en el hígado de los animales, en algunos casos con referencia específica a la producción de enfermedades y en otros como hallazgos de necropsias. La muerte repentina en animales alimentados en confinamiento se cree es producida por diversas especies de género Clostridium (7,9,12,37,38,40,43).

Los gérmenes del género Clostridium son de gran importancia en los animales domésticos como agentes específicos de enfermedades. Pocas veces son invasores secundarios, excepto en casos de la gangrena en que usualmente aparece más de una especie. Son productores de toxinas de gran actividad biológica, las cuales actúan como etiologías patogénicas. Dichas toxinas según el agente que las produce varían en su modo de acción y en la manera de penetrar a la circulación. Pueden ser ingeridas junto con alimentos descompuestos, absorbidas desde el intestino después de la proliferación anormal del germen causal, o elaboradas en los propios tejidos (10, 12, 25, 36,37,38,39,51).

Los gérmenes patógenos del género Clostridium, pululan generalmente en los suelos ricos en humus. Se encuentran en los contenidos intestinales de animales sa-

nos, con posibilidad de provocar enfermedad solo en circunstancias especiales (54,56) cuando su número se incrementa en varios ciclos logarítmicos.

El carácter universalmente ubicuo de estos agentes, hace prácticamente imposible su supresión de la vida animal, de manera que se hace necesario aplicar medidas profilácticas para su control.

La disenteria y enterotoxemia de los animales domésticos, en especial de los ovinos, son enfermedades causadas por diferentes grupos toxigénicos de C. perfringens, habitantes del suelo y de las vías digestivas de los animales normales (7,8,9,11,12,43,51).

El C. perfringens (welchii) fue descrito por primera vez en 1891, por Achalme. Posteriormente fue reportado por Welch y Nuttal con el nombre de Bacillus aerogenes capsulatus y por Veillon y Zuber en 1898 quienes lo aislaron de un apéndice gangrenoso y lo reportaron como Bacillus perfringens. Desde 1898, se han aplicado más de cincuenta sinónimos a esta especie (51), y la literatura francesa (38) insiste en la nomenclatura Welchia perfringens para el tipo toxigénico A, y W. agni para los demás gérmenes de la especie. En todo caso, el nombre universalmente aceptado, aunque no taxonómicamente válido, es el de C. perfringens, ejemplo de nomenclatura por el mandato de una entidad internacional (8). Fue escogido por la Comisión Permanente de Estándares de la Liga de las Na-

ciones de la Organización de la Salud en 1931.

El Clostridium perfringens está clasificado en la última edición del Manual Bergey (8) así:

Reino: Procaryotae

División II: Procaryotes indiferentes a la luz (Scotobacteria).

Clase I : Las bacterias. Partes 2-17.

Familia I : Bacillaceae .

Género III: Clostridium.

Grupo II : Espora subterminal, gelatina hidrolizada.

Especie 26: Clostridium perfringens (Bacillus perfringens - Veillon y Zuber 1898; Bacterium welchii. Migula 1900).

El mencionado manual reporta un tipo de Clostridium, similar en varias de sus características al C. perfringens, perteneciente al Grupo I: Espora subterminal, gelatina no hidrolizada; Especie 5: Clostridium paraperfringens (Nakamura, Tamai y Nishida, 1970).

Entre las dos especies descritas anteriormente, existe una serie de diferencias y similitudes que se presentan en la Tabla 1.

El C. perfringens se ha dividido en cinco tipos toxigénicos A, B, C, D y E, en

TABLA 1. Principales diferencias y similitudes de las especies de C. perfringens y C. paraperfringens

	<u>C. perfringens</u>	<u>C. paraperfringens</u>
Espora	Subterminal, oval	Subterminal, redonda Oval, excéntrica
Gelatina	Hidrolizada	No hidrolizada
Contenido de G + C en el DNA	24 - 27 moles %	28 moles %
Pared celular	Acido L.L. Diamino pemélico	Acido D.L. Diamino pemélico
Forma y Tamaño	Bacilos rectos 0.9 - 1.3 por 3.0 - 9.0 m	Bacilos rectos 0.9 - 1.3 por 1.6 - 3.9 m
Movilidad	No móvil	No móvil
Tinción	Gram positivos	Gram positivos, presentan gránulos
Producción Toxinas	Producción 5 tipos diferentes	No toxigénicos
Patogenicidad para animales y hombre	Patógeno	No patógeno
Aislado de	Suelo, sedimentos marinos, heridas, heces	Heridas, heces
Colonias en superficie	2 - 5 mm de diámetro	0.5 - 1 m de diámetro
Producción de H <sub>2</sub> S	Negativo	Positivo
Lecitinasa	Positivo	Positivo
Reducción Nitratos	Positivo o negativo	Positivo o negativo
Glucosa, Mannosa, Maltosa, Lactosa	Positivo	Positivo
Salicina	Variable	Positivo

base a una mayor producción de toxinas letales. Se conocía un tipo F, pero fue abandonado en la última clasificación del Manual Bergey (8), por presentar un comportamiento similar al tipo C.

Las toxinas del C. perfringens, A, B, C, D, E, representan un mosaico de diferentes antígenos, como lo muestra la Tabla 2 (4, 8, 9, 11, 12, 25, 36, 37, 38, 43, 51).

En los tipos A, B y C, existen grupos homogéneos que difieren de los tipos clásicos en detalles pequeños del mosaico antigénico, ecológico y epidemiológico pero se cree que no deben ser reconocidos como nuevos tipos ni alterar la clasificación, hasta que se proponga algún sistema para sustituir a la basada sobre toxinas principales (7, 37, 43).

Tipo A. El C. perfringens tipo A es la cepa clásica, aislada inicialmente en burbujas de gas en la sangre de cadáveres y más tarde, ampliamente estudiada como contaminante de las heridas de guerra (8, 12, 37, 38). Es un microorganismo muy ubicuo que suele encontrarse en el tracto intestinal de los animales, del hombre y en el suelo (8, 11, 37, 38, 39, 43, 51). Es el causante de algunos brotes de intoxicación alimenticia en el hombre (17, 24, 32, 44, 54, 56); puede causar infecciones en las heridas y puerperios de los animales (7, 11, 12, 37, 40, 43), y se considera como el agente etiológico de una forma de intoxicación en-

TABLA 2. Distribución de las toxinas entre los diferentes tipos de C. perfringens.

	ALFA	BETA	GAMMA	DELTA	EPSILON	ETA	THETA	IOTA	KAPPA	LAMBDA	MU	NU	ESPOROTOXINA (Enterotoxina)
TIPO A	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
TIPO B	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
TIPO C	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+
TIPO D	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
TIPO E	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-

CARAC- TERISTICA	TIPO A	TIPO B	TIPO C	TIPO D	TIPO E
Lecitinas, Hemolítica, letal, necrosante.	+	+	+	+	+
Letal, Necrosante, Ter- molábil.	-	+	+	-	-
Letal, Necrosante, Ter- molábil.	-	+	+	+	-
Hemolisina	-	+	+	+	-
Letal, Necrosante, Ter- molábil.	-	+	+	+	-
Letal, Necrosante	+	-	-	-	-
Hemolisina, Oxígeno- labil Termolábil	+	+	+	+	+
Letal, Necrosante	-	-	-	-	+
Colagenasa	+	+	+	+	+
Gelatinasa	-	+	-	+	+
Hialuronidasa	+	+	+	+	+
Deoxyribonucleasa	+	+	+	+	+
Vasodilatadora, Eritemal productora de Shock y de lesiones intestinales	-	-	+	-	-

Nota: + = Toxina producida.

- = No producida.

térica en ovejas y bovinos, caracterizada por hemólisis intravascular masiva, ictericia y hemoglobinuria (37).

Toxina-Alfa. La toxina principal del tipo A es la toxina- $\alpha$ ; todas las cepas de Clostridium perfringens la producen, pero el tipo A dá lugar a mayores cantidades de ésta. La toxina- $\alpha$  se ha identificado como una lecitinasa de tipo C y su acción hemolítica se relaciona posiblemente con la desintegración de los complejos proteína-lecitina en la superficie de los eritrocitos (36, 38, 51).

La lecitinasa actúa sobre la lecitina descomponiéndola es fosforilcolina y en diglicérido (12, 51). Una lecitinasa similar es producida por el C. bifermentans y su variedad patógena el C. sordellii (12).

La toxina-alfa puede ser demostrada cuando las células se encuentran en estado de crecimiento, en cultivos de pocas horas o varias horas de incubación. Se ha encontrado también en las esporas (51).

La gangrena gaseosa causada por microorganismos del género Clostridium se presenta esporádicamente en ovinos después de las prácticas de esquila, partos y por heridas post-operatorias. De las lesiones típicas, se han aislado diferentes especies de Clostridium, predominando C. septicum, C. chauvei, C. perfringens, C. sordellii y C. novyi. A la necropsia se presenta gangrena de la piel con ede-

ma de tejidos subcutáneo e intramuscular, hemorragias subserosas y depósitos de líquido sanguinolento en las cavidades torácica y abdominal (7, 11, 37, 38, 40).

El pH óptimo para la producción de la toxina- $\alpha$  es de 7 (50); Pivnick et al (49) encontraron que un pH de 6.7 fue óptimo para la producción de toxina- $\alpha$  por cepas del tipo C.

La actividad de los filtrados de cultivos para la toxina- $\alpha$ , pueden ser medidos por la habilidad de los filtrados para causar un incremento en la turbidez de la suspensión de yema de huevo o de suero humano, habilidad de los filtrados para lisar los glóbulos rojos, inyección intravenosa en ratón o inoculación subcutánea en conejos o cobayos para determinar su actividad in vivo (11, 16, 30, 32, 34, 36, 47, 51, 52, 58).

Es marcadamente hemolítica, aunque existe una considerable variación de una especie a otra en cuenta a susceptibilidad de células rojas (38, 51). La clasificación de Hobb's se basó en la sangre equina y la de este trabajo en ovina.

El pasaje de la toxina intacta a través del riñón puede ser una de las causas del daño renal presentado en algunas infecciones de C. perfringens (51).

CPS. Una toxina (CPS) extractada de células esporuladas de C. perfringens tipo A y purificada por GEL y cromatografía de intercambio iónico, se encontró que era en-

terotóxica en asas intestinales de conejos y mostró una toxicidad específica de 2.000 dosis Letal Ratón 50% (DLR<sub>50</sub>) determinada por Genigeorgis et al (23). Es una proteína homogénea libre de ácido nucleico, lípidos y con un peso molecular de 36.000 (26).

La "enterotoxina" (19, 24, 44) producida por C. perfringens (CPE) induce a la acumulación de líquido en asas intestinales, eritema en piel de cobayo, produce vasodilatación e hiperemia de los capilares e incrementa la permeabilidad capilar (44, 45, 47).

Según se verá su acción aunque históricamente de origen entero-intraluminal y quizá directamente de origen intestinal-intraluminal, es también de tipo sistémico-shock según se ha demostrado en las distintas especies (23, 28, 33, 35, 41, 42, 45, 46, 48). Torres-Anjel et al. (54) han sugerido que por esta razón el término enterotoxina debe evitarse y más bien usar el término esporotoxina (CPS), aprovechando su característica realmente única, de producirse exclusivamente durante la esporulación. En tal sentido se usará la sigla CPS a lo largo de este trabajo.

Homólogo a lo anterior existe un factor tóxico termolabil, que tiene la habilidad de producir diarrea en conejos y está asociado con la esporulación, está presente en filtrados de cultivo y extractos celulares de ciertas cepas de C. perfringens tipo A. Dicho factor se inhibe con pronasa, pero no con tripsina, lipasa o amilasa (19, 33). Se detectan entre 5 y 24 horas después de la inoculación en conejos y pierde ac -

tividad a pH 1,3,5,12 (19). Esta esporo-toxina ha sido experimentalmente estudiada en varias especies domésticas incluyendo ovinos (Tabla 3) tanto en su acción entero-intraluminal como en su acción sistémica por inyección intravenosa.

Recientemente 69 cepas de referencia de C. perfringens de diferentes tipos toxigénicos fueron analizadas para producción de enterotoxina. Se detectó producción de enterotoxinas solamente en cepas de los tipos A y C, aunque otros tipos están a la espera de ser confirmados (50).

Tipo B. El tipo B es el microorganismo originalmente obtenido por Dalling (citado por Marsh (40)) en casos de disenteria de corderos recién nacidos. La toxina difiere de las producidas por el tipo A por lo cual el germen fue designado con el nombre de Bacillus agni o de la disentería de los corderos.

Las toxinas de mayor poder letal en el tipo B son las Beta ( $\beta$ ) y epsilon ( $\epsilon$ ).

Toxina-Beta. La toxina beta es producida por los tipos B y C, es activa - mente necrosante y probablemente neurotóxica. Los tipos B y C, son los responsables de la enteritis necrótica en animales y hombre y la toxina- $\beta$  producida en el intestino, es probablemente la responsable de su inflamación.

Al igual que las otras toxinas de C. perfringens, es una proteína, siendo

TABLA 3. Efecto de la esporotoxina (enterotoxina) sobre los ovinos, inoculados experimentalmente.

RUTA INOCULACION	EFEECTO CLINICO	POST-MORTEN	HISTOPATOLOGIA	REFERENCIA
Oral Intraduodenal	Diarrea	N.D.*	No. lesiones visibles o Invasión de la mucosa por bacterias	Hauschild et al. (1967)
Intraluminal	Acumulación de líquido	N.D.	N.D.	Hauschild et al. (1968)
Intraluminal	Acumulación de líquido	N.D.	Líquido teñido de sangre, eritrocitos y células epiteliales. No invasión bacterial de la mucosa	Niilo (1971)
Intraduodenal	Acumulación de líquido	N.D.	N.D.	Niilo et al (1971)
Intraluminal (ASA)	Acumulación de líquido	N.D.	N.D.	Hauschild (1971)
Intravenosa	Diarrea transitoria, lagrimación, salivación, descarga nasal, flacidez, disnea, recuperación o muerte	Congestión en pulmón, hígado, bazo e intestino delgado y ciego, ascitis e hidrotorax. Ganglios linfáticos mesentéricos edematosos. Pronunciada hiperemia y pérdida parcial del epitelio de la mucosa (40%) intestinal, capilares en lámina propia distendidos con eritrocitos	N.D.	Niilo (1971)

Continuación Tabla 3.

RUTA INOCULACION	EFECTO CLINICO	POST-MORTEN	HISTOPATOLOGIA	REFERENCIA
Intravenosa	Hiperpnea, flacidez, disnea, salivación, descarga nasal, heces líquidas. Baja de presión sanguínea. Taquicardia y muerte.	Mucosa, extramadamente hiperémica en intestino delgado. Ausencia de lesiones en aparato respiratorio o sistema nervioso central.	N.D.	Niilo (1972)

\* N.D. = No existe descripción.

más susceptible a la acción de las enzimas proteolíticas que las otras toxinas (25, 38, 51).

Puede ser demostrada en el laboratorio en caldo de carne molida con 2% de peptona, 0,5% de fosfato de sodio y 1% de glucosa, ajustando el pH a 7.2, al incubar cepas de tipo B o C, usualmente 4 o 5 horas después de la misma (51).

El pH óptimo bajo condiciones controladas para la producción de la toxina beta es de 7,5 , según Pivnick et al, (49).

Toxina-Epsilon. La toxina epsilon no es hemolítica, pero es necrosante y susceptible al calor.

La toxina epsilon se produce solo en los tipos B y D, se forma durante el crecimiento activo bacteriano como una protoxina relativamente atóxica, que se convierte en una toxina fuerte por tratamiento con enzimas proteolíticas.

Puede ser demostrada en células vegetativas y esporas de cepas de tipo B y D. Alguna activación de la protoxina, puede ser producida por las enzimas proteolíticas Kappa y Lambda elaboradas por la bacteria en medios de cultivo. Sin embargo, se hace necesario tratar los filtrados de los cultivos con tripsina, para convertir la protoxina en toxina activa (12, 25, 37, 38, 51).

Su efecto patológico en el organismo, fue investigado por Griner (citado por Smith (51) ) quien comprobó que el sistema nervioso central era afectado inicialmente. Se presenta un aumento de la permeabilidad vascular del cerebro, seguido de un reblandecimiento y necrosis. La muerte generalmente ocurre en pocas horas después de los primeros síntomas de intoxicación. Otro efecto de la toxina epsilon en el cuerpo, y que es más importante en la patogénesis de la enfermedad causadas por cepas del tipo D, es la habilidad por incrementar la permeabilidad del intestino (5, 25).

Toxina-Theta. La toxina theta (  $\theta$  ), es producida por diferentes cepas de C. perfringens y es la responsable de la zona clara de hemólisis que rodea las colonias en placas de agar sangre. Es una enzima hemolisina oxigenolabil, letal y necrosante (12, 25, 38, 51) y ha sido recientemente caracterizada en cepas del tipo C (12, 38).

Toxina-Iota. La toxina iota (  $\iota$  ), se produce a partir de cepas del tipo E, como una protoxina no tóxica que puede ser activada por las enzimas proteolíticas producidas por ellas. Es una toxina antigénica, letal, necrosante que induce la permeabilidad capilar cuando se aplica dentro de la piel (25, 51).

Toxina-Kappa. La toxina kappa ( K ) es una enzima disolvente del colágeno producida por cepas de los tipos A, D y E y por algunas cepas de los tipos B

y C.

Toxina-Lambda. La toxina lambda ( $\lambda$ ) es una enzima proteolítica producida por algunas cepas de los tipos B, D y E.

Toxina-Mu. La toxina mu ( $\mu$ ) es una hialuronidasa producida por gran número de cepas del tipo A, D y E.

Toxina-Nu. La toxina nu ( $\nu$ ) es una enzima deoxyribonucleasa producida por todos los tipos de C. perfringens, exceptuando algunas cepas del tipo C aisladas de casos de enteritis necrótica de cobayos (12, 25, 36, 38).

Los C. perfringens producen además una variedad de compuestos activos biológicamente, enzimas, que se inactivan por calor y formaldehído y son antigénicas (12, 51).

Un resumen de los tipos de C. perfringens y sus toxinas se presentan en la Tabla 2.

2.2. Enfermedades de los ovinos causadas por C. perfringens.

2.2.1. Enterotoxemia producida por el C. perfringens tipo A.

La acción del C. perfringens tipo A en la patogenia de las enfermedades

de los animales domésticos es incierta debido a que este organismo forma parte de la flora bacteriana normal de las vías digestivas (9, 12, 22, 36, 37).

Sin embargo, se han tenido sospechas de que cepas de C. perfringens tipo A causan diarrea en casos naturales en corderos (37). También se ha citado como agente causal de enfermedades hemolíticas en las ovejas de Australia, en corderos de California y de ciertas enteritis hemorrágicas de corderos en el Reino Unido (37, 40).

En las formas hemolíticas, hay un comienzo brusco con depresión, colapso, palidez de las mucosas, e ictericia, hemoglobinuria y disnea; la temperatura unas veces es normal y otras veces sube a 40 C. Se presentan muertes rápidas y la mortalidad es elevada.

A la necropsia los animales presentan intensa ictericia, anemia, gran cantidad de fluido pericárdico, riñones oscuros, mostrando histológicamente hemoglobinuria y hemosiderosis (7, 37).

La acción de la toxina alfa ha sido considerada como relativamente insignificante en la enterotoxemia de los corderos.

La CPS producida por extractos de células de una cepa enteropatógena de C. perfringens tipo A, administrada intravenosamente a conejos, cobayos y corde-

ros dá lugar a diarrea transitoria, lagrimación, salivación, descarga nasal, flacidez y disnea una a cinco horas después de la inoculación. Dosis altas del inóculo causan una rápida presentación de los signos clínicos seguida de muerte. Exámenes a la necropsia revelan intensa hiperemia en la mucosa del intestino delgado y ligera congestión del hígado, pulmones, bazo y riñones (44).

La CPS actúa sobre el intestino delgado causando incremento en la permeabilidad capilar, vaso-dilatación e incremento de la motilidad intestinal (34, 35, 44, 45). El origen de esta acción ha sido recientemente asignado a la CPS.

El resultado de la hiperemia intestinal puede ser atribuida a una fuerte predilección de la CPS por los capilares intestinales, produciendo vasodilatación e hipotensión secundaria (46).

La CPS administrada por la vía intravenosa causa una caída brusca de la presión. Cuando se administra en dosis bajas es reversible, las dosis altas producen en las ovejas hipotensión irreversible y muerte (45).

#### 2.2.2. Enterotoxemia producida por C. perfringens tipo B.

Esta enfermedad conocida como disentería de los corderos, fue la primera de las enterotoxemias descritas en animales domésticos (40). El microorganismo se ha encontrado hasta ahora en corderos, terneros y potros en el Reino Unido, en

orderos en Africa del Sur, Estados Unidos y ovinos y cabras de Iran (37, 40). En los grupos afectados las crias pueden sufrir mortalidad hasta del 75%. Es una enfermedad recurrente con la tendencia a aumentar la morbilidad y afectar a los animales cada vez más desarrollados hasta de 3 semanas (40).

El síndrome de la disentería aguda de los corderos se manifiesta ordinariamente antes de cumplir 2 semanas de edad, con posibilidad de presentar una forma sobreaguda. En la forma aguda el cordero presenta dolor abdominal, decúbito prolongado indiferencia para mamar y expulsión de heces líquidas, parduzcas y hemorrágicas (7, 25, 37, 40).

A la necropsia se presenta una enteritis hemorrágica extensa con ulceraciones discretas y confluentes, que se desarrollan cuando el curso de la enfermedad es crónico. En casos sobreagudos puede haber solamente pequeñas placas de necrosis, contenido serosanguinolento en cavidad peritoneal y a veces peritonitis. El hígado es pálido y friable o congestionado y los pulmones congestionados y edematosos.

### 2.2.3. Enterotoxemia producida por el C. perfringens tipo C.

McEwen y Roberts (citados por Marsh (40) ) describieron, bajo el nombre de "pasma" (struck) una enfermedad del ganado lanar aparecida en los ovinos Rom-

ney-Marsh en Inglaterra. El mal atacaba a los ovinos adultos, causándoles la muerte repentina (37, 40).

Griner y Johnson (citados por Marsh (40) ) describieron casos de enterotoxemia hemorrágica en corderos recién nacidos, causada por la toxina elaborada por el C. perfringens tipo C. Quesada (citado por Marsh (40) ) describió dos tipos de síntomas, el comatoso y convulsivo, con fiebre alta y muerte rápida, en animales adultos.

A la necropsia, la cavidad peritoneal presenta exceso de líquido claro, los vasos peritoneales y el intestino delgado se presentan congestionados y puede haber múltiples hemorragias subperitoneales. El intestino delgado esta intensamente congestionado y en las zonas de congestión se presentan úlceras que varían de tamaño. El intestino grueso se encuentra aparentemente normal. Las lesiones en los otros órganos son propias de una grave toxemia, los músculos aparecen blandos y con tonalidad rosácea o negra y se muestran enfisematosos (7, 25, 37, 40, 51).

#### 2.2.4. Enterotoxemia causada por C. perfringens tipo D.

Esta enfermedad se presenta en los ovinos de todas las edades, pero en especial en corderos.

Gill(citado por Marsh (40) ) parece haber sido el primero en estudiar la

enfermedad en los corderos, a la cual dió el nombre de "riñón pulposo", también se conoce con el nombre de la enfermedad de la "sobrealimentación" (37, 40, 51).

Es un proceso importante de los ovinos donde quiera que estos se crien y afecta principalmente a los corderos lactantes y a los destetos en lotes de engorde (37, 40). El curso de la enfermedad en la mayoría de los casos es sobreagudo y el animal es hallado muerto. Se aprecia que los animales mueren en pocos minutos, presentando estados convulsivos; en los ovinos adultos, en los cuales el curso es subágudo, se presenta diarrea con eliminación de heces oscuras (7, 37).

En algunos corderos sospechosos de sufrir tal afección en la forma subáguda, pueden persistir signos neurológicos consistentes en ceguera, ataxia, paresia del tren posterior. A la necropsia los cadáveres presentan buen estado de carnes. La putrefacción se presenta más rápidamente que de costumbre. En la forma sobreaguda no se observan lesiones macroscópicas, con frecuencia se encuentra una excesiva cantidad de líquido pericardico, congestión y edema pulmonar, espuma en todo el tracto respiratorio y hemorragias en endocardio. El hígado puede aparecer congestionado y el bazo aumentado de tamaño y pulposo, no existiendo inflamación gastrointestinal visible a la necropsia. Tramos cortos del intestino delgado se encuentran distendidos por gas y enrojecidos por hiperemia. Los riñones aparecen tumefactos y la superficie de corte se abomba y la corteza se muestra congestionada,

se reblandecen rápidamente y en espacio de uno a dos horas se convierten en una masa roja de aspecto gelatinoso (7, 37, 38, 40, 51).

Las lesiones encefálicas que se producen en corderos con enterotoxemia de este tipo y que no siguen un curso fatal inmediato pueden ser de hemorragias y reblandecimiento de los ganglios basales, cápsula interna, tálamo dorsolateral y sustancia gris, o presentar una lisis y licuefacción de la sustancia blanca (37).

Se presentan anomalías bioquímicas significativas en los ovinos, que en parte se explican como anhidremia. Hay un incremento en la concentración de hemoglobina, glucosa hemática, nitrógeno no protéico y cloruros en el plasma (36, 37, 38, 51).

#### 2.2.5. Enterotoxemia causada por C. perfringens tipo E.

Este tipo toxigénico fue aislado de un ternero que padecía de una entidad semejante a la enterotoxemia y que a la necropsia se caracterizaba por enteritis aguda, hemorragia pericárdica y hemorragias en las serosas (37).

#### 2.3. Enfermedad experimental y técnica del asa intestinal.

El C. perfringens inoculado dentro del tracto digestivo de corderos produce estado de diarrea; cepas de C. perfringens tipo A. causan diarrea experimental en corderos, sugiriendo que dichas cepas pueden estar involucradas en casos naturales de

diarreas en corderos (30). Entre 6 a 12 horas después de la inoculación de células de C. perfringens tipo A, responden los animales con presentación de diarrea, la que persiste unas 13 horas, independientemente de la vía de administración, (vía oral o intraduodenal) (30, 34).

La enfermedad puede ser reproducida experimentalmente en corderos cuando el C. perfringens tipo A se inocula en forma de extractos celulares por vía oral o intraduodenal. Experimentos con corderos muestran que la mucosa intestinal permanece intacta y parece no ser invadida por células de C. perfringens tipo A durante la enfermedad entérica (30).

El C. perfringens tipo D, por otro lado, aunque capaz de causar enterotoxemia en ovejas y cabras, no ha mostrado ser capaz de producir una reacción utilizando la técnica de asas intestinales ligadas (21).

El pH del líquido en el intestino delgado no se altera después de la infección con C. perfringens, se mantiene entre 7,05 - 7,6 (34).

Cambios en el pH del líquido intestinal pueden resultar de la producción de ácidos orgánicos y se pueden excluir como causa de diarrea (44).

La enteritis experimental en corderos es causada por un factor entérico que resulta de la infección del intestino delgado con células vegetativas de C. perfringens

y que es producido in situ.

Administraciones experimentales intravenosas en corderos, de extractos celulares de C. perfringens tipo A desarrollan diarrea transitoria, lagrimación, salivación, descarga nasal, flacidez y disnea 1 a 5 horas después de la inoculación (44, 46).

Cepas clásicas de C. perfringens capaces de producir pequeñas o grandes cantidades de toxinas alfa, no causan un efecto enteropatogénico observable (48).

La secuencia de eventos relacionados con el envenenamiento de tipo alimentario del C. perfringens parece ser: a). Ingestión de alimentos contaminados con gran número células vegetativas de C. perfringens. b). Multiplicación y esporulación del C. perfringens en el intestino delgado. c). Producción de CPS asociada por la esporulación y liberación de la toxina por las células autolizadas. d). Incremento de la permeabilidad capilar y vasodilatación en el intestino y probablemente incremento de la movilidad intestinal. e). Acumulación de exceso de líquido en el lumen intestinal resultando en diarrea (24, 35, 44).

La técnica de las asas ligadas del intestino delgado (AL) de conejos han sido usadas para estudiar la enteropatogenicidad del Vibrio cholerae (13) y Escherichia coli (53).

Suspensiones frescas de medio donde se encuentran C. perfringens tipo A se

inocularon dentro de asas intestinales ligadas de corderos. 7 horas después de inoculadas se incrementa el volumen del líquido unas 7 veces con respecto a los controles negativos (30).

Experimentos con asas intestinales ligadas de corderos han servido para demostrar la acción del factor enteropatogénico sobre la pared intestinal debido a que la acumulación de líquido ocurre en los segmentos intestinales infectados con C. perfringens pero no en las asas adyacentes que sirven de control (31).

La acumulación de líquido en las asas ligadas intestinales de cordero, después de la inoculación intraluminal de cultivos de C. perfringens tipo A fueron influenciados marcadamente de acuerdo al método utilizado en la preparación de los inóculos (21). Cultivos crecidos por 4 horas a 37 C producen exudación de líquidos y consecuente dilatación de los segmentos ileos (21, 33). El grado de líquido acumulado en las asas intestinales de corderos y la apariencia del líquido corresponde con la extensión de la mucosa afectada (18, 44).

Las asas ligadas de intestino de cordero, no revelan pérdida de la superficie del epitelio y no se presenta hiperemia aparente (44).

La técnica de las asas es requerida para el estudio de la función de la toxina y para el estudio del mecanismo de acción enterotóxico (32).

Un resumen de los hallazgos en AL en ovinos se muestra en la Tabla 3.

2.4 Reproducción y caracterización histopatológica de las lesiones producidas por C. perfringens por medio de la prueba histoquirúrgica del asa intestinal.

Animales ovinos utilizados en el experimento citado por Hauschild et al. (33) fueron confinados en corrales separados y alimentados con una dieta de alfalfa de buena calidad, libre de mezcla de sales de yoduro de cobalto. Los animales estaban libres de parásitos. Se mantuvieron en ayuno por tres días y se les suministró agua solamente en el segundo día. Bajo anestesia local y con una laparotomía en la línea media se realizó la intervención asépticamente.

De un punto a un metro del ciego y procediendo anteriormente se hacen ligaduras de segmentos de 15 a 20 centímetros de longitud en ileon y yeyuno, utilizando hilo sintético de satura. Las ligaduras se hicieron de tal forma, que no se interfiriera el flujo de sangre de los vasos mesentéricos, para cada una de las asas. El inóculo se inyectó en asas alternas. El abdomen se saturó y los animales se sacrificaron y examinaron a las 7 y 16 horas.

Exámenes histológicos del intestino de los ovinos no mostraron lesiones hipertróficas o invasiones de la mucosa por células bacterianas de C. perfringens (33, 44).

Exámenes histológicos revelaron en yeyuno e ileon después de la inoculación de extractos celulares de C. perfringens tipo A, hiperemia pronunciada y pérdida parcial del epitelio de la mucosa. Vasos y capilares en la lámina propia se presentaron disten-

didados (41, 42, 44).

Dosis diferentes de enterotoxina causan algún grado de daño del tejido intestinal, la severidad de la respuesta aumenta con la dosis aplicada (41, 42).

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Población muestreada.

Para establecer los recuentos bacteriales de C. perfringens en el intestino de los ovinos se tomaron al azar 100 semovientes recién nacidos, de las diferentes razas existentes en la granja "San Jorge"\*; a los cuales se les tomaron muestras individuales de materia fecal en seis oportunidades, con intervalos de treinta días.

Los animales seleccionados se mantuvieron en los potreros, en condiciones de manejo y prácticas sanitarias idénticas al resto del aprisco.

Como posibles predisponentes para la patogenización del C. perfringens en el intestino, se evaluaron las condiciones sanitarias, los estados de manejo y las condiciones demográficas del aprisco; se procesaron dichos datos por medio de programas BMD (15) adaptados por Torres-Anjel et al. (56) para estudios epidemiológicos.

Se tomaron datos de la finca y del animal cada vez que se programaron recolecciones de muestras y se consignaron en un formulario previamente elaborado, según se describe en la Tabla 4.

-----

\* Soacha, Cundinamarca, Colombia, propiedad del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA.

TABLA 4 . Formulario diseñado para la recopilación de datos demo-geográficos de las granjas ovinas a estudiar.

---

Fecha: \_\_\_\_\_ No de Orden: \_\_\_\_\_

Hacienda: \_\_\_\_\_ Municipio: \_\_\_\_\_ Departamento: \_\_\_\_\_

Altitud: \_\_\_\_\_ Temperatura: \_\_\_\_\_ Tipo de Explotación \_\_\_\_\_

Población animal: \_\_\_\_\_ Especie: \_\_\_\_\_ Raza: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_ No. de Registro: \_\_\_\_\_ Estado de Carnes: \_\_\_\_\_

Sistemas de pastoreo: \_\_\_\_\_ Rotación de potreros \_\_\_\_\_ Tipo de pastos \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Sales minerales: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Concentrados: \_\_\_\_\_

Vacunaciones: Aftosa \_\_\_\_\_ Clostridium (Omnivax) \_\_\_\_\_

Tratamientos recibidos: \_\_\_\_\_

Tipo de muestra recolectada: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

Fecha de procesamiento: \_\_\_\_\_ Dilución de la muestra: \_\_\_\_\_

Resultados: Recuento total de colonias de C. perfringens por gramo de muestra en el Medio Básico perfringens \_\_\_\_\_

Medio Lactosa \_\_\_\_\_ Motilidad \_\_\_\_\_ Nitratos \_\_\_\_\_

Proporciones confirmadas \_\_\_\_\_

Prueba de Sero-Toxi - neutralización \_\_\_\_\_

Observaciones: \_\_\_\_\_

---

Se enfatizó particularmente con respecto a los datos sobre manejo de animales, alimentación, administración de preventivos (vacunas) buscando detectar causas predisponentes en la patogenización de los gérmenes toxigénicos presentes en la flora normal intestinal de los ovinos.

Se estabularon 10 animales (que fueron luego utilizados para las prácticas post-mortem y quirúrgicas) y se estudiaron sus materias fecales, para detectar cualquier posible cambio en los recuentos de C. perfringens, cuando los ovinos son sometidos a confinamiento y se alimentan con pasto de corte. Para esta época los animales tenían ya 8 meses de edad.

También se trabajaron las muestras de materias fecales para detección de parásitos gastrointestinales por el método de Sloss (6).

### 3.1.1. Muestreo.

La primera muestra se condicionó a la época de mayor número de nacimientos de dicha granja y solamente se muestrearon animales que en el día de iniciar los chequeos, tenían una edad inferior o igual a siete días de nacidos, con el objeto de completar un total de 100 animales. Desde el primer día se registraron sus números de marca, su raza y su sexo (Tabla 5).

La distribución por edades al momento del primer muestreo de los animales,

TABLA 5. Distribución de raza y sexo en 100 ovinos infantes seleccionados para establecer prevalencia y cuantificación de C. perfringens en heces.

SEXO	R a z a s					Total y %
	Corriedale	Criolla	Rambouillet	Romney Marsh		
				Puro	Mestizo	
MACHOS	5231	5823	5001	5409	5645	38 (38%)
	5239	5825	5003	5411	5651	
	5241	5827	5005	5415	5653	
	5247	5829	5007	5421	5655	
	5249	5831	<u>4</u>	5243	5657	
	5251	5833	(10.52%)	5425	5659	
	Total* 6	5835		5427	5665	
	**15.76	5837		5429	5669	
		5839		5431	5685	
		<u>9</u>		<u>-35</u>	<u>9</u>	
		23.68%		(26.31%)	(23.68%)	
	HEMBRAS	5204	5818	5004	5410	
5206		5822	5008	5414	5690	
5208		5824	5010	5416	5692	
5216		5826	<u>3</u>	5418	5694	
5218		5830	(4.83%)	5420	5696	
5226		<u>5</u>		5424	5698	
5228		(8.06%)		5426	5698	
5234				5428	5700	
5236				5430	5710	
5238				5432	5712	
5240				5434	5714	
5242				5436	5716	
Total*12			5438	5718		
**19.35			5442	5720		
			<u>14</u>	<u>28</u>		
			(22.58%)	(45.16%)		

\* Con respecto a los 100 animales investigados.  
 \*\* Dentro del sexo.

se describe en la Tabla 6.

La muestra se tomó directamente del recto del animal, mediante el uso de guantes quirúrgicos. Cada muestra se colocó en un tubo de vidrio con tapa de rosca de tamaño 160 x 16 mm, previamente esterilizado, pesado (para por peso diferencial conocer el peso de la muestra) y rotulado.

Las muestras se recolectaron siempre en las horas de la mañana con el fin de evitar pérdidas de material o muestreos incompletos.

### 3.2. Caracterización e identificación de C. perfringens.

En el laboratorio, se trabajaron las muestras de acuerdo a su peso (un gramo) y se suspendieron en solución bufferada fosfatada con 0,1% de peptona (Difco), y de Tritón X-100 (Rohm and Haas, Philadelphia), ajustada a un pH 7,6 (1). A esta solución se le llamó PTX.

En el recuento de C. perfringens se utilizó el Medio Básico perfringens (MBP), una modificación del medio Shahidi-Ferguson perfringens (SFP), según Alvarez et al. (1) con la siguiente composición: Tiosulfato de sodio\* 0,1%; agar (Difco), 2,0%; tryptosa (Difco), 1,5%; extracto de levadura (Difco), 0,5%; sulfato férrico

-----  
\* Modificaciones al SFP.

TABLA 6. Distribución de edades durante el primer muestreo de heces para aislamiento de C. perfringens.

Edad (días)	* Número de animales (f)	f. x.
< 1 (0)	23	0
1	17	17
2	19	38
3	10	30
4	8	32
5	7	35
6	12	72
7	4	28

\* Corresponde también a porcentaje (%) por ser 100 los animales muestreados.

$$\bar{X} = 2,52; S^2 = 21.74; S = 4.66$$

co de amonio, 0,1%; agua destilada 900ml; ajustada a un pH de 7,6 .

Se sembró la muestra en dilución  $10^{-1}$ , en cantidad de 1 ml empleando el sistema de "emparedado" (55) con capas de MBP, en fondo y superficie. En la capa intermedia se inoculó la muestra y se homogenizó con el MBP fundido a 60 C, más la emulsión de yema de huevo al 10% (se preparó 50% de yema de huevo y 50% de PTX, pH 7,6\* se adicionó a ésta sulfato de kanamicina\* (0,24 mgr/ml de medio) para evitar contaminantes y favorecer el crecimiento de C. perfringens. Se incubó en estufa de anaerobiosis a 37 C con 10% de CO<sub>2</sub>, por 24 hr (1, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 22, 38, 43, 51).

Antes de sembrar las muestras, se calentaron a 80 C por 10 min. para informar resultados en términos de recuentos de esporas (1, 34).

Se procedió a realizar el recuento de colonias que presentaron H<sub>2</sub>S positivo (punto negro) y lecitinasa positivo (halo-opoco de precipitación alrededor de la colonia). Una típica reacción en MBP se ilustra en la Figura 1 (1, 2, 4, 8, 9, 12, 16, 22, 25, 26, 36, 38, 40, 47, 58).

El esquema del procesamiento del recuento de colonias de C. perfringens se presenta en la Figura 2.

La confirmación bioquímica se realizó mediante la inoculación de las colo-

\* Modificaciones al SFP.

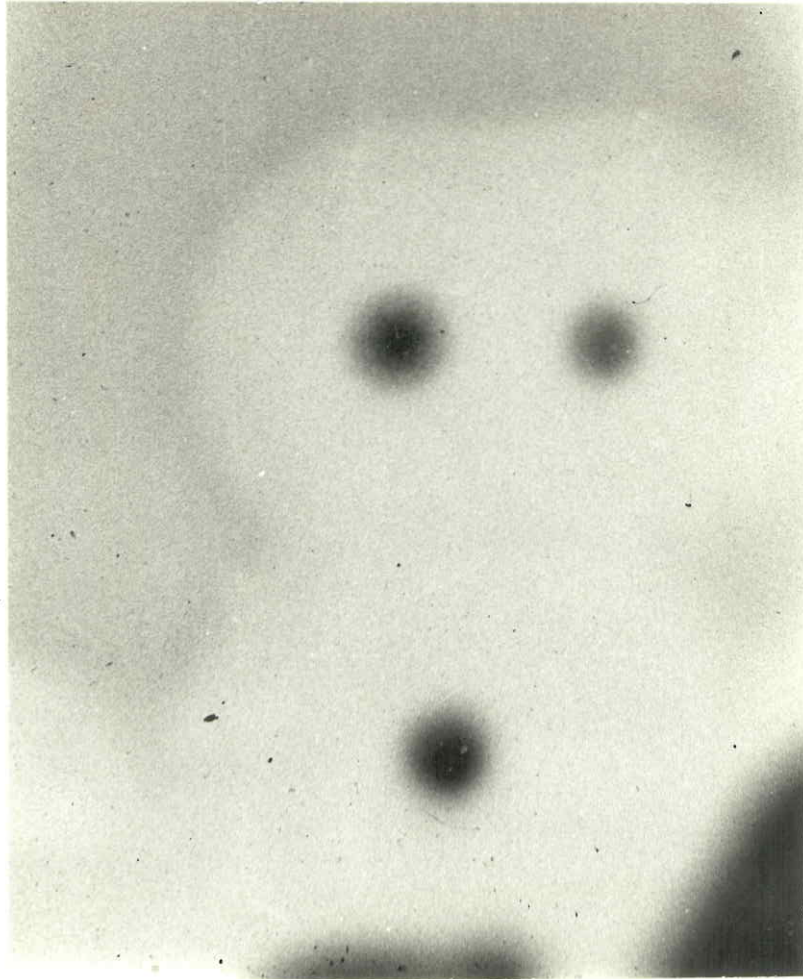


FIGURA 1. Reacción típica del C. perfringens en el medio básico perfringens.

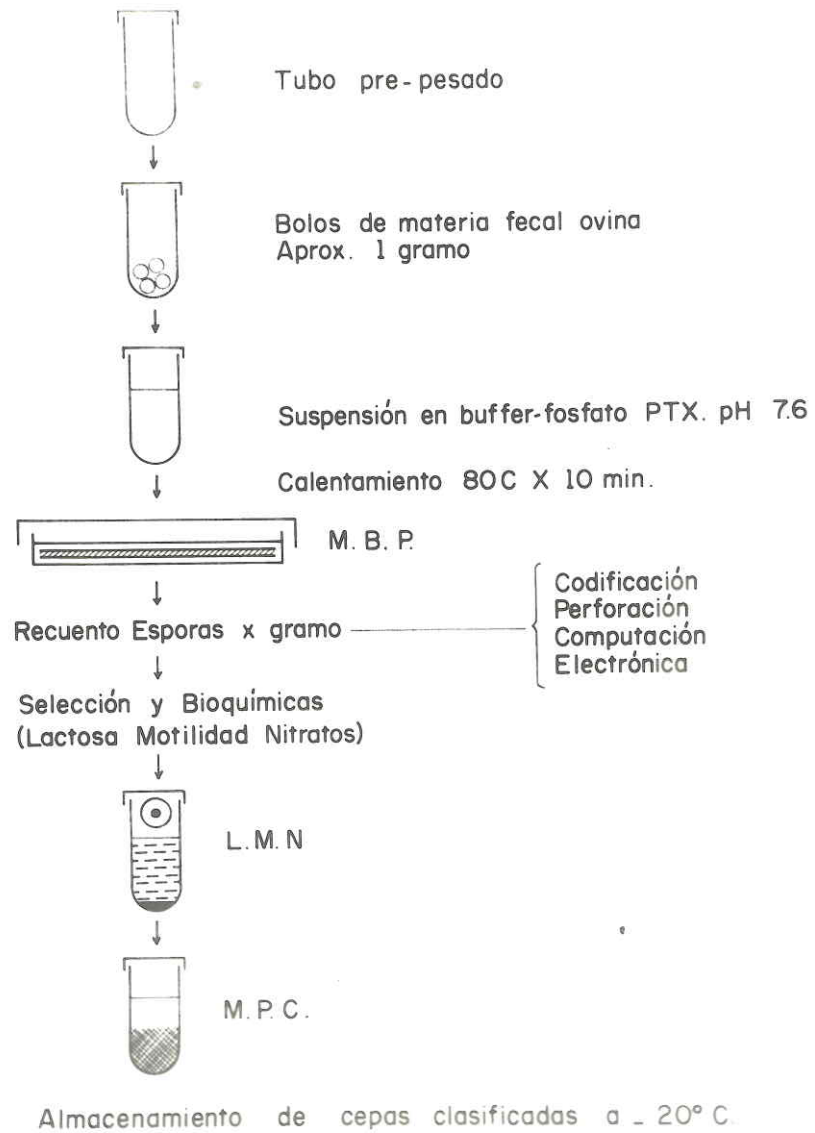


FIGURA 2. Procesamiento de las muestras de heces para el recuento de colonias de C. perfringens

nias típicas crecidas en el medio MBP, en tubos que contenían medio Lactosa-Motilidad-Nitrato (LMN) previamente sometidos a ebullición; el número de colonias a ser estudiadas por tubo de LMN, se determinó según el esquema de Torres-Anjel (54).

El medio LMN es una modificación del medio Lactosa-Motilidad (LM), según Alvarez et al. (1) compuesto de: triptosa (Difco) 1,5% ; extracto de levadura (Difco), 1,0%; lactosa (Difco), 1,0%; fosfato de sodio, 0,1%; nitrato de potasio, 0,1%; rojo fenol, 0,005%; agar (Difco), 0,3%; pH de 7,5.

Mediante la utilización del medio LMN, se confirmaron como C. perfringens aquellas cepas que presentaron reacción positiva en lactosa (ácido +, gas +), motilidad negativa (colonias aisladas flotando en el medio), y nitrato positivo, mediante la adición de los reactivos clásicos (14), después de una incubación en estufa de aerobiosis a 37 C por 48 hr. Un típico resultado de un tubo de LMN se muestra en la Figura 3. Se utilizó el medio agar nitratos (Difco) (AN), para confirmar la reacción de reducción de los nitratos.

A partir de las cepas aisladas en el medio LMN, se tomaron con pipeta Pasteur las colonias que sedimentaron en el tubo y se sembraron en agar sangre de ovino (ASO) al 5% (líquido Alsever)\* 10% y sangre de ovino 90%). El agar base es-

\* Citrato de sodio 12 gr; cloruro de sodio 4,2 gr; dextrosa 20,5 gr; agua destilada 1000 ml.

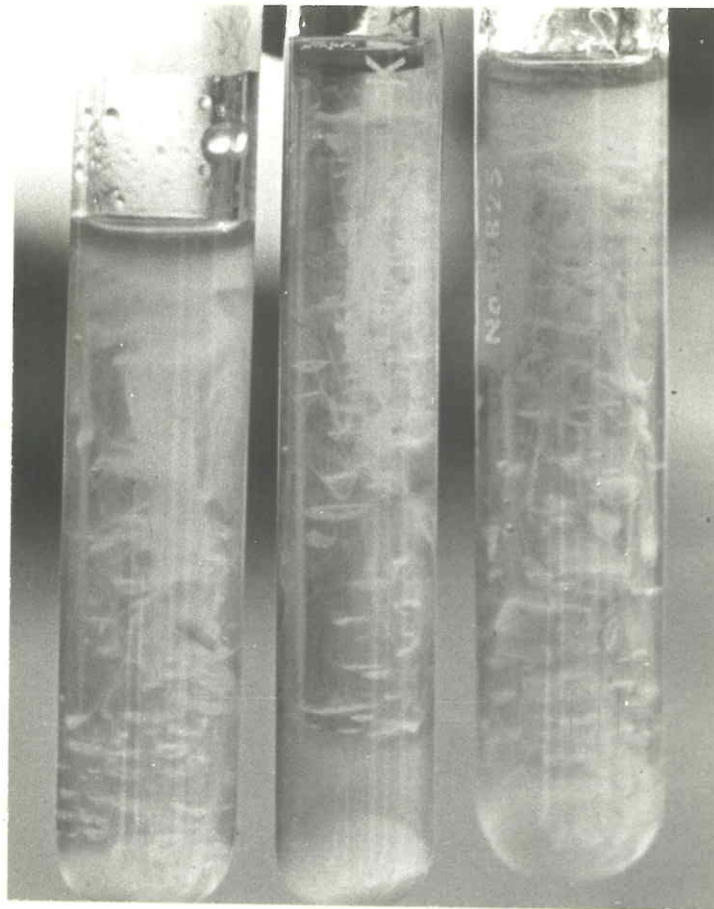


FIGURA 3. Reacción de C. perfringens en el medio Lactosa Motilidad Nitrato.

taba compuesto de: agar agar (Difco), 1,5%; caldo nutritivo (Merck), 1,5%; extracto de carne (Difco), 0.3%; agua destilada 100 ml. Se incubaron en estufa de anaerobiosis a 37 C por 24 hr, y se estudió la capacidad de producir hemólisis  $\alpha$  y  $\beta$  de cada una de las cepas, según esquema mostrado en la Figura 4.

Se seleccionaron seis cajas que en el momento de realizar los recuentos en el medio MBP presentaron de 20 a 35 colonias aisladas por caja, con el objeto de estudiar las características individuales en el medio MBP y la relación de dichas características con el grado de hemólisis en el medio ASO.

Para estudiar la toxigenicidad de las cepas confirmadas bioquímicamente y analizadas por la capacidad de producir hemólisis  $\alpha$  y  $\beta$ , se pasaron al Medio Pedazos de Carne (MPC) colonias que en el medio ASO presentaron hemólisis  $\alpha$  y  $\beta$  (Figura 5).

El medio MPC está compuesto de: carne de bovino molida 49,5%; extracto de levadura (Difco), 5%; dextrina (Difco), 0,1%; agua corriente 100 ml; ajustado a un pH 7,5.

El MPC inoculado con las cepas  $\alpha$  y  $\beta$  hemolíticas se incubó a 37 C por 18 hr en estufa de aerobiosis, para la producción de toxinas de C. perfringens y la detección de las mismas mediante la prueba de la Sero-toxi-neutralización en ratones blancos suizos de 30 g de peso, utilizando la vía intraperitoneal, según esquema presentado

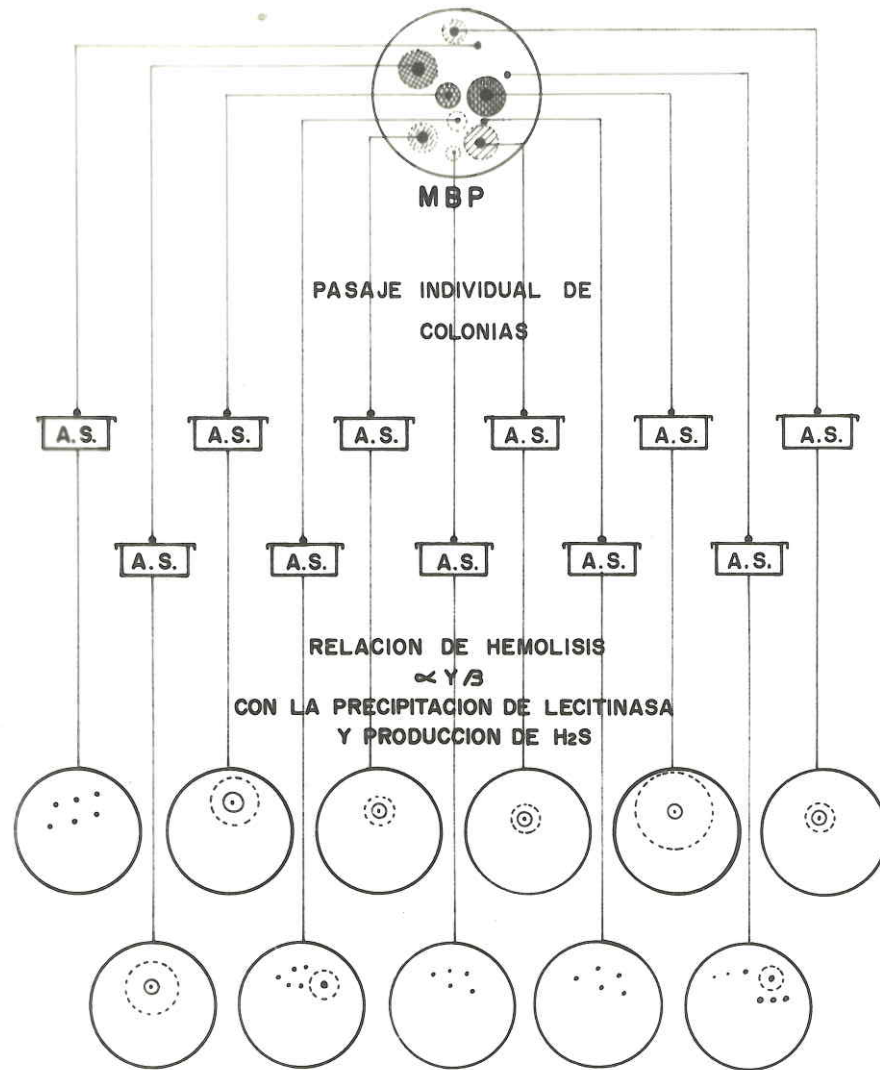


FIGURA 4. Relación de la producción de lecitinasa y la capacidad hemolítica de cepas crecidas en el medio básico perfringens.

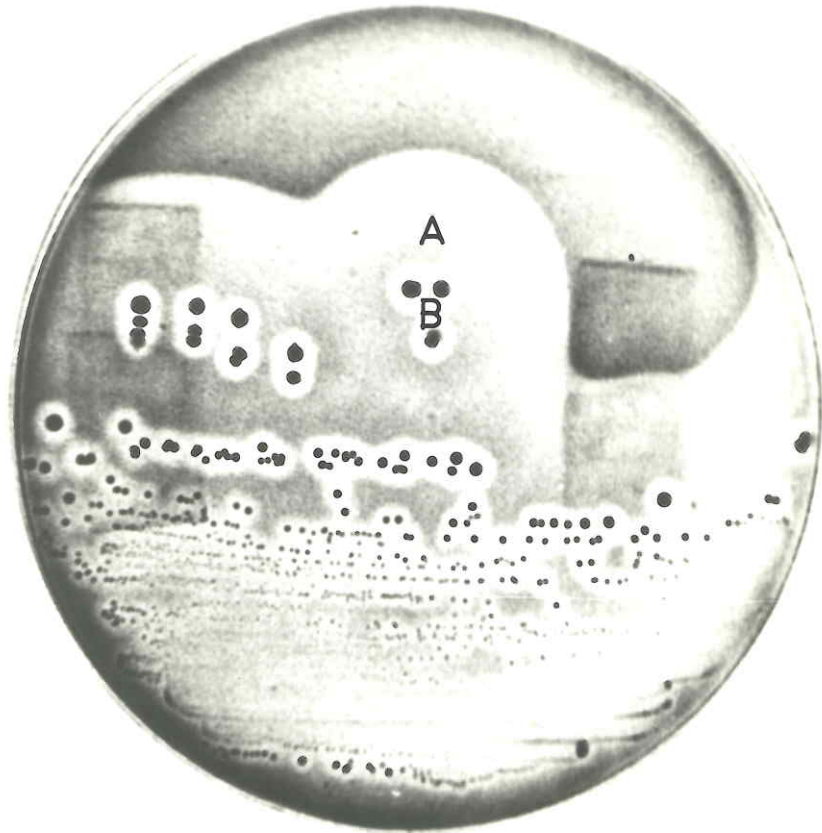


FIGURA 5. Reacción típica del C. perfringens en el agar sangre de ovino.  
Hemólisis alfa (A), Hemólisis beta (B).

en la Figura 6.

Se emplearon antisueros específicos contra C. perfringens tipo A\* y se trabajó un 20% de las cepas aisladas.

Los ratones inoculados se marcaron en la cola, mediante el empleo de líneas circulares, usando marcadores de felpa de tinta-solvente, identificando los controles con un número impar de líneas y los animales inoculados con un número par.

El suero que fue inoculado en los animales controles, se procesó a partir de un suero equino esteril en cantidad de 10 ml más 0,1 ml de esporas sonicadas de C. perfringens tipo A\*\*; se incubó a 37 C por 24 hr y centrifugó a 5.000 RPM por 30 min; se agregaron reactivos para neutralizarlo y preservarlo según Figura 6.

Los resultados se interpretaron a las 24 hr de acuerdo a la Tabla 7.

### 3.3. Procesamiento de datos.

Los datos obtenidos en la evaluación de las condiciones de manejo, sanitarias y demográficas, y los datos de los diferentes recuentos se tabularon y procesaron por medio de programas BMD.

-----  
\* Burroughs Wellcome and Co., New York, N.Y., subsidiaria de Burroughs Wellcome, Beckerham, Kent, England.

\*\* Donación de la Unidad de Microbiología Fac. Med. Vet. Zoot. U.N.

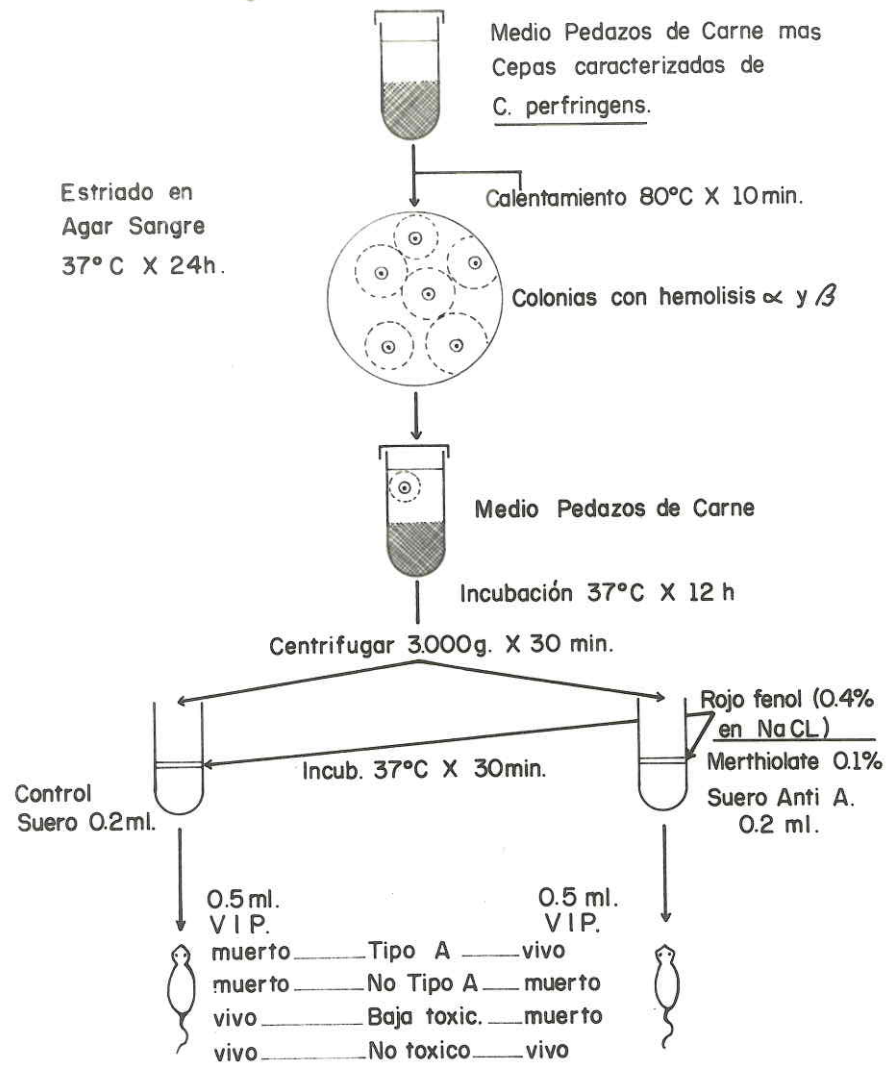


FIGURA 5. Esquema de procedimientos seguidos en la prueba de la sero-toxi-neutralización.

TABLA 7 . Tipificación de C. perfringens por medio de Serotoxineutralización.

Ratón inoculado con: Antisuero <u>C. perfringens</u>	Ratón inoculado con: Suero Control	Resultado <u>C. perfringens</u> tipo:
Tipo A		
V (Vivo)	M (muerto)	Tipo A
M	M	Tipo distinto al A
V	V	No tóxico

Nota : El resultado ratón Anti A (M) y Control (V) no debe ocurrir. De suceder indica contaminación del cultivo y debe repetirse. La más frecuente ocurrencia se debe a contaminación en Streptococcus tipo D (fecalis).

Para el análisis de los datos de los hallazgos bacteriológicos, se montaron las siguientes técnicas estadísticas, programas 02R, Regresión múltiple por pasos; 05D, Descriptivo con histogramas; también se montó el programa 07M, Discriminatorio por pasos, para enfrentar los datos demográficos a los datos bacteriológicos (15).

Los datos se procesaron en un computador IBM 360/44\*.

#### 3.4. Seguimiento prospectivo de una población cohorte de ovinos infantiles con respecto al C. perfringens.

Registrados los datos de los diferentes recuentos de C. perfringens de cada uno de los animales (de acuerdo con el número de colonias, la dilución y el peso de la muestra), se procedió a convertirlos en datos logarítmicos en base 10 ( $\text{Log}_{10}$ ), según esquema de la Figura 7.

Con los 600 datos tabulados y las seis variables correspondientes a cada muestreo, se realizaron diferentes análisis estadísticos basados en la infección por C. perfringens del intestino de los ovinos y las posibles variaciones de los recuentos de acuerdo a la edad de los animales.

---

\* Centro de Cálculo Electrónico. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá

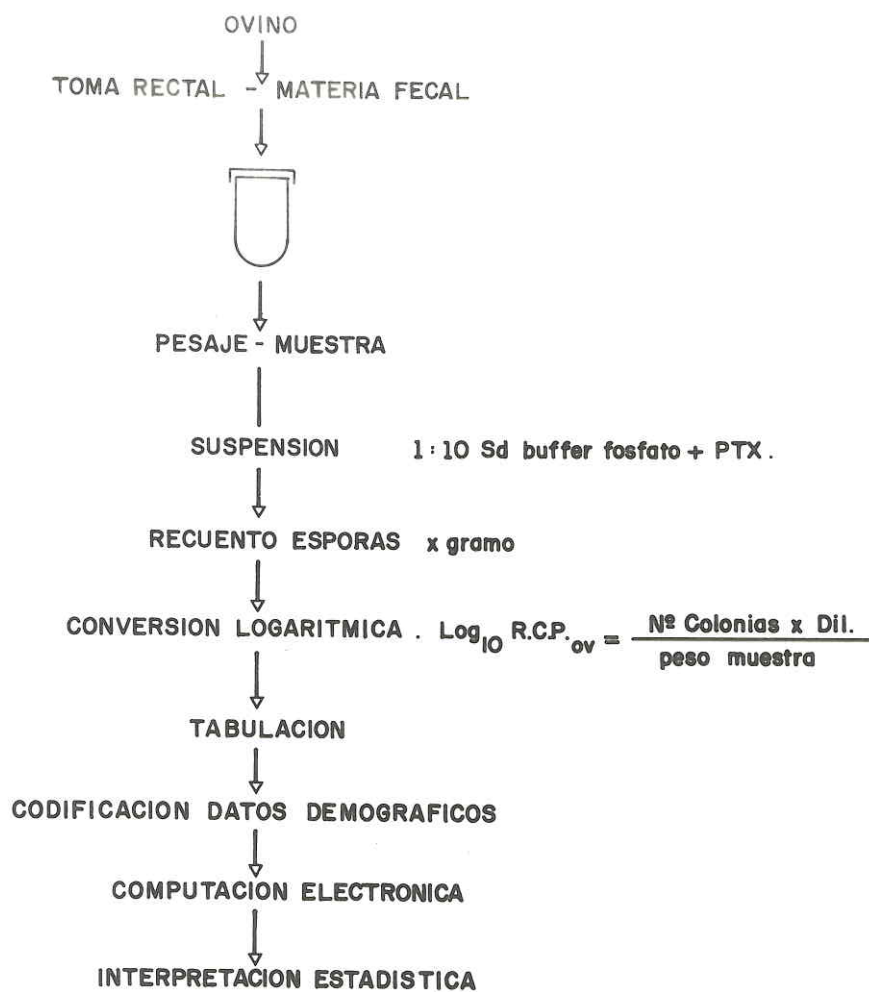


FIGURA 7. Esquema del procesamiento de datos según los recuentos.

3.5. Localización cualitativa y cuantitativa del C. perfringens en las diferentes porciones del sistema digestivo ovino.

Se sacrificaron (por choque eléctrico) uno a uno, seis de los ovinos jóvenes alimentados en estabulación con pastos de corte fresco.

El material recolectado (contenido del sistema digestivo) se guardó en tubos con tapa de rosca esterilizados, prepesados y rotulados y se procedió de acuerdo con el esquema de la Figura 8.

Cada porción del sistema digestivo, fue ligada por sus extremos, para evitar contaminación externa, manipulando al mínimo las vísceras, para prevenir desplazamiento del contenido, y ser causa de error.

Se muestrearon boca, esófago, hígado, vesícula biliar, antes de empezar a recolectar muestras de los estómagos e intestinos, según Figura 9. Se tomaron muestras por duplicado, de las diferentes porciones en que se había dividido el sistema digestivo.

Para la estratificación cualitativa, se sembró 1 ml de muestra sin diluir, según la técnica descrita en 3.2., pero sin someter la muestra a calentamiento previo a 80 C.

Para la estratificación cuantitativa, se diluyeron las muestras, se homogeni-

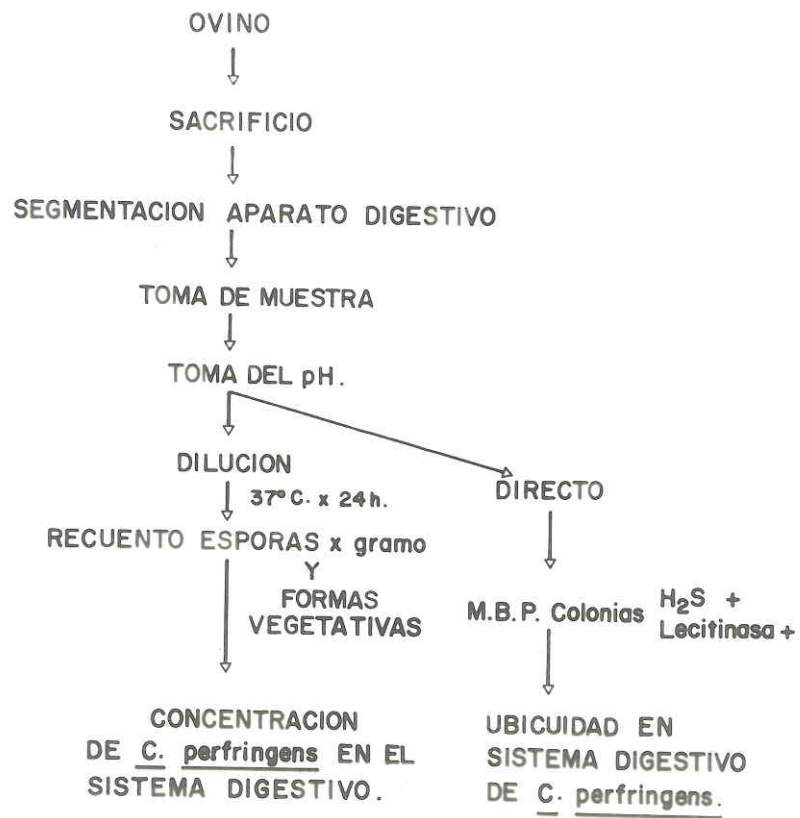


FIGURA 8. Esquema seguido para la localización cualitativa y cuantitativa del C. perfringens en el sistema digestivo de los ovinos.

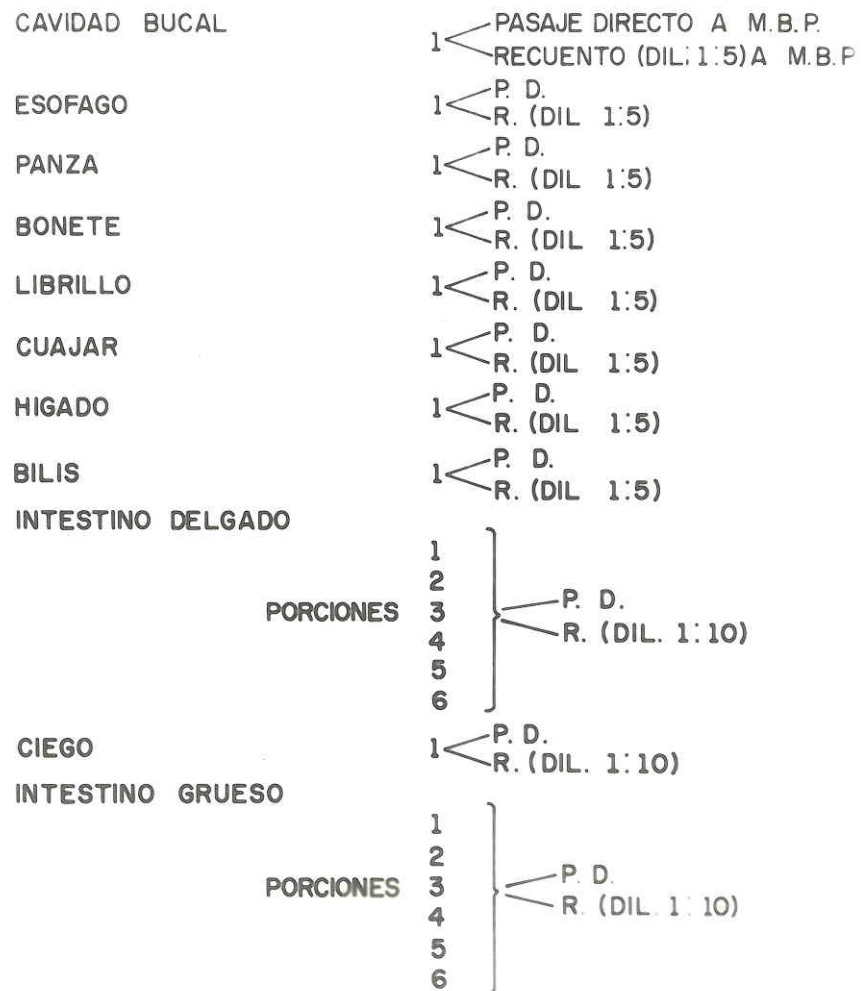


FIGURA 9. Esquema del muestreo del sistema digestivo para la localización cuali -  
tativa y cuantitativa del C. perfringens.

zaron y procesaron de acuerdo con la técnica descrita en 3.2. , se sembraron las diferentes muestras en cantidad de 1 ml, independientemente.

Los contenidos con exceso de fibra, se procesaron por presión in situ, sin tomar contacto con el líquido y depositando rápidamente dicho material en el tubo respectivo.

En el laboratorio, se procesaron los materiales inmediatamente, el material se mantuvo en refrigeración a 4 C, hasta la terminación del trabajo.

Las muestras procesadas para esta subsección del trabajo, no se sometieron a calentamiento antes de la siembra en el medio MBP, para así obtener resultado de recuento total de C. perfringens en forma vegetativa en vez de hacer recuentos de esporos únicamente, como se hizo en el experimento longitudinal.

3.6. Reproducción y caracterización histológica de las diferentes cepas de C. perfringens aisladas de los ovinos, por medio de la técnica quirúrgico-histológica del asa intestinal ligada.

Se intervinieron quirúrgicamente cuatro ovinos jóvenes mediante el uso de anestesia general, utilizando 0,2 ml de clorhidrato de xilasina al 2%, vía intramuscular y anestesia local por infiltración, aplicando 20 ml de clorhidrato de procaina al 1%. Se hizo laparotomía al lado derecho de la línea alba del animal por delante del ombligo. Se visualizó el intestino delgado y se procedió a realizar li-

gaduras dobles con seda (número 0) cada 10 cm, hasta completar un total de 40 asas ligadas por animal.

Se inocularon 10 ml de células de C. perfringens suspendidas en medio Duncan y Strong Modificado (DSM), tal como lo cita Torres-Anjel (54), compuesto por Thioglicolato de sodio (Difco), 0,1%; dextrina (Difco), 0,4%; fosfato de sodio hidratado, 1%; extracto de levadura (Difco), 0,4%; proteosa-peptona (Difco), 1,5%; por cada asa, inoculando en cada una de ellas, cepas diferentes. Se dejó un asa de por medio para inocular el control; en el asa control se inocularon 10 ml de DSM esteril.

Se sacrificaron los animales a diferentes tiempos así: 6 horas, 12 horas, 18 horas y 24 horas, post-inoculación, utilizando la técnica de la eutanasia por descarga eléctrica.

Se necropsiaron los animales, se extrajeron los intestinos intervenidos, y de la porción media de cada asa se tomó un segmento de 2 cm de longitud y se depositó en un frasco rotulado que contenía formol al 10%, para su posterior estudio histopatológico.

Se evaluaron las lesiones producidas por las diferentes cepas inoculadas, como posibles patógenos potenciales en el sistema digestivo, según esquema que se muestra en Figura 10.

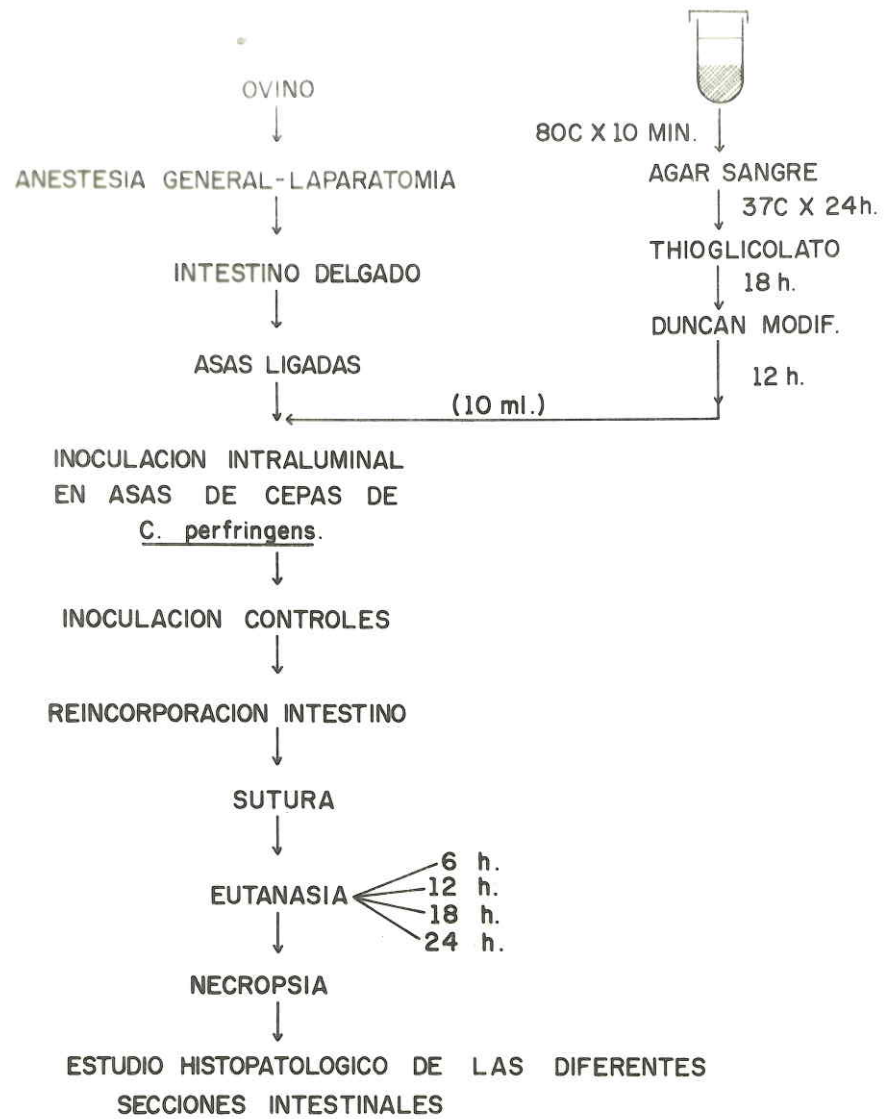


FIGURA 10. Técnica quirúrgico-histológica para caracterización de cepas de C. perfringens.

En la Tabla 8 se muestra el esquema de inoculaciones de las diferentes cepas de C. perfringens con su control, en los cuatro ovinos intervenidos mediante la técnica quirúrgica-histológica.

TABLA 8. Ovinos inoculados con diferentes cepas de *C. perfringens* en medio MDS\* vía intraluminal (asas). Controles negativos: medio MDS.

Cepas <sup>5253**</sup>	Cepas <sup>5669</sup>	Cepas <sup>5818</sup>	Cepas <sup>5827</sup>
6A	27A	32A	12D
58A	35A	35F	93E
37B	52A	82E	33E
79B	2B	78D	18F
24C	5B	56E	29F
42E	76B	8F	8C
78C	16C	29E	22E
96C	19C	33D	66B
2D	31C	21C	85B
34B	42E	9C	35E
95B	68C	71E	1F
38E	26D	17F	69F
66E	63D	84F	80D
81E	33E	32E	50F
91E	40E	39B	99F
92E	46E	7C	58C
95E	97E	26B	64B
100E	25F	22F	96E
89F	54F	15C	61D
93F	98F	42F	23B

\* Medio modificado de Duncan Strong.

\*\* No. registro del animal.