

1522

EFFECTO DE CEPAS DE Clostridium perfringens (welchii) DE ORIGEN
EQUINO (ANIMALES SANOS Y AFECTADOS CON ENTEROTOXEMIA) SOBRE
EL INTESTINO LIGADO DEL CONEJO

T E S I S

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

P o r

APOLINAR CRUZ GOMEZ

Como requisito parcial para optar al título de

MAGISTER SCIENTIAE

Bogotá, Colombia

1976

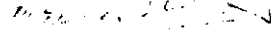
TESIS APROBADA POR

COMITE CONSEJERO

RICARDO OCHOA



FERNANDO VILLAFANE



GUILLERMO GONZALEZ



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

A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Colombiano Agropecuario ICA y a la Universidad Nacional de Colombia.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP) Mexico y al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) Mexico.

Al personal del Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias del ICA que de una u otra forma contribuyeron a la ejecución de este trabajo.

A mi Comité Consejero por las valiosas ideas aportadas.

Al Doctor Ricardo Ochoa por su acertada orientación y colaboración para la ejecución de mi trabajo de tesis.

CONTENIDO

| | Página |
|--|--------|
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 1.1. Naturaleza del problema. | 1 |
| 1.2. Objetivos generales | 2 |
| 1.3. <u>Clostridium perfringens</u> | 2 |
| 1.3.1. Historia | 2 |
| 1.3.2. Morfología | 4 |
| 1.3.3. Caracterización bioquímica | 4 |
| 1.3.4. Distribución | 4 |
| 1.4. Enterotoxina del <u>C. perfringens</u> | 5 |
| 1.4.1. Producción y Acción de la enterotoxina in vivo | 5 |
| 1.4.2. Efectos histopatológicos producidos por la enterotoxina del <u>C. perfringens</u> tipo A en algunas especies. | 9 |
| 2. MATERIALES Y METODOS | 11 |
| 2.1. Muestreo | 11 |
| 2.2. Aislamiento e identificación | 11 |
| 2.3. Cuantificación de las heces de equino | 13 |
| 2.4. Inoculación en asas intestinales | 13 |
| 2.5. Histopatología | 15 |
| 2.6. Análisis Estadístico | 17 |

| | Página |
|--|--------|
| 3. RESULTADOS | 18 |
| 3.1. Aislamiento e identificación | 18 |
| 3.2. Cuantificación en heces de equino | 21 |
| 3.3. Inoculación en asas intestinales | 23 |
| 3.4. Histopatología | 25 |
| 3.5. Análisis Estadístico | 31 |
| 4. DISCUSION | 32 |
| 4.1. Aislamiento e identificación | 32 |
| 4.2. Cuantificación en heces de equino | 33 |
| 4.3. Acumulación de líquido | 33 |
| 4.4. Histopatología | 37 |
| 4.5. Análisis Estadístico | 39 |
| 5. CONCLUSIONES | 40 |
| 6. RECOMENDACIONES | 42 |
| 7. RESUMEN | 44 |
| SUMMARY | 46 |
| BIBLIOGRAFIA | 48 |
| APENDICE | 53 |

LISTA DE TABLAS

| TABLA No. | | Página |
|--------------|---|--------|
| 1 | Identificación y número de las cepas aisladas de los casos estudiados. | 53 |
| 2 | Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas de los equinos | 54 |
| 3 | Cuantificación de <i>C. perfringens</i> a partir de un gramo de heces de los equinos de los cuales se aislaron las cepas | 55 |
| 4 | Comportamiento de las cepas de <i>C. perfringens</i> tipo A en el intestino ligado de conejo: primera, segunda y tercera inoculación. | 56 |
| 5 | Comportamiento de las cepas de <i>C. perfringens</i> tipo A en el intestino ligado de conejo. cuarta y quinta inoculación | 57 |
| 6 | Comportamiento de las cepas de <i>C. perfringens</i> tipo A en el intestino delgado ligado de conejo: sexta y séptima inoculación. | 58 |
| 7 | Cuantificación de <i>C. perfringens</i> tipo A del líquido colectado en las asas durante la primera inoculación | 59 |
| 8 | Cuantificación de <i>C. perfringens</i> tipo A del líquido colectado en las asas durante la segunda y tercera inoculación | 60 |

| TABLA No. | | Página |
|--------------|--|--------|
| 9 | Cuantificación de <i>C. perfringens</i> tipo A del líquido colectado en las asas intestinales durante la cuarta inoculación . | 61 |
| 10 | Cuantificación de <i>C. perfringens</i> tipo A del líquido colectado en las asas intestinales durante la quinta inoculación. | 62 |
| 11 | Cuantificación de <i>C. perfringens</i> tipo A del líquido colectado en las asas intestinales durante la sexta inoculación. | 63 |
| 12 | Cuantificación de <u><i>C. perfringens</i></u> tipo A del líquido colectado en las asas intestinales durante la séptima inoculación. | 64 |
| 13 | Hallazgos histopatológicos en diferentes segmentos del intestino delgado del conejo: Primera inoculación. | 65 |
| 14 | Hallazgos histopatológicos en diferentes segmentos del intestino delgado del conejo: segunda y tercera inoculación. | 66 |
| 15. | Hallazgos histopatológicos en diferentes segmentos del intestino delgado del conejo: cuarta inoculación | 67 |
| 16. | Hallazgos histopatológicos en diferentes segmentos del intestino delgado del conejo: quinta inoculación. | 68 |

| TABLA No. | | Página |
|--------------|--|--------|
| 17 | Hallazgos histopatológicos en diferentes segmentos del intestino del conejo: sexta inoculación. | 69 |
| 18 | Hallazgos histopatológicos en diferentes segmentos del intestino del conejo: séptima inoculación. | 70 |
| 19 | Cálculo de Chi al cuadrado (χ^2) para patogenicidad de las cepas aisladas. | 71 |
| 20 | Identificación y comportamiento en el intestino delgado ligado de conejo de las cepas de <u>C. perfringens</u> tipo A aisladas de las heces de equino. | 72 |
| 21 | Distribución de muestreo y aislamiento de <u>C. perfringens</u> en equinos. | 73 |

LISTA DE FIGURAS

| FIGURA No. | | Página |
|---------------|--|--------|
| 1 | Procesamiento de líquido acumulado en las asas intestinales ligadas de conejo. | 16 |
| 2 | Formación del doble halo de hemólisis por <u>C. perfringens</u> tipo A en agar sangre. | 19 |
| 3 | Reacción típica del <u>C. perfringens</u> tipo A en el medio básico perfringens (MBP). | 20 |
| 4 | Recuento de formas vegetativas de <u>C. perfringens</u> tipo A por gramo de heces. | 22 |
| 5 | Caso experimental. Capa muscular y adventicia del intestino delgado ligado de conejo (hembra) inoculado intraluminalmente con un cultivo crudo de células de <u>C. perfringens</u> tipo A. Vacualización del plexo de Auerbach. Hematoxilina-eosina. 45 X | 26 |
| 6 | Caso experimental. Capa muscular y adventicia del intestino delgado ligado del conejo (hembra) inoculado intraluminalmente con un cultivo crudo de células de <u>C. perfringens</u> tipo A. Infiltración de polimorfo nucleares, congestión de vasos sanguíneos, marginación y diapedesis de polimorfo nucleares en los vasos sanguíneos. Hematoxilina-eosina. 45 X. | 27 |

- | | | |
|----|---|----|
| 7 | <p>Caso experimental. Mucosa del intestino delgado ligado de conejo (hembra) inoculado intraluminalmente con un cultivo crudo de células de <u>C. perfringens</u> tipo A. Descamación epitelial, Necrosis de coagulación del epitelio de revestimiento. Infiltración de polimorfo nucleares en la lámina propia de las vellocidades. Hematoxilina-eosina. 10X .</p> | 28 |
| 8 | <p>Caso experimental. Intestino delgado ligado de conejo (hembra) inoculado intraluminalmente con un cultivo crudo de <u>C. perfringens</u> tipo A. Congestión y hemorragia en la lámina propia de la vellocidad. Congestión y hemorragia de las capas musculares. Hematoxilina-eosina. 10X.</p> | 29 |
| 9 | <p>Caso experimental. Intestino delgado ligado de conejo (hembra) inoculado intraluminalmente con 3 ml de tioglicolato (control). Se observa que el epitelio de revestimiento de la lámina propia y las capas musculares no presentan ninguna alteración morfológica. Hematoxilina-eosina 10X.</p> | 30 |
| 10 | <p>Comportamiento de las cepas de <u>C. perfringens</u> tipo A aisladas de equinos en el intestino delgado ligado del conejo.</p> | 34 |

| FIGURA No. | | Página |
|---------------|--|--------|
| 11 | Concentración de formas vegetativas de <u>C. perfringens</u> tipo A en líquido de intestino delgado ligado de conejo. | 36 |
| 12 | Porcentaje de formas esporuladas en el líquido acumulado en el intestino delgado ligado de conejo. | 38 |

1. INTRODUCCION

1.1. Naturaleza del problema.

La investigación clínica sobre casos de cólico en equidos de diferentes departamentos de Colombia se ha venido haciendo desde 1966 (39). Los reportes comunmente recibidos por los profesionales que trabajan en el campo, así como de los ganaderos que ven afectados sus equinos con este problema, hacen pensar que se trata de un cuadro clínico que debe ser estudiado de una manera más profunda, ya que produce grandes pérdidas a la industria equina nacional.

La presencia de C. perfringens en relación con la enterotoxemia equina ha sido reportada en el 100% de los casos estudiados en Colombia (39).

La historia clínica de los casos estudiados concuerdan con los reportados en la literatura para enfermedad del pastoreo (2,4,5,24,27,28,29,38,39,41). Ochoa et al, reportaron su reproducción con cepas de Clostridium perfringens (39).

Los síntomas clínicos se caracterizan por hipotermia, orejas frías, mucosas cianóticas y a veces congestionadas, pulso rápido, disnea, secreción nasal copiosa bilateral, sudoración copiosa y temblores musculares incoordinados, cierta dificultad para moverse, ausencia de borborigmos, timpanización del ciego con ruidos gaseosos y retención urinaria. No se

producen abortos pero la mortalidad puede llegar hasta un 80%, (39). Se ha descrito como una enfermedad asociada a toxinas de Clostridium perfringens (39).

1.2. Objetivos Generales.

El presente trabajo tuvo como objetivos la comprobación de la presencia de C. perfringens en el intestino de equinos i) en animales sanos ii-) afectados con enterotoxemia equina, (enfermedad del pastoreo) iii-) en animales recuperados de la misma, haciendo una comparación con el comportamiento de las diferentes cepas en el intestino delgado ligado de conejo.

1.3. Clostridium perfringens

1.3.1. Historia

El C. perfringens fue descrito por primera vez en 1891 por el Doctor Achalmé quien lo aisló de un paciente con artritis reumática denominándolo Bacillus sp (citado por 40).

Welch y Nuttall en 1892 lo aislaron de un aneurisma de la aorta del cadáver de un negro, hacen su descripción y establecen que es un microorganismo muy ubicuo y lo denominan Bacillus aerógenes capsulatus. Preaenkel en 1893 hace el aislamiento de este mismo agente de cuatro casos de gangrena gaseosa y lo denomina Bacillus phlegmones emphysematosae. Kruse en 1895 lo describe y denomina como Bacillus emphysematosus. Klein en

1895 junto con Andrus lo aislan de un pudín en el hospital de San Bartolomé en Inglaterra; ellos lo denominan *Bacillus enteritidis sporogenes* (citado por 32).

Veillon y Zuber en 1898 lo aislan de casos de gangrena gaseosa y enfermedades similares dándole el nombre de *Bacillus perfringens* (47).

Welch en 1900 lo aísla de 46 pacientes humanos aislados, esto habla de su ubicuidad y desde entonces ha sido posible encontrarlo en muchos procesos que afectan al hombre y animales. Por este tiempo se le denominaba *Bacillus welchii* (citado por 32).

Migula en ese mismo año lo describe con ese nombre. Cabe mencionar que también se le denominaba *Bacillus achalme* pero médicamente no se sostuvo este nombre por el hecho de que el Bacilo del Dr. Achalme estaba en el momento de su aislamiento contaminado con dos microorganismos, el Bacilo esporógenes común (no muy patógeno) y el Bacilo de Botqui, correspondiéndoles por lo mismo la gloria a Welch y Nutal porque el microorganismo aislado por ellos no presentaba contaminantes (citado por 6).

Holland en 1920 lo denomina *Clostridium welchii*. Pribram en 1929 lo llama *Welchia* sp. Prevot en 1938 le dá dos denominaciones *Welchia perfringens* y *Welchia agni*. McClung en 1945 lo llama *Clostridium perfringens*. Hobbs et al en 1953 lo vuelven a denominar *Clostridium welchii* (citado por 40).

El manual Bergey de 1957 ya no lo considera *Bacillus perfringens* como en 1948, sino *Clostridium perfringens* como lo llamó McClung en 1945, siendo este nombre con el que se le conoce en la actualidad (6).

1.3.2. Morfología

El *C. perfringens* tiene forma bacilar de bordes cuadrados o redondeados. Mide de 0.9 a 1.5 micras de diámetro y de 4 a 8 micras de longitud. Es un bacilo gram positivo, esporoformador y crece en ambiente de anaerobiosis.

Las colonias en placas de agar y gelatina son redondas, grises semitranslúcidas, lisas, con bordes enteros. Generalmente aparecen bacilos aislados, pero pueden encontrarse en parejas cadenas cortas o largas, o filamentos (32).

1.3.3. Caracterización bioquímica

Producción de lecitinasa y ácido sulfhídrico

En medio Lactosa- Motilidad-Nitrato (LMN) es lactosa positivo, nitratos negativo y motilidad negativa.

En medio de agar sangre produce hemólisis alfa y beta.

1.3.4. Distribución

El *C. perfringens* es el germen más ubicuo de todos los bacilos anaerobios.

Es posible encontrarlo en el aire, agua, suelo, heces, alimentos, moscas y en el tubo digestivo de gran variedad de especies animales. Por esta razón es muy fácil encontrarlo en la presentación de cuadros patológicos ya sea como agente causal o secundario. Tomando en cuenta su ubicuidad es posible que la transmisión se realice principalmente por vía oral (32,46).

1.4. Enterotoxina del C. perfringens tipo A

La enterotoxina producida por algunas cepas de C. perfringens tipo A es una proteína termolábil cuyas características biológicas han sido demostradas (12,17,19,36,42,44). Tiene un peso molecular de 36,000 \pm 4.000, un punto isoeléctrico a un pH de 4.3, sedimentación de 2.79 S⁰ y una toxicidad específica de 2,000 DLM para ratón/ml (20).

La producción de enterotoxina por células esporuladas de C. perfringens tipo A, sugiere una posible relación entre la esporulación y la toxogénesis (12).

La enterotoxina del C. perfringens tipo A ha sido definida como una citotoxina específica para las células de la mucosa del intestino (20).

1.4.1. Producción y Acción de la Enterotoxina in vivo

El comportamiento de diferentes cepas de C. perfringens tipo A en el intestino ligado de conejo y su relación con la producción de

enterotoxina ha sido reportado en la literatura, encontrándose una alta correlación entre el acúmulo de líquido del segmento y la capacidad tóxica de la cepa (9,11,12,17,36,42).

Se considera que la célula vegetativa de *C. perfringens* in vivo puede llegar a multiplicarse en seis horas y esporular, si se inyecta una suspensión de células vegetativas y medio de crecimiento en el lumen del intestino delgado ligado de conejos y ovinos. Se produce además movimiento de líquidos del torrente sanguíneo a la luz del órgano, distensión del mismo, formación de gas y diarrea. La distensión por causa del fluido es comparable a la diarrea pero la respuesta del animal es localizada y la remoción del líquido es físicamente bloqueada. La producción de diarrea en combinación con células vegetativas del *C. perfringens* y medio nutritivo son necesarios para que se produzca la distensión del asa intestinal(9,12,15,18,21,22).

La técnica de asas ligadas se usa extensivamente como un modelo de la actividad del *C. perfringens* en contaminaciones alimenticias (4, 11,12,18,20,23,44).

Se han reportado y se han reproducido enteritis por enterotoxina del *Clostridium perfringens* tipo A en el hombre (8,16,45) en micos (21,46,48) en ovinos (15,18,20,31) en bovinos (3,15,35,37) en conejos 11,12,23,44) y ratas 38,48) entre otros.

En el hombre se ha demostrado que la administración de células de C. perfringens tipo A produce un síndrome de intoxicación alimenticia caracterizado por diarrea y dolor abdominal (40).

Se considera que la intoxicación alimenticia en humanos es causada por células vivas de C. perfringens tipo A que producen la enterotoxina in vivo y no por la ingestión de la toxina preformada (40,45).

La acción de la enterotoxina de C. perfringens se ha comprobado recientemente en micos administrando las células o los fluidos supernatantes de cultivos esporulados de C. perfringens en los estómagos de estos animales, induciendo así emésis y diarrea (13,21,46,48).

En uno de estos experimentos se concluyó que en el intestino no se absorben cantidades significantes de la enterotoxina de C. perfringens tipo A (40).

En conejos y en ovinos, además de la diarrea se puede obtener una respuesta localizada, ligando segmentos del intestino e inyectando dichos segmentos con suspensiones de células vegetativas de C. perfringens en medio nutrientes y dejando que las células crezcan por cerca de seis horas en el animal (12,20). Durante este tiempo la bacteria se multiplica y esporula. Se ocasiona un movimiento de fluidos de la corriente sanguínea hacia el lumen del intestino (22) y los segmentos ligados se hinchan. Esto último es comparable a la diarrea. Tanto para la producción de dia-

rea como para la obtención de intestinos ligados distendidos es necesario la combinación de células vivas de C. perfringens y de nutrientes. Las células suspendidas en solución salina no tienen ningún efecto (20).

Se han obtenido también estas mismas respuestas administrando extractos celulares preparados a partir de cultivos esporulados de C. perfringens (12,18,20,31,42).

La enterotoxina de C. perfringens administrada intravenosamente a ovejas produce una caída rápida y persistente de la presión arterial que en casos agudos es irreversible y precede a la muerte del animal (24,33).

En bovinos los resultados han sido similares a los hallados en ovejas aunque en los bovinos la apariencia patológica de los tejidos (ganglios linfáticos mesentéricos congestionados y edema) fue más pronunciada que la obtenida en ovejas (15,17,35,37).

En cobayos se ha podido observar un aumento en la permeabilidad capilar por inyección intradérmica de la enterotoxina parcialmente purificada. No se ha observado necrosis pero hay una inhibición del crecimiento del pelo en el sitio de la inyección de la enterotoxina. La manifestación eritemal aparece aproximadamente a las dos horas después de la inyección y alcanza un máximo de intensidad a las 18 horas (19,36,43).

Esta cualidad ha sido utilizada como un ensayo para medir la actividad biológica.

1.4.2. Efectos histopatológicos producidos por la Enterotoxina del C. perfringens tipo A en diferentes especies.

Se ha reportado y descrito la fisiología e histopatología de la diarrea inducida por la enterotoxina de C. perfringens en algunas especies.

El primer cambio histopatológico reportado en conejos en asociación con la diarrea inducida por la enterotoxina de C. perfringens tipo A fue el daño en el epitelio intestinal (12,36). A diferencia de la acción de las enterotoxinas de E. coli y Shigella, el epitelio se encuentra desprovisto de la vellocidad intestinal cuando se administran concentraciones de la enterotoxina necesarias para inducir acumulación de fluidos (30).

En la necropsia de ovejas a las cuales se les administró la enterotoxina por vía intravenosa se han encontrado las mucosas del yeyuno y del ileum extremadamente hiperémicas incluyendo la válvula ileocecal. En la mucosa del ileum fue evidente una ligera hemorragia. Algunos de los animales presentaron ascitis e hidrotorax y todos mostraron algún grado de congestión pulmonar hepática y esplénica. Los nódulos linfáticos mesentéricos estaban ligeramente edematosos (15,18,24,31,36).

El examen histopatológico del yeyuno y del ileum de ovejas afectadas por la enterotoxina, reveló una marcada hiperemia y una pérdida parcial del epitelio superficial. Los vasos sanguíneos y los capilares en la lámina propia se presentaron repletos de eritrocitos. Algunos de

los vasos sanguíneos en la superficie desnuda estaban rotos, pero no se encontraron hemorragias en el estroma. Cerca del 40% del epitelio superficial se veía degenerado. En el hígado la congestión estaba localizada alrededor de la triada portal y los riñones mostraron rayos corticales hiperémicos (31,33,36).

Los exámenes histopatológicos de secciones de la piel de cobayos afectados por eritemas debidos a la enterotoxina de C. perfringens, mostraron que la reacción eritematosa inicial estaba localizada en la dermis y era seguida de una infiltración de leucocitos polimorfo nucleares en el retículo inmediatamente superior a la capa muscular cutánea. Se notaron también algunos eritrocitos extravasados, pero no fue evidente la hemorragia. No se observó necrosis del tejido (36,43).

Los bovinos responden a la inyección intravenosa de enterotoxina en la misma forma general que las otras especies estudiadas. A menudo se observa hiperemia visceral, particularmente en el intestino delgado hemorragias petequiales, ascitis y edema pulmonar; la hiperemia intestinal podría ser interpretada como una predilección fuerte de la enterotoxina por la red capilar intestinal, conduciendo a vasodilatación e hipotensión secundaria (34).

Aunque las paredes de los vasos sanguíneos aparecen intactas y no se observan hemorragias en las capas de la mucosa, ocasionalmente se pueden observar hemorragias en la submucosa y en la serosa. No se ha encontrado necrosis o invasión de células inflamatorias. En algunos experimentos se han encontrado hemorragias perivasculares ligeras en el cerebro (15,37).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Muestreo

Se tomaron muestras de heces de equinos, con edades entre 4 y 15 años, provenientes de zonas geográficas del país en las cuales se han detectado casos de enterotoxemia equina.

Las muestras fueron tomadas de un total de 62 equinos, cuyo estado clínico era el siguiente:

- 7 enfermos con enterotoxemia
- 5 recuperados de la misma
- 50 clínicamente sanos

Es de anotar que de los 50 animales sanos, 10 se encontraban en la Sabana de Bogotá (donde la enfermedad no se ha reportado).

Las muestras de heces fueron tomadas del recto del animal, colocadas en bolsas de plástico estériles y conservadas en refrigeración (4°C) hasta su traslado al laboratorio para ser procesadas.

2.2. Aislamiento e identificación

Un gramo de cada muestra se sembró en tioglicolato para crecimiento bacteriano y caldo de carne para crecimiento y esporulación (10, 11,25). Después de incubar a 37°C durante 24 horas se sub-cultivó en

agar sangre sembrando por agotamiento. Posteriormente se tomó una colonia típica productora de doble halo de hemólisis por caja para hacer la identificación morfológica del agente.

La identificación de todas las cepas en estudio se llevó a cabo mediante pruebas presuntivas y pruebas confirmativas.

Las pruebas presuntivas incluyeron la producción de lecitinasa y ácido sulfhídrico en Medio Básico perfringens (MBP)*, cuya composición es la siguiente: Tiosulfato de sodio 0,1%; agar 2.0%; extracto de levadura 0.5%; triptosa 1.5%; sulfato férrico amoniacal 0.1%; agua destilada 900 ml, pH 7.6 (1).

Las pruebas confirmativas se efectuaron en medio Lactosa-Motilidad Nitrate (LMN) de composición triptosa 1.5%; extracto de levadura 1.0%; lactosa 1.0%; fosfato de sodio 0.1%; nitrato de potasio 0.1%; rojo fenol 0.005%; agar 0.3%; pH 7.5 (1), en medio de gelatina con el fin de determinar la capacidad de las cepas de C. perfringens tipo A para licuar este medio y en medio de agar sangre para la visualización del doble halo de hemólisis.

* Manual Difco con modificaciones al medio SFP

Las colonias puras de C. perfringens una vez confirmada su morfología y pureza por la coloración de Gram se sembraron en caldo de carne y se incubaron a 37°C por 24 horas, tiempo en el cual esporularon. Posteriormente fueron conservadas en congelación (-10°C).

2.3. Cuantificación de las heces de equino

De cada uno de los equinos de los cuales se aislaron las cepas se tomó una muestra de heces (1g) y se hicieron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-8} en solución salina para luego hacer siembras en cajas con medio MBP adicionado de yema de huevo que se incubaron a 37°C por 48 horas a una atmósfera del 10% de CO₂. Esto nos permitió determinar la concentración de C. perfringens que tenía cada uno de los equinos por gramo de heces.

2.4. Inoculación en asas intestinales

Una vez establecida la pureza de la cepa, se siguió el procedimiento descrito por Duncan Strong y Sugiyama (9) para preparación de C. perfringens e inoculación del mismo en las asas intestinales ligadas del conejo (9,11,12,17,44) mediante laparotomía. Para este fin se usaron extractos crudos preparados a partir de cultivos esporulados de C. perfringens tipo A. Se emplearon siete conejos hembras adultas (6 meses) de la raza Nueva Zelandia Blanca con pesos promedio de 2.5 kilos.

Los conejos fueron anestesiados con éter; el ileum fue expuesto y ligado a aproximadamente 90 cm del mesoapéndice. El contenido intestinal fue lavado con 10 ml de solución fisiológica la cual fue inyectada junto a la ligadura, el sitio de inyección se aisló por medio de otra ligadura a 5 cm de la primera. Los segmentos intestinales fueron de 10 cm cada uno y con doble ligadura en cada extremo para evitar que los inóculos se entremezclaran. Se emplearon trozos de gasa impregnados en solución salina para conservar húmedo el intestino expuesto durante la operación.

La inoculación se inició a partir de la región pilórica con un volumen igual a 3 ml de inóculo para cada cepa en forma alternada con medio de cultivo estéril (tioglicolato) como control negativo. Cada cepa fue inoculada por duplicado cambiando su posición dentro del intestino.

Después de colocar el intestino dentro de la cavidad abdominal del animal, se procedió a suturarlo. El conejo fue mantenido durante 12-24 horas con agua como único alimento y luego fue sacrificado. El animal fue abierto inmediatamente y cada segmento fue examinado según las diferentes pruebas.

De cada operación y siguiendo la técnica descrita (9) se colectó el remanente del líquido de las asas que mostraron acumulación del mismo y éste se igualó a 7 ml con solución salina cuando el volumen del líquido colectado en ellas no llegó a esta cantidad. Posteriormente se

homogenizó en un agitador Vortex* y se dividió en dos porciones de 3.5 ml de cada una (Figura 1). Una de ellas se calentó a 75°C por 15 minutos en baño maría con el fin de destruir las células vegetativas de C. perfringens y al mismo tiempo estimular la formación de esporos, con esta parte calentada y de cada cepa se hizo una siembra con la técnica de Duncan et al (9) para determinar la cantidad de esporos por ml de líquido colectado en las asas. Con la otra parte (3.5 ml) que no fue sometida a calentamiento se llevó a cabo el mismo proceso con el objeto de determinar la cantidad de células vegetativas por ml de líquido colectado en las asas intestinales.

Se consideró que una cepa fue positiva, cuando presentó la capacidad de producir acumulación de líquido en el asa intestinal ligada, en un volumen no menor de 3 ml.

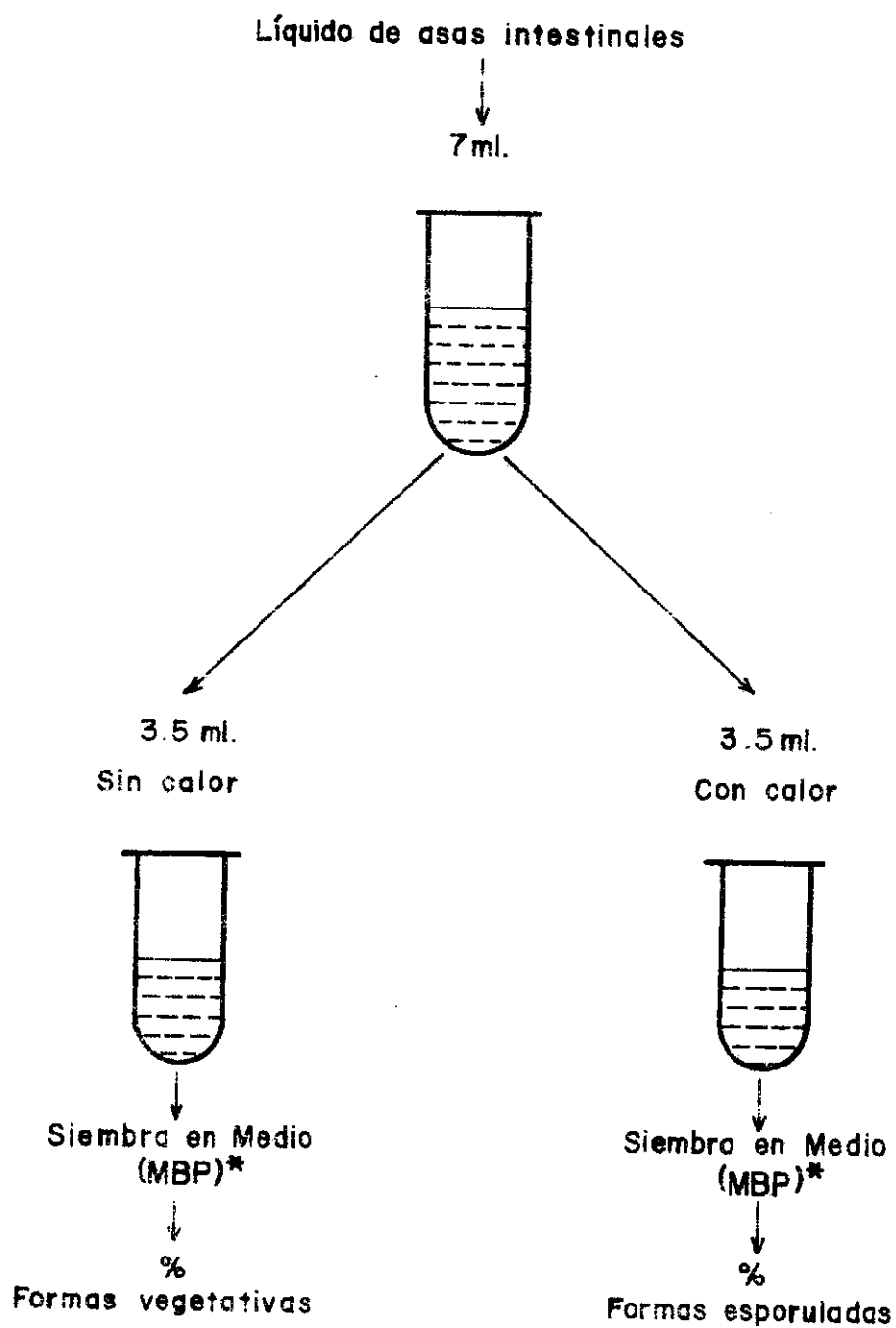
2.5. Histopatología.

Una vez sacrificados los conejos (choque eléctrico), se tomaron muestras por duplicado de cada uno de los segmentos inoculados, se fijaron en formalina tamponada al 10%, se sometieron a un procesador de tejidos** y una vez obtenidos los bloques de parafina conteniendo los

* Scientific Products

** Autotechnicon, Model 2A. The Technicon Col. Chauncy N.Y.

Figura 1. PROCESAMIENTO DEL LIQUIDO ACUMULADO EN LAS ASAS INTESTINALES
LIGADAS DE CONEJO



* (MBP) Manual Difco, modificaciones al Medio SFP

segmentos intestinales, se efectuaron cortes histológicos de un espesor de 5 micras, utilizando para ellos un micrótopo*.

Los cortes histológicos fueron coloreados con hematoxilina eosina, según la técnica estandarizada por el laboratorio de histopatología con sede en el LIMV**.

2.6 Análisis Estadístico.

Una vez obtenidos los resultados se procedió a tabular los datos y a efectuar la determinación de significancia en base al cálculo Chi al cuadrado (χ^2). Como hipótesis nula (H_0) se consideró que el estado clínico del animal era independiente de la patogenicidad de la cepa.

* Microtome Model 280 American Optical Co. Buffalo N.Y.

** Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias del Instituto Colombiano Agropecuario, Bogotá.

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento e Identificación.

Las cepas aisladas de los casos clínicos (cepas 1,6,7,11 y 13) provenían de zonas del país con clima cálido (22-26°C) y las aisladas de los animales sanos (cepas 4,8,43,44,45,47,49,52,57 y 60) provenían de zonas del país con clima frío (16°C) y cálido. Es importante anotar que de 50 animales clínicamente sanos, en 10 de ellos se logró el aislamiento de cepas de C. perfringens, de 7 animales enfermos con la enterotoxemia se aislaron 3 cepas y de 5 animales recuperados se aislaron 2 cepas.

En la Tabla 1 del Apéndice se identifica el número de la cepa con el estado clínico del animal, sexo y lugar de procedencia.

La totalidad de las cepas aisladas fueron identificadas desde el punto de vista morfológico, bioquímico y de comportamiento sobre la yema de huevo en medio MBP.

Las pruebas bioquímicas efectuadas con las diferentes cepas aisladas se encuentran explicadas en la Tabla 2 del Apéndice.

Todas las cepas crecidas en medio MBP fueron compatibles con C. perfringens por el halo de lecitinasa observado en este medio así como por la presencia de dos halos de hemólisis en agar sangre (Figuras 2 y 3).

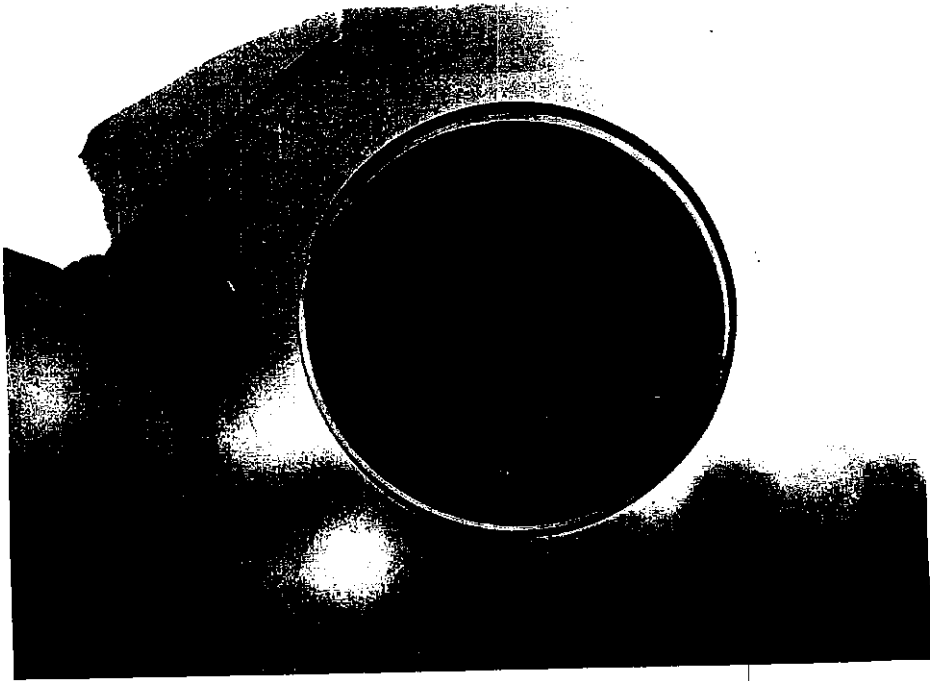


FIGURA 2. Formación de doble halo de hemólisis por C. perfringens tipo A en agar sangre.

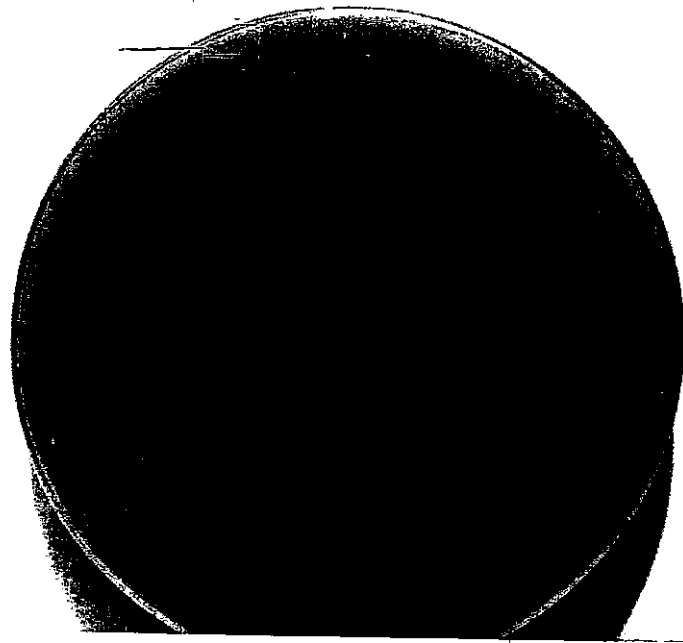


FIGURA 3. Reacción típica de C. perfringens tipo A en el medio básico perfringens (MBP) nótese el halo de lecitinasa producido por este tipo de bacteria.

En medio Lactosa-Motilidad-Nitratos (LMN), se observó que todas las cepas aisladas fueron lactosa positivo (+), motilidad negativo (-) y nitratos negativo (-).

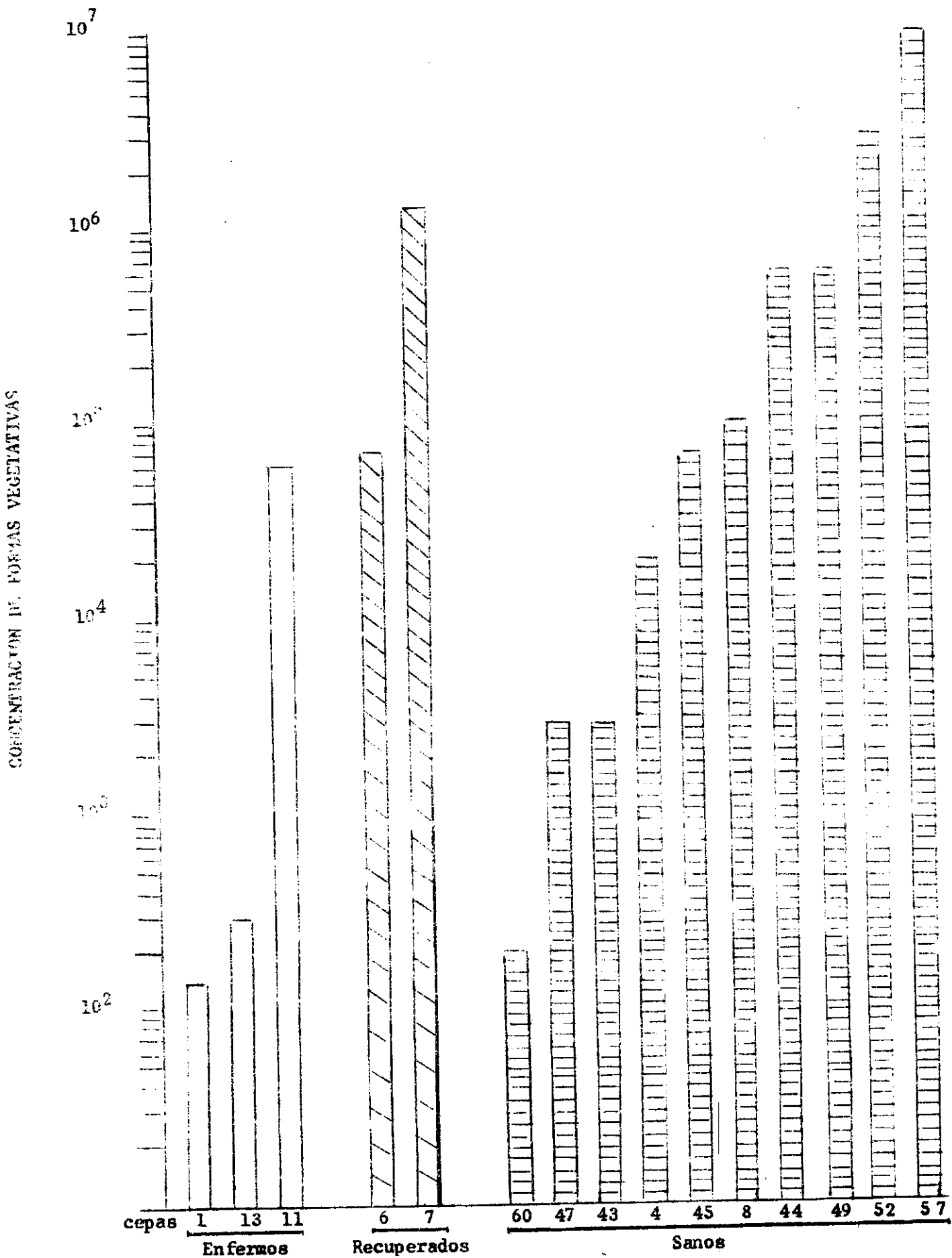
En el medio de gelatina únicamente dos cepas aisladas correspondientes a animales sanos (cepas 43 y 57) mostraron la capacidad de licuar este medio.

3.2. Cuantificación en heces de Equino.

Al realizar el recuento de las formas vegetativas de C. perfringens tipo A por gramo de heces para las cepas aisladas, se observó que las concentraciones fluctuaban entre 140 y 10 millones (Tabla 3 del Apéndice) correspondiendo la concentración más baja a una cepa aislada de un animal enfermo de enterotoxemia equina, procedente de Villavicencio y la concentración más alta a una cepa aislada de un animal clínicamente sano procedente de Cartago.

Se pudo observar que en los casos clínicos de enterotoxemia las concentraciones fueron bajas (cepas 1, 11 y 13), de 3×10^2 a 6×10^4 , en los casos clínicos recuperados (cepas 6 y 7) las concentraciones fueron un poco más altas de 7×10^4 a 1.3×10^6 y en los casos de animales sanos (cepas 4, 8, 43, 44, 45, 47, 49, 52, 57 y 60) las concentraciones fueron más altas con algunas diferencias, de 2×10^2 a 1×10^7 (Figura 4).

GRAMO DE HECES



3.3. Inoculación en asas intestinales

El comportamiento enteropatogénico de las cepas (1,4,6,7 y 8) en el intestino delgado ligado de conejo, determinado por la acumulación de líquido en el asa intestinal ligada, está descrito en las Tablas 4, 5 y 6 del Apéndice.

En estas tres primeras inoculaciones (Tabla 4 del Apéndice) el comportamiento de las cepas no fue homogéneo. Se observa sin embargo, que las cepas 1, 4 y 9 se comportaron en forma constante siendo las dos primeras positivas y la cepa 8 negativa en todas las inoculaciones, mientras que las cepas 6 y 7 se comportaron de manera impredecible y parece que esto obedeció a la localización anatómica que ocupó la cepa dentro del intestino.

En estas inoculaciones no hubo relación directa entre el porcentaje de esporulación de la cepa y la acumulación de líquido en el asa intestinal ligada. Es así como en la primera inoculación (Tabla 4 del Apéndice) la cepa 1 mostró reacción positiva (+) y un alto porcentaje de esporulación (56.85%), mientras que las cepas 4 y 6 que también mostraron reacción positiva(+), presentaron un bajo porcentaje de esporulación (2.85 y 4.12% respectivamente), (Tabla 7 del Apéndice).

En la segunda y tercera inoculación dos de las cepas tuvieron comportamiento positivo (+) y no presentaron un porcentaje de esporulación detectable (cepa 1 y 4). La cepa 6 que fue positiva (+) en la segunda

inoculación y negativa (-) en la tercera, tuvo una esporulación mediana y la cepa 7 que fue negativa (-) en la segunda inoculación y positiva (+) en la tercera presentó una alta población de esporos cuyo porcentaje no se pudo calcular debido a la excesiva población de células vegetativas. Con la cepa 8 el porcentaje de esporulación no fue detectable y no hubo acúmulo de líquido (Tabla 8 del Apéndice).

En la cuarta y quinta inoculación también se pudo observar que no hubo relación directa entre el porcentaje de esporulación y la reacción del asa, pero en cambio si hubo diferencia en cuanto al acúmulo de líquido en el asa intestinal cuando las cepas fueron cambiadas de posición en el intestino, tomando como base la región pilórica (Tabla 5,9 y 10 del Apéndice).

En la sexta y séptima inoculación, el comportamiento de las cepas en cuanto a acumulación de líquido en las asas intestinales no fue homogéneo. En la sexta inoculación la cepa 13 fue positiva (+) y las cepas 49,52,57 y 60 tuvieron un comportamiento negativo (-), en cambio en la séptima inoculación todas estas cepas se comportaron en forma positiva (+) (Tabla 6 del Apéndice).

El porcentaje de esporulación de las cepas en la sexta y séptima inoculación no estuvo relacionado a la acumulación de líquido en las asas intestinales. Se observa que aunque todas las cepas en la séptima inoculación fueron positivas (+) en cuanto a acúmulo de líquido, no se

detectó la presencia de formas esporuladas en cuatro de ellas (cepas 13,49,52 y 57).

En la sexta inoculación se pudo observar que las cepas negativas (cepas 49,52,57 y 60) presentaban un porcentaje de esporulación entre el 7 y 50% (Tablas 11 y 12 del Apéndice).

3.4. Histopatología

En general las lesiones tisulares encontradas en los segmentos positivos consistieron en descamación, necrosis de coagulación, edema, congestión y hemorragia con infiltración de células de polimorfo nucleares (PMN) en la mucosa epitelial, siendo los datos más sobresalientes la descamación, necrosis, congestión y hemorragia en este estrato.

La submucosa presentó congestión, edema, hemorragia e infiltración celular de polimorfo nucleares. La capa muscular de los segmentos positivos presentaron con cierta frecuencia edema, congestión, hemorragia e infiltración celular, observándose que en la quinta inoculación (cepas 11, 43,44,45 y 47) ninguno de los segmentos presentó lesiones en su capa muscular. También se observó que los segmentos positivos presentaron ligera congestión, hemorragia e infiltración celular de polimorfo nucleares. En la adventicia en algunos de estos segmentos se pudo observar vacualización del plexo de Auerbach y diapedesis e infiltración de polimorfo nucleares de los vasos sanguíneos hacia las capas musculares en el intestino delgado (Figuras 5,6,7,8 y 9).

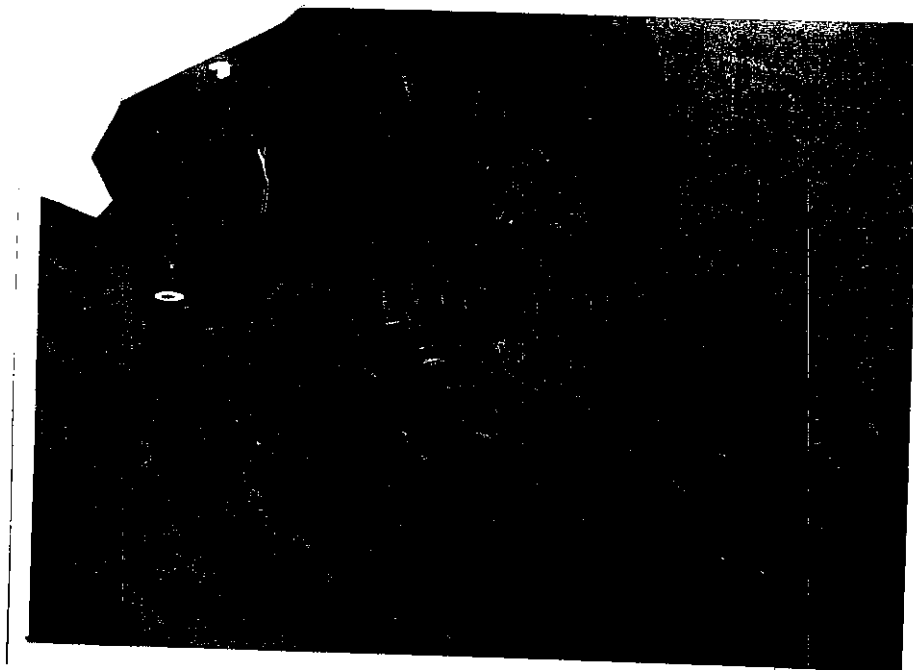


FIGURA 5. Caso experimental. Capa muscular y adventicia del intestino delgado ligado de conejo (hembra) inoculado intraluminalmente con un cultivo crudo de células de C. perfringens tipo A.

Vacualización del plexo de Auerbach (V)
Hematoxilina-Eosina 45 x.

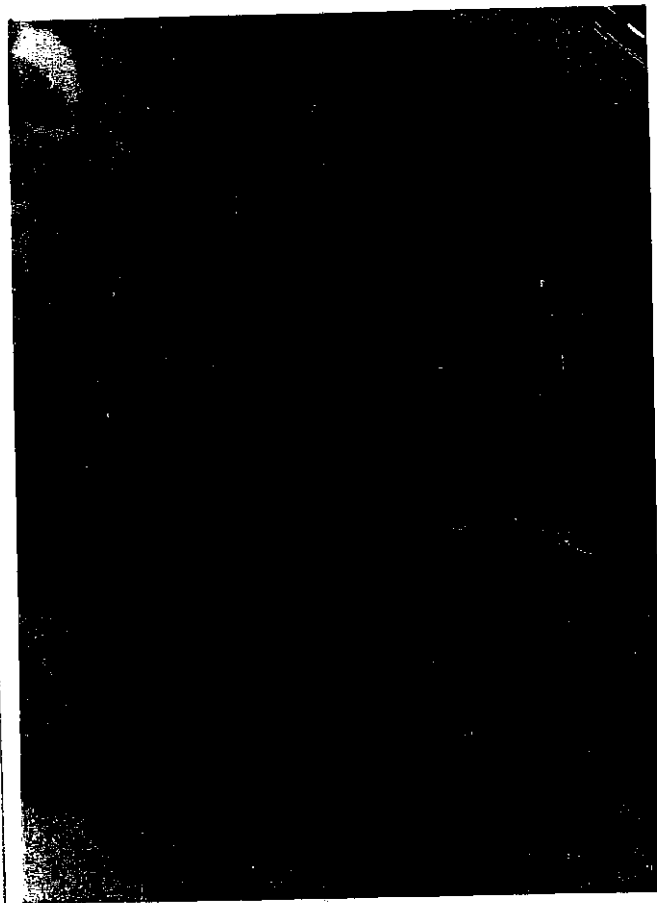


FIGURA 6. Caso experimental. Capa muscular y adventicia del intestino delgado ligado de conejo (hembra) inoculado intraluminalmente con un cultivo crudo de células de C. perfringens tipo A.

Infiltración de polimorfo nucleares (I) congestión de vasos sanguíneos (C) marginación y diapedesis de polimorfonucleares en los vasos sanguíneos (M) Hematoxilina-Eosina 45 x.



FIGURA 7. Caso experimental. Mucosa de intestino delgado ligado de conejo (hembra) inoculado intraluminalmente con un cultivo crudo de células de *C. perfringens* tipo A.

Descamación epitelial (D). Necrosis de coagulación del epitelio de revestimiento (N). Infiltración de polimorfonucleares en la lámina propia de las vellocidades (I). Hematoxilina-Eosina. 10 x.

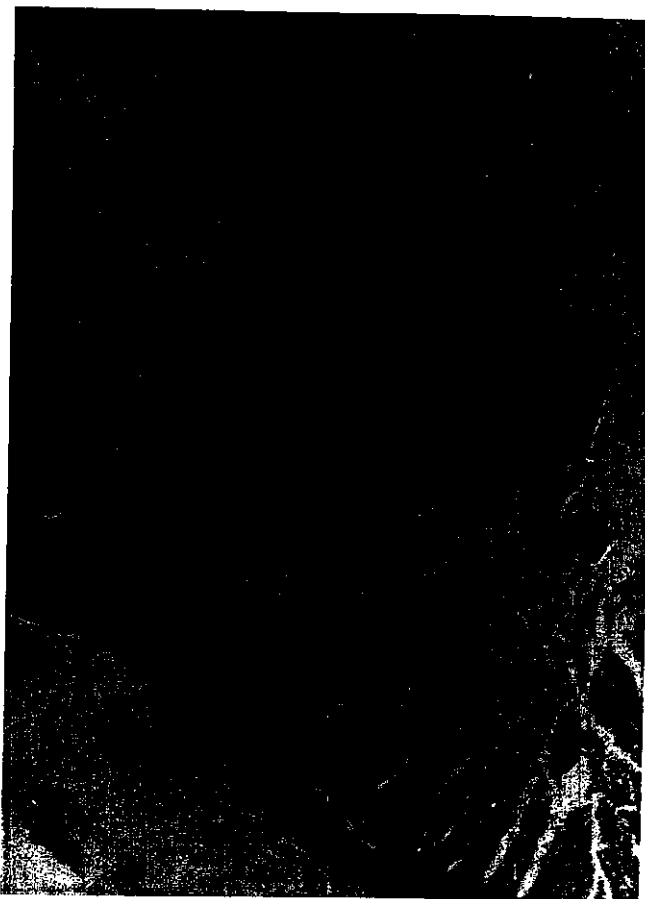


FIGURA 8. Caso experimental. Intestino delgado ligado de conejo (hembra) inoculado intraluminalmente con un cultivo crudo de C. perfringens tipo A.

Congestión y hemorragia en la lámina propia de la vellocidad (C)
Congestión y hemorragia en las capas musculares (D). Hematoxi-
lina Eosina. 10 x.



FIGURA 9. Caso experimental. Intestino delgado ligado de conejo inoculado intraluminalmente con 3 ml de tioglicolato (control). Se observa que el epitelio de revestimiento (E) la lámina propia (L) y las capas musculares (M) no presentan ninguna alteración morfológica.

Hematoxilina Eosina 10 x.

Los hallazgos histopatológicos de los segmentos estudiados en cada uno de los casos se presentan en las Tablas 13, 14, 15, 16, 17 y 18 del Apéndice.

3.5. Análisis Estadístico

Al someter los resultados obtenidos a un análisis estadístico de significancia, se encontró que dichos resultados son confiables en un 95% en lo que se refiere a patogenicidad de las cepas aisladas de C. perfringens en relación al estado clínico del animal (Tabla 19 del Apéndice). El cálculo de Chi cuadrado (χ^2_c) en base a la hipótesis nula (H_0) en la que el estado clínico del animal no depende de la patogenicidad de las cepas de C. perfringens tipo A aisladas de las heces del mismo, dió un valor de 3.15. El Chi al cuadrado tabulado (χ^2_t) para un grado de libertad y un error de 5% fue de 3.86. Al ser $\chi^2_c < \chi^2_t$, se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alterna (H_a): el estado clínico de los animales depende de la patogenicidad de las cepas de C. perfringens tipo A aisladas de las heces del mismo.

El 80% de las cepas de C. perfringens tipo A aisladas de los animales enfermos y/o recuperados y el 30% de las aisladas de los animales sanos fueron patógenas (Tabla 19 del Apéndice).

4. DISCUSION

4.1. Aislamiento e Identificación

De 50 animales sanos muestreados, 10 fueron de la Sabana de Bogotá (clima frío 13°C) los cuales se encontraban en condiciones de estabulación, los 40 restantes correspondieron a clima cálido (22-25°C). De esta población de animales sanos se lograron aislar 10 cepas (20%). Los animales enfermos y recuperados se consideraron en un solo grupo por el hecho de que ambos están involucrados en un mismo proceso patológico (enfermedad del pastoreo), habiendo sido 7 los casos enfermos de los cuales se aislaron 3 cepas (43%) y 5 los casos recuperados de los cuales se lograron 2 aislamientos (40%) (Tablas 1 y 21 del Apéndice).

Hay que anotar que con los resultados obtenidos al hacer los recuentos bacteriales en medio MPP se pudo comprobar la presencia de C. perfringens tipo A pero por razones de manejo de las muestras, ya que estas se demoraron en llegar al laboratorio, la gran mayoría de ellas se contaminaron, siendo esta la razón por la que no se logró su aislamiento en forma pura. Sin embargo todas las cepas de C. perfringens aisladas fueron caracterizadas en base a pruebas bioquímicas y morfológicas.

Aún cuando el Manual Bergey (5) menciona que la prueba de la gelatina es determinante para la identificación del C. perfringens, solo dos cepas aisladas (13%) la licuaron no así las demás cepas

aisladas ni una cepa estandarizada (NCTC 8237-12) proveniente de Inglaterra que fue utilizada como patrón.

En base a esto además podemos suponer que dicha prueba no es del todo confiable, ya que todas las cepas aisladas e identificadas con las pruebas descritas encajaban dentro de las características de C. perfringens tipo A (32).

4.2. Cuantificación en heces de equino

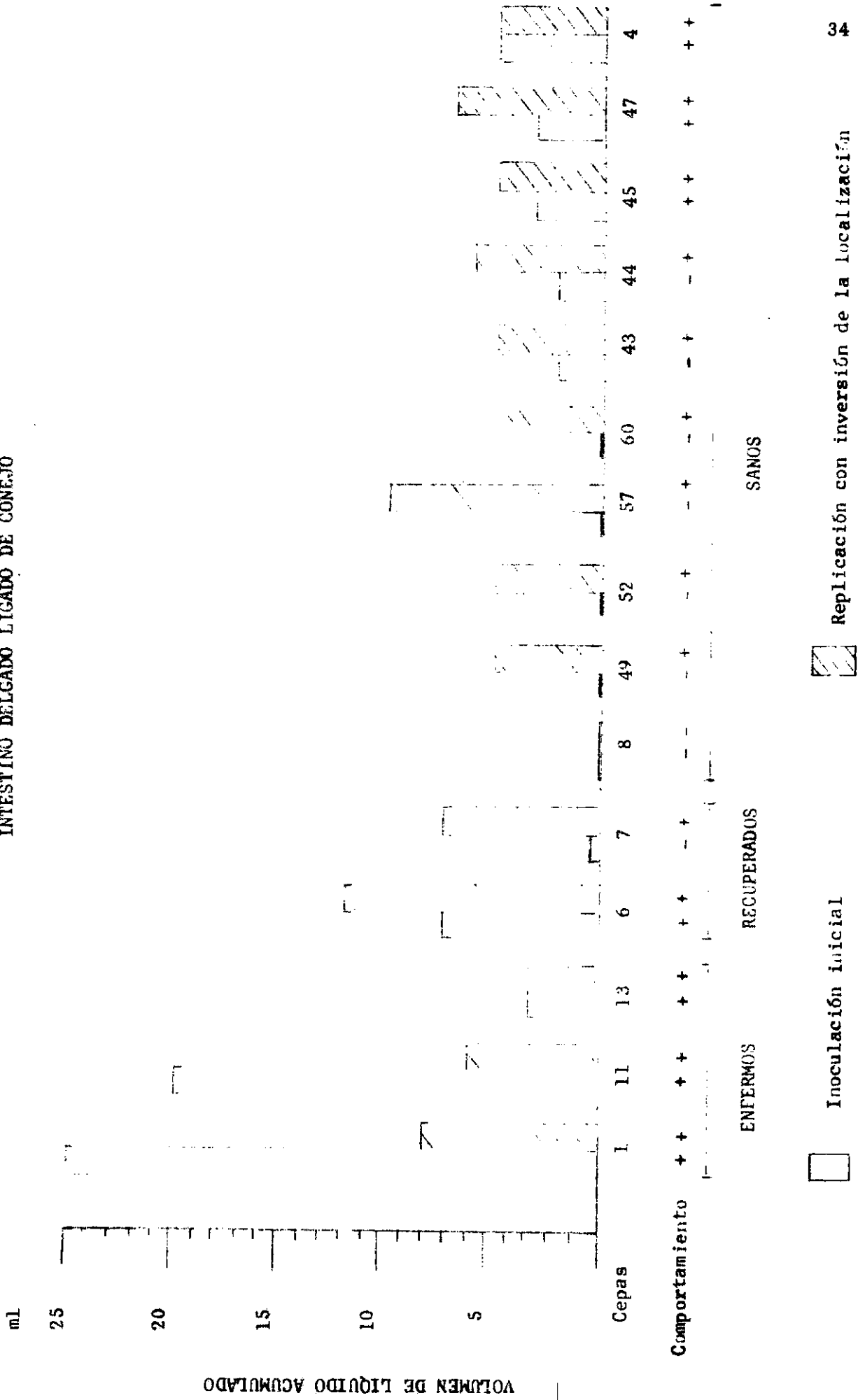
Las concentraciones de formas vegetativas de C. perfringens en los equinos muestreados (Tabla 3 del Apéndice, Figura 4), no fueron determinantes para el estado clínico de los mismos.

En términos generales, se puede observar que los animales enfermos y recuperados presentaron concentraciones más bajas que los animales sanos muestreados (Figura 4), ya que más importante que la concentración de este tipo de bacterias es la calidad de la misma en relación a su capacidad toxigénica (9,26). Por lo tanto la población de formas vegetativas de C. perfringens en el tubo digestivo de equinos significa poco si no se hace una identificación de las cepas por su comportamiento en el intestino delgado ligado de conejo (Figura 10).

4.3. Acumulación de líquido

Se debe considerar que lo que vino a confirmar la patogenicidad de las cepas aisladas de C. perfringens fue el acúmulo de líquido que

FIGURA 10. COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS DE C. perfringens TIPO A. AISLADAS DE EQUINOS EN EL
 INTestino DELGADO LIGADO DE CONEJO



Éstas produjeron en el intestino delgado ligado de conejo (9,11,12,15, 17,18,21,22,36,42), tomando en cuenta que las inoculaciones fueron realizadas en la parte anterior del intestino delgado (duodeno,yeyuno) tal vez por ser aquí en donde se produce un mayor recambio de líquido en el tubo digestivo del organismo.(14).

Se consideró que una cepa fue positiva cuando presentó la capacidad de producir acumulación de líquido en el asa intestinal ligada, en un volumen no menor de 3 ml, en dos ocasiones.

De las 5 cepas aisladas de los animales enfermos y/o recuperados (cepas 1,6,7,11 y 13), 4 se comportaron siempre en forma positiva independientemente de la concentración de formas vegetativas, porcentaje de esporulación y la localización de la cepa en el intestino delgado ligado de conejo (cepas 1,6,11 y 13) Esto mismo se pudo observar en tres de las 10 cepas aisladas de los animales clínicamente sanos (cepas 4,45,47). Es importante anotar que de las 7 cepas restantes (cepas 8,43,44,49,52,57, 60) aisladas de estos animales, 6 tuvieron un comportamiento ambivalente (Figura 10) tal vez porque la concentración de formas vegetativas (Figura 11) en determinado momento hizo que algunas se comportaran como patógenas, determinado esto por el acúmulo de líquido que ocasionaron en las asas intestinales en las cuales fueron inoculadas. La cepa 8 aislada de este mismo grupo de animales se comportó siempre en forma negativa (Tabla 20 del Apéndice).

En cuanto al volumen de líquido acumulado en las asas intestinales

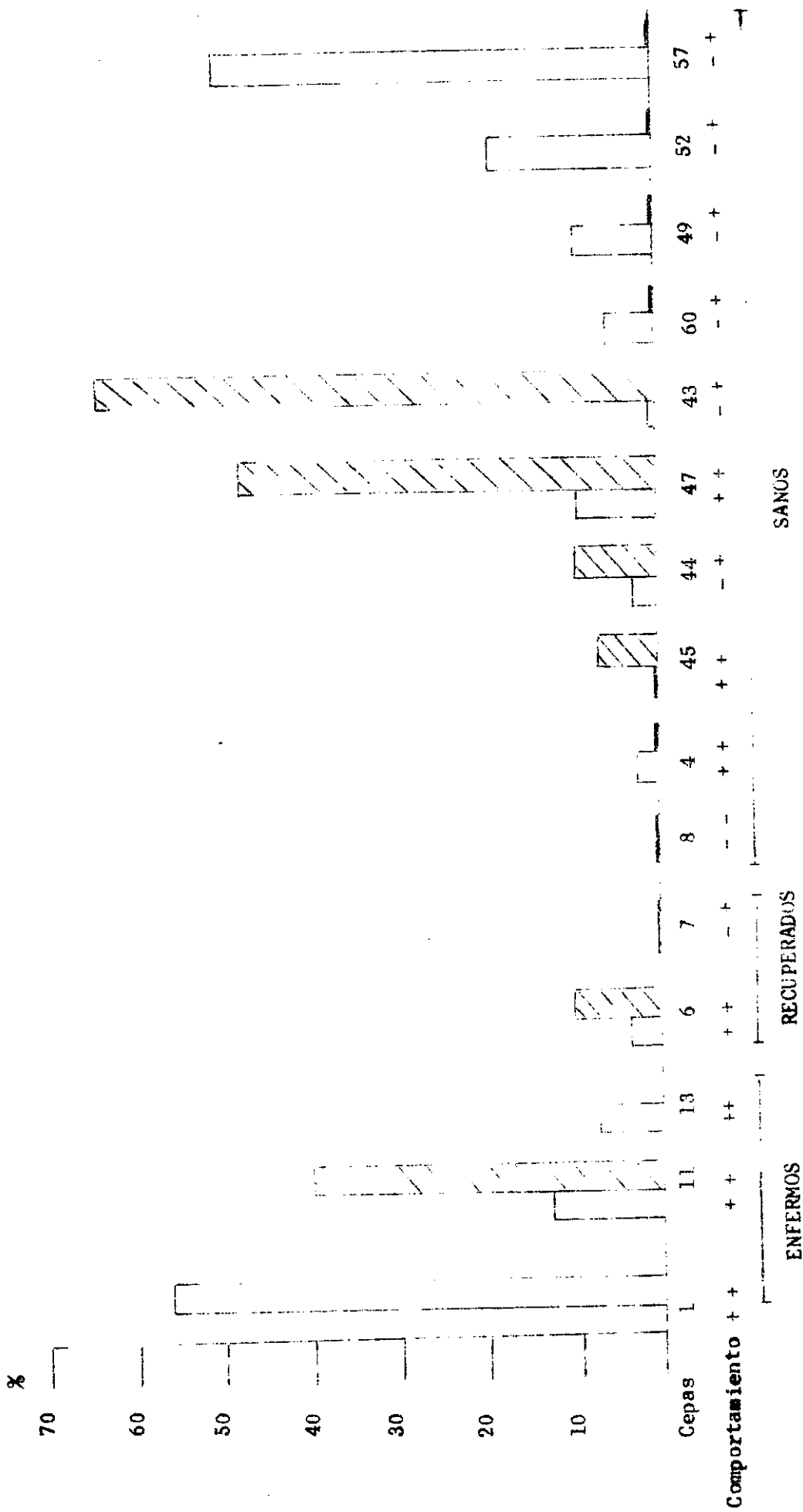
ligadas, las cepas aisladas de los animales enfermos y recuperados, en términos generales fueron los que mayor volumen de líquido acumularon considerándose por esto las más patógenas.

Respecto al porcentaje de esporulación y su relación con el acúmulo de líquido en el intestino de conejo, se encontró que en algunas ocasiones a mayor porcentaje de células esporuladas se acumuló más cantidad de líquido no siendo esto uniforme para todas las cepas. Con las cepas de comportamiento ambivalente la situación es más clara ya que así como son dependientes de la carga de formas vegetativas para acumular líquido son también dependientes del porcentaje de esporos para el mismo efecto, aún cuando se pudo observar que esta relación no es determinante (Figura 12).

4.4. Histopatología

Los cambios histopatológicos producidos por las cepas enteropatógenas en los segmentos intestinales del conejo, en términos generales están acordes con lo reportado en la literatura (9,12,20,30,36,39). Descamación y necrosis del epitelio intestinal; edema, congestión y hemorragia de las vellocidades intestinales y en algunas ocasiones en las capas musculares del segmento intestinal; infiltración de polimorfo nucleares en las capas musculares, marginación y diapedesis de polimorfo nucleares en los vasos sanguíneos; vacualización del plexo de Auerbach.

FIGURA 12
 PORCENTAJE DE FORMAS ESPORULADAS DE *C. perfringens* tipo A EN EL LIQUIDO ACUMULADO
 EN EL INTESTINO DELIGADO LIGADO DE CONEJO



Inoculación inicial
 Replicación con inversión de la localización

4.5. Análisis Estadístico

Por los resultados obtenidos en el estudio estadístico al cual fueron sometidas las cepas aisladas, se observó que existe una relación entre la patogenicidad de las cepas y el estado clínico del animal. (Tablas 19 y 21 del Apéndice), encontrándose que se aislan 2.66 veces más cepas patógenas de C. perfringens tipo A en los animales enfermos y/o recuperados que en los sanos.

Del análisis estadístico se puede deducir con una confiabilidad del 95%, que las poblaciones de C. perfringens tipo A del grupo de los animales enfermos y/o recuperados son diferentes en su capacidad enterotoxigénica de las del grupo de los animales sanos, concluyéndose que la enteropatogenicidad de la cepa está positivamente asociada a la presentación del cuadro clínico de enterotoxemia (enfermedad del pastoreo).

5. CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos en el presente trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

- a. La prueba de la gelatina para la identificación del C. perfringens tipo A no es una prueba confiable.
- b. En la enterotoxemia (enfermedad del pastoreo) de los equinos más que la carga de células vegetativas de C. perfringens tipo A en el tracto intestinal de los animales tiene mayor importancia la capacidad toxigénica de la cepa.
- c. En la determinación de la patogenicidad de una cepa de C. perfringens tipo A es importante el efectuar pruebas de acumulación de líquido en el intestino delgado ligado de conejo.
- d. Las concentraciones tanto de formas vegetativas como esporuladas de C. perfringens tipo A por mililitro de líquido en intestino delgado de conejo no tienen relación determinante en la capacidad toxigénica de las cepas.
- e. La positividad de una cepa, determinada por la acumulación de líquido en el intestino delgado ligado de conejo, no se ve alterada al cambiar el lugar de inoculación de la cepa dentro del intestino delgado ligado de conejo.

- f. El 80% de las cepas aisladas de los animales enfermos y/o recuperados y el 30% de las aisladas de los animales sanos se comportaron como patógenas en el intestino ligado de conejo.
- g. Comparativamente en términos generales, las cargas de formas vegetativas de C. perfringens tipo A en el grupo de animales enfermos de enterotoxemia equina fueron bajas, más altas en el grupo de los recuperados y aún mayores en el de los animales clínicamente sanos.
- h. Estadísticamente se puede concluir que el estado clínico de los equinos muestreados era dependiente de la patogenicidad de las cepas de C. perfringens tipo A aisladas de las heces de los mismos. Confiabilidad del 95% error 5%.

6 RECOMENDACIONES

El estudio de la enterotoxemia equina (enfermedad del pastoreo) debería ser planificado de una manera más amplia y duradera ya que dicha enfermedad está afectando grandemente la población equina del país.

Para los trabajos a largo plazo tendientes a realizarse en este caso particularmente, no deberían emplearse estudiantes extranjeros debido a que ellos están sujetos a una reglamentación de tiempo.

Es conveniente que parte del equipo con que se cuenta pueda desplazarse a las zonas de presentación de la enfermedad por lo menos en las épocas del año en que aparecen estos brotes, de esta manera las muestras obtenidas podrían ser trabajadas en forma rápida y con ciertas condiciones de asepsia, al mismo tiempo que se estaría siempre en los focos de presentación de dicha enfermedad haciendo observaciones de tipo epidemiológico, se podría con un cepario de C. perfringens tipo A zonificado que en determinado momento pudiera servir para futuros trabajos como sería saber que zonas del país cuentan con cepas con capacidad enterotoxigénica y la realización que éstas tuvieron con la presentación de la enterotoxemia equina.

Un renglón muy importante es el tendiente a la obtención de una medida que permita frenar esta enfermedad. Actualmente se está trabajando en la elaboración de una vacuna, pero debería contarse con más

equipo y personal de modo que esto pudiera acelerarse.

A pesar de que no siempre se puede contar con el respaldo económico deseado, es necesario ajustarse a las circunstancias y en la medida de las posibilidades encontrar estímulos y justificaciones para encausar a los profesionales en el campo de la investigación.

7. RESUMEN

Con el objeto de comprobar la presencia de C. perfringens tipo A en las heces de equinos enfermos de enterotoxemia, recuperados de la misma y clínicamente sanos, se muestrearon un total de 62 animales cuyo estado clínico fue el siguiente:

- 7 enfermos de los cuales se aislaron 3 cepas
- 5 recuperados de los cuales se aislaron 2 cepas
- 50 sanos de los cuales se aislaron 10 cepas

Las concentraciones de C. perfringens tipo A en los animales de los que se aislaron dichas cepas fueron en términos generales bajas en el grupo de animales enfermos, más altas en el grupo de los recuperados y aún mayores en el grupo de los animales sanos.

Para la determinación de la patogenicidad de las cepas aisladas se empleó la "técnica del intestino ligado" en conejos, usándose para ello siete conejos hembras adultas de aproximadamente seis meses de edad, de la raza Nueva Zelanda Blanca y con un peso aproximado de 2.5 kg. Las asas intestinales ligadas de los siete conejos fueron expuestas por duplicado a cada una de las cepas aisladas, cambiando la posición de las mismas dentro del intestino.

Una cepa se consideró positiva cuando mostro la capacidad de producir acumulación de líquido en el asa intestinal ligada, en un vo-

lumen no menor de 3 ml durante dos inoculaciones repetidas.

El líquido acumulado en las asas intestinales ligadas fue medido y procesado con el fin de determinar la concentración de formas vegetativas y esporuladas por mililitro de dicho líquido.

La concentración de formas vegetativas de C. parfringens tipo A en los equinos muestreados no fueron determinantes para el estado clínico del animal, ya que más importante que la concentración de este tipo de bacterias, es la capacidad toxigénica de las mismas.

De las cepas aisladas de los animales enfermos y/o recuperados el 80% fueron patógenas. De las cepas aisladas de los animales sanos el 30% fueron patógenas.

En términos generales se puede decir que las cepas aisladas de los animales enfermos fueron las que mayor cantidad de líquido acumularon en las asas intestinales ligadas del conejo, con significancia estadística a un nivel de 0.05.

SUMMARY

The purpose of this study was the detection of strains of C. perfringens Type A in feces from horses with grass sickness (equine enterotoxemia), recovered from it and clinically healthy. Sixty two fecal samples were collected.

Three strains of C. perfringens Type A were isolated from seven ill animals, two from five recovered animals, and ten from fifty healthy animals.

The largest concentrations of viable cells of C. perfringens Type A were found in samples from healthy animals, less in recovered animals, and the smallest were found in samples from animals with enterotoxemia.

The "intestinal loop technique" in rabbits was used to determine the enteropathogenicity of the isolates. Seven six-months-old New Zealand rabbits weighing 2.5 kg were used for this test. Ileal loops of rabbits were inoculated in duplicate with the isolated strains, changing the strains position in the intestine.

A strain was considered positive (pathogenic) when it was able to cause fluid accumulation of 3 ml or more in the ligated intestinal loops, and this reaction was duplicable when changing its sequential position in the intestine.

Fluid contents were withdrawn from loops, the volumes were measured and processed in order to obtain total cell and spore counts.

The concentration of viable cells in the gastrointestinal tract of horses was not as important as the toxigenic capacity of the strains to cause the intestinal illness.

Eighty per cent of the strains isolated from ill and recovered animals and thirty per cent of those isolated from healthy animals were pathogenic.

In general, it can be said that the strains isolated from clinically ill animals, were the most likely to cause a positive reaction in the ligated gut, with a statistical significance at the level of 0.05.

This is consistent with a relationship of pathogenic C. perfringens Type A and the presentation of Grass-sickness (Equine Enterotoxemia).

BIBLIOGRAFIA

1. ALVAREZ, N., TORRES- ANJEL, M.J. Y OSPINA, B.O. 1975. Prevalencia de contaminación microbiológica en alimentos para aves y materias primas para su elaboración. Universidad Nacional de Colombia. 15p. (sin publicar).
2. BARLOW, R.M. Neuropathological observations in Grass Sickness of Horses. *J. Comp. Path.* 79: 407-411. 1969.
3. BLOOD, D.C. and HELWIG, D.M. Enterotoxin of Calves. *Aust. Vet. J.* 33: 144. 1957.
4. _____ and HENDERSON, I.A. *Medicina Veterinaria*. Traducido por Jaime Roig. 2. ed. Mexico, Interamericana. 1965. pp. 373-388.
5. BROWNLEE, A. Changes in Coeliac Mesenteric Ganglia of Horses Affected with Grass Sickness and of Horses Affected with Some other Disease. *Vet. Rec.* 71: 668-669. 1969.
6. BUCHANAN, R.E. and GIBBONS, N.E. Eds., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8. ed. Baltimore, Williams and Wilkins. 1974. pp. 556-562.
7. CHANDLER, S.L. and BROWNLEE, A. Ultrastructural Observations on Neurons of the Sympathetic Ganglia in Grass Sickness. *J. Comp. Path.* 77: 339-342. 1967.

8. DISCHE, F.E. and ELECK, S.D. Experimental Food Poisoning with Clostridium welchii. *Lancet* II: 71-74. 1957.
9. DUNCAN, C.L., SUGIYAMA, H. and STRONG, D.H. Rabbit Ileal Loop Response to Strains of Clostridium perfringens. *J. Bacteriol.* 95: 1560-1568. 1968a.
10. _____ and STRONG, D.H. Improved Medium for sporulation of Clostridium perfringens. *Applied Microbiology* 16: 82-89. 1968b.
11. _____ and STRONG, D.H. Experimental Productions of Diarrhea in Rabbits with Clostridium perfringens. *Can. J. Microbiol.* 15: 765-770. 1969a.
12. _____ Ileal Loop Fluid Accumulation and Production of Diarrhea in Rabbits by Cell-Free Products of Clostridium perfringens. *J. Bacteriol.* 100: 86-94. 1969b.
13. DUNCAN, C.L. Clostridium perfringens Type A Food Poisoning: I Response of the Rabbit Ileum as an Indication of Enteropathogenicity of Strains of Clostridium perfringens in Monkeys. *Infection and Immunity.* 3: 167-170. 1971.
14. DUKES, H.H. *Fisiología de los Animales Domésticos*. Traducido por Francisco J. C. Iderón. 2. ed. Madrid, Aguilar, 1962. pp. 277-417.

15. HAUSCHILD, A.W.H., NIILLO, L. and DORWARD, W.J. Experimental Enteritis with food-Poisoning and Classical Strains of Clostridium perfringens Type A in Lambs. J. Infect. Dis. 117: 379-386. 1967a.
16. _____ and THATCHER, F.S. Experimental Food Poisoning with Heat-susceptible Clostridium perfringens Type A. J. Food Sci. 32: 467-469. 1967b.
17. _____. Enteropathogenic Factors of Food-Poisoning Clostridium perfringens Type A. Can J. Microbiol. 16: 331-338. 1970a.
18. _____. Response of Ligated Intestinal Loops in Lambs to an Enteropathogenic Factor of Clostridium perfringens Type A. Can. J. Microbiol. 16: 339-343. 1970b.
19. _____. Erythematous Activity of the Cellular Enteropathogenic Factor of Clostridium perfringens Type A. Can. J. Microbiol. 16:651-654. 1970c.
20. _____. Clostridium perfringens Enterotoxin. J. of Milk and Food Technology. 34: 596. 1971a.
21. _____, WALCROFT, M.J. and CAMPBELL, W. Emesis and Diarrhea Induced by Enterotoxin of Clostridium perfringens Type A in Monkeys, Can. J. Microbiol. 17: 1141-1143. 1971b.

22. _____; NIILLO, L. and DORWARD, W.J. The Role of Enterotoxin in Clostridium perfringens Type A Enteritis. *Can J. Microbiol.* 17: 987-991. 1971c.
23. HAUSCHILD, A.H.W.; HILSHEIMER, R. and ROGERS, C.G. Rapid Detection of Clostridium perfringens Enterotoxin by a Modified Ligated Intestinal Loop Technique in Rabbits. *Can. J. Microbiol.* 17: 1475-1476. 1971d.
24. JUBB, K.V. and KENNEDY, P.C. *Patología de los Animales Domésticos*. Traducida por Clemente Sánchez. Barcelona, Labor, 1973. v 2. pp. 96-98.
25. LABBE, R.G. and DUNCAN, C.L. Growth from Spores of Clostridium perfringens in the presence of Sodium Nitrite. *Applied Microbiology.* 19: 353-359. 1970.
26. _____; SOMERS, E. and DUNCAN, C. Influence of Starch Source on Sporulation and Enterotoxin Production by Clostridium perfringens Type A. *Applied and Environmental Microbiology.* 31: 455-457. 1976.
27. LANNEK, N., LINDBERG, P., PERSON, F., OBEL, A.L. and SEVELIUS, F. A Grass Disease Euzootic in stable-fed Horses with, and investigation of the Aetiological Role of Food. *Vet. Rec.* 75: 601-603. 1961.

28. MANAFFEY, L.W. Ganglionic lesions in Grass Sickness of Horses.
Vet. Rec. 71: 170-171. 1969.
29. MANUAL MERCK DE VETERINARIA. Rahway, N.J., Merck, 1970. pp.
245-248.
30. McDONEL, J.C. and DUNCAN, C.L. Histopathological Effect of
Clostridium perfringens Enterotoxin in the Rabbit Ileum.
Infection and Immunity. 12: 1214-1218. 1975.
31. MCGOWAN, B.; MOULTON, J.E. and ROOD, S.E. Lamb Losses Associated
with Clostridium perfringens Type A. J. Am. Vet. Med. Assoc.
133: 219-221. 1953.
32. MERCHANT, I.A. and PACKER, R.A. Bacteriología y Viriología Vete-
rinarias. Traducido por Miguel Cordero del Campillo. 2. ed.
Zaragoza, Acribia. 1965. pp. 484-488.
33. _____. The effect of Enterotoxin of Clostridium welchii
(perfringens) on the Systemic Blood Pressure of Sheep. Res.
Vet. Sci. 15: 503-505. 1972.
34. _____. Effect on Calves of the Intravenous Injection of Ente-
rotoxin of Clostridium welchii Type A. J. Comp. Path. 83:
265-269. 1973.

35. NIILLO, L. and AVERY, R.J. Bovine Enterotoxemia. *Can. Vet. J.* 4: 31-35. 1963.
36. _____. Mechanism of action of the Enteropathogenic Factor *Clostridium perfringens* Type A. *Infection and Immunity* 3: 100-106. 1971a.
37. _____ and DORWARD, W.J. The effect of Enterotoxigenic *Clostridium welchii* (perfringens) Type A on the Bovine Intestine. *Res. Vet. Sci.* 12: 376-378. 1971b.
38. OREL, A.L. Studies on Grass Disease. The Morphological Picture with Special Reference to the Vegetative Nervous system. *J. Comp. Path.* 65: 334. 1955.
39. OCHOA, R.; GOMEZ, S.; BUSTOS, F. y TREJOS, E. Reporte inicial sobre la Reproducción de la Enterotoxemia Equina (cólico inespecífico infladera o sopladera). *Rev. ICA* 9 (1): 15-29. 1974.
40. SMITH, L. and HOLDEMAN, E.V. *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*. Illinois, Charles C. Thomas. 1968. pp. 185-247.
41. SMITH, H.A.; JONES, T.C. and HUNT, R.C. *Veterinary Pathology*. 4. ed. Philadelphia, Lea and Febiger, 1972. pp. 1211-1213.
42. STARK, R.L. and DUNCAN, C.L. Biological Characteristics of *Clostridium perfringens* Type A Enterotoxin. *Infection and Immunity*. 4: 89-96. 1971.

43. _____ . Transient increase in capillary permeability induced by Clostridium perfringens Type A Enterotoxin. Infection and Immunity 5: 147-150. 1972.
44. STRONG, D.H.; DUNCAN, C.L. and PERNA, G. Clostridium perfringens Type A Food Poisoning: II. Response of the Rabbit Ileum as an Indication of Enteropathogenicity of strains of Clostridium perfringens in Human Beings. Infection and Immunity 3: 171-178. 1971..
45. THATCHER, F.S. Acid Resistance and Infectivity of Food-Poisoning Clostridium perfringens. Can. J. Microbiol. 13: 1041-1047. 1967.
46. UEMURA, T.; SAKAGUCHI, G.; ITOH, T.; OKAZAWA, K. and SAKAI, S. Experimental Diarrhea in Cynomolgus Monkeys by Oral Administration with Clostridium perfringens Type A Viable Cells Or Enterotoxin. Japan J. Med. Sci. Biol. 28: 165-177. 1975.
47. VEILLON, A. and ZUBER, A. Recherches sur quelques microbes strictement anaerobies et leur role en pathologie. In: Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E.; eds. Berge's Manual of Determinative Bacteriology. 8. ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1974. p. 562.

APENDICE

TABLA 1. Identificación y número de las cepas aisladas de los casos estudiados.

| Cepa No. | Estado clínico del animal | Procedencia |
|----------|---------------------------|---------------|
| 1 | Enfermo | Villavicencio |
| 4 | Sano | Bogotá |
| 6 | Recuperado | Palmira |
| 7 | Recuperado | Palmira |
| 8 | Sano | Bogotá |
| 11 | Enfermo | Cartago |
| 13 | Enfermo | Cartago |
| 43 | Sano | Cartago |
| 44 | Sano | Cartago |
| 45 | Sano | Cartago |
| 47 | Sano | Cartago |
| 49 | Sano | Cartago |
| 52 | Sano | Cartago |
| 57 | Sano | Cartago |
| 60 | Sano | Cartago |

TABLA 2. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas de equinos.

| Cepas | Lactosa | Motilidad | | Nitratos | | Gelatina (Licuada) |
|-------|-------------|-----------|----------|----------|----------|-----------------------|
| | Acido + Gas | Positiva | Negativa | Positivo | Negativo | |
| 1 | + | | - | | - | |
| 4 | + | | - | | - | |
| 6 | + | | - | | - | |
| 7 | + | | - | | - | |
| 8 | + | | - | | - | |
| 11 | + | | - | | - | |
| 13 | + | | - | | - | |
| 43 | + | | - | | - | + |
| 44 | + | | - | | - | |
| 45 | + | | - | | - | |
| 47 | + | | - | | - | |
| 49 | + | | - | | - | |
| 52 | + | | - | | - | |
| 57 | + | | - | | - | + |
| 60 | + | | - | | - | |

TABLA 3. Cuantificación de C. perfringens a partir de 1 gramo de heces de los equinos de los cuales se obtuvieron las cepas.

| Cepa No. | Número de células por gramo de heces |
|----------|--------------------------------------|
| 1 | 14×10^2 |
| 4 | 2×10^4 |
| 6 | 7×10^4 |
| 7 | 1.3×10^6 |
| 8 | 1×10^5 |
| 11 | 6×10^4 |
| 13 | 3×10^2 |
| 43 | 3×10^3 |
| 44 | 6×10^5 |
| 45 | 7×10^4 |
| 47 | 3×10^3 |
| 49 | 6×10^5 |
| 52 | 3×10^6 |
| 57 | 1×10^7 |
| 60 | 2×10^2 |

TABLA 4. Comportamiento de las cepas de *C. perfringens* tipo A en Intestino delgado ligado de conejo.

| Segmento | Primera Inoculación | | | | | | | | | |
|------------------------|---------------------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Extremidad pilórica | Cepa | Control | Cepa | Control | Cepa | Control | Cepa | Control | Cepa | Control |
| | 1 | | 4 | | 6 | | 7 | | 1 | |
| ml | 20 | | 5 | | 7 | | 0 | | 8 | |
| | + | - | + | - | + | - | - | - | + | - |
| Extremidad pilórica | Segunda Inoculación | | | | | | | | | |
| | Cepa | Control | Cepa | Control | Cepa | Control | Cepa | Control | Cepa | Control |
| 1 | | 4 | | 6 | | 7 | | 8 | | |
| ml | 25 | | 5 | | 7 | | 0 | | 0 | |
| | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Extremidad pilórica | Tercera Inoculación | | | | | | | | | |
| | Cepa | Control | Cepa | Control | Cepa | Control | Cepa | Control | Cepa | Control |
| 8 | | 7 | | 6 | | 4 | | 1 | | |
| ml | 0 | | 7 | | 12 | | 5 | | 8 | |
| | - | - | + | - | - | - | + | - | + | - |

Cantidad de inóculo 3 ml

+ : Cuando hubo acúmulo de líquido

- : Cuando no hubo acúmulo de líquido

ml : Volumen de líquido acumulado en mililitros

TABLA 5. Comportamiento de las cepas de C. perfringens tipo A en el intestino delgado ligado de conejo.

Cuarta Inoculación

Segmento 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

| Extremidad pilórica | Cepa 11 | Control | Cepa 43 | Control | Cepa 44 | Control | Cepa 45 | Control | Cepa 47 | Control |
|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| ml | 20 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | + | - | - | - | - | - | + | - | + | - |

Quinta Inoculación

| Extremidad pilórica | Cepa 47 | Control | Cepa 45 | Control | Cepa 44 | Control | Cepa 43 | Control | Cepa 11 | Control |
|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| ml | 7 | 5 | 5 | 5 | 6 | 6 | 5 | 5 | 6 | 6 |
| | + | - | + | + | + | - | + | - | + | - |

Cantidad de inóculo 3 ml

+ Cuando hubo acúmulo de líquido

- Cuando no hubo acúmulo de líquido

ml Volumen de líquido acumulado en mililitros

TABLA 6. Comportamiento de las cepas de *C. perfringens* tipo A en el intestino delgado ligado de conejo.

Sexta inoculación

| | | | | | | | | | | |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| Segmento | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|

| | Cepa | Control | Cepa | Control | Cepa | Control | Cepa | Control | Cepa | Control |
|---------------------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|
| Extremidad pilórica | 13 | 49 | 52 | 57 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |

| | | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ml | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Séptima inoculación

| | Cepa | Control | Cepa | Control | Cepa | Control | Cepa | Control | Cepa | Control |
|---------------------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|
| Extremidad pilórica | 60 | 57 | 52 | 49 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 |

| | | | | | | | | | | |
|----|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ml | 5 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3 |
| | + | + | - | - | - | - | + | + | - | + |

Cantidad de inóculo 3 ml

+ : Cuando hubo acúmulo de líquido

- : Cuando no hubo acúmulo de líquido

ml : Volumen de líquido acumulado en mililitros

TABLA 7. Cuantificación de C. perfringens tipo A del líquido colectado en las asas durante la primera inoculación.

| Cepas Nos. | Recuento sin calor | Recuento con calor | % de esporulación |
|------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| 1 | 1.6×10^5 Células/ml | 9.0×10^4 Esporos/ml | 56.85 |
| 4 | 5.6×10^6 Células/ml | 1.6×10^5 Esporos/ml | 2.85 |
| 6 | 1.7×10^6 Células/ml | 7.0×10^4 Esporos/ml | 4.12 |

TABLA 8. Cuantificación de C. perfringens tipo A del líquido colectado en las asas durante la segunda y tercera inoculación.

| Cepas Nos. | Recuento sin calor | Recuento con calor | % de esporulación |
|------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| 1 | 5.4×10^5 Células/ml | Todas negativas | 0 |
| 4 | D N P C* | Todas negativas | 0 |
| 6 | 9.2×10^5 | 1×10^5 Esporos/ml | 10.8 |
| 7 | D N P C* | 1×10^5 esporos/ml | 0 |
| 8 | 8.2×10^5 | Todas negativas | 0 |

* D N P C = Demasiado numerosas para contar.

TABLA 9. Cuantificación de C. perfringens tipo A del líquido colectado en las asas intestinales durante la cuarta inoculación.

| Cepas Nos. | Recuento sin calor | Recuento con calor | % de esporulación |
|------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| 11 | 7×10^5 Células/ml | 1×10^5 Esporos/ml | 14.2 |
| 43 | 16×10^5 Células/ml | 1×10^5 Esporos/ml | .63 |
| 44 | 6×10^5 Células/ml | 2×10^5 Esporos/ml | 3.3 |
| 45 | D N P C* Células/ml | 1×10^5 Esporos/ml | |
| 47 | 10×10^5 Células/ml | 1×10^5 Esporos/ml | 10 |

* D N P C = Demasiado numerosas para contar.

TABLA 10. Cuantificación de C. perfringens tipo A del líquido colectado en las asas intestinales durante la quinta inoculación.

| Cepas Nos. | Recuento sin calor | Recuento con calor | %-de esporulación |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| 47 | 20×10^6 Células/ml | 1×10^6 Esporos ml | 5% |
| 45 | 25×10^6 Células/ml | 2×10^6 Esporos/ml | 8% |
| 44 | 35×10^6 Células/ml | 4×10^6 Esporos ml | 11.4% |
| 43 | 28×10^6 Células/ml | 18×10^6 Esporos ml | 64.3% |
| 11 | 15×10^6 Células/ml | 6×10^6 Esporos/ml | 40% |

TABLA 11. Cuantificación de C. perfringens tipo A del líquido colectado en las asas intestinales durante la sexta inoculación.

| Cepas Nos. | Recuento sin calor | Recuento con calor | % de esporulación |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| 13 | 25×10^5 Células/ml | 2×10^5 Esporos/ml | 8 |
| 49 | 30×10^5 Células/ml | 3×10^5 Esporos/ml | 10 |
| 52 | 38×10^5 Células/ml | 7×10^5 Esporos/ml | 18.42 |
| 57 | 44×10^5 Células/ml | 22×10^5 Esporos/ml | 50 |
| 60 | 14×10^5 Células/ml | 1×10^5 Esporos/ml | 7.14 |

TABLA 12. Cuantificación de C. perfringens tipo A del líquido colectado en las asas intestinales durante la séptima inoculación.

| Cepas Nos. | Recuento sin calor | Recuento con calor | % de esporulación |
|------------|--|-----------------------------------|-------------------|
| 60 | * DNPC x 10 ⁸ Células/ml | 3 x 10 ³ Esporos/ml | |
| 57 | DNPC x 10 ⁸ Células/ml | Todas negativas | |
| 52 | DNPC x 10 ⁸ Células/ml | Todas negativas | |
| 49 | DNPC x 10 ⁸ Células/ml | Todas negativas | |
| 13 | DNPC x 10 ⁸ Células/ml | Todas negativas | |

* DNPC = Demasiado numerosas para contar.

TABLA 13. Hallazgos histopatológicos en diferentes segmentos del intestino delgado de conejo: Primera inocularción

| No. de cepa | MUCOSA | | SUBMUCOSA | | MUSCULAR | | ADVENTICIA | |
|-------------|-----------------------|---------------|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|------------|------------------------------------|
| | Des- cama- ción | Necro- sis | Edema Hemorrag. celu- lar | Infil- trac. celu- lar | Edema Hemorrag. celu- lar | Infil- trac. celu- lar | | Edema Hemorrag. celu- lar |
| 1 | - | - | + | - | + | ++ | - | - |
| 2 | - | + | - | - | + | ++ | - | ++ |
| 3 | + | ++ | + | - | + | ++ | - | + |
| 4 | + | - | + | + | ++ | + | - | - |
| 5 | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 6 | + | + | - | + | ++ | + | - | - |
| 7 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| 8 | - | - | - | ++ | + | - | - | - |

* Difícil de evaluar por defecto del corte
 ** Segmento autolizado
 (-) No hay lesión
 (+) Cambios ligeros
 (++) Cambios moderados
 (C) Control

TABLE 14. Changes histopathological in different segments of the intestine of the guinea pig, second and third inoculation.

| No de Caja | No de Cepas | M U S C U L A R | | | | | | | | | | ADVENTITIA | |
|---------------|----------------|-----------------------------|---------------|----------------------------|-------------------------|----------|----------------|-------|-------------------------|------------------------------------|-------------------------|------------|----|
| | | Desz- meación epitel. | Neuro- sis | Congest. / Hemorrai. | Infilt. celu- lar | Congest. | Hemo- rrag. | Edema | Infilt. celu- lar | Edema Congest. y emorrai. | Infilt. celu- lar | | |
| 1 | 1 | + | + | + | ++ | +++ | - | ++ | +++ | - | - | - | - |
| 2 | 2 | - | - | ++ | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | 3 | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | 4 | + | - | ++ | + | ++ | ++ | + | - | - | - | - | - |
| 5 | 5 | - | - | +++ | - | +++ | +++ | - | - | - | - | - | ++ |
| 6 | 6 | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | 7 | + | + | +++ | + | ++ | + | + | + | + | + | + | + |
| 8 | 8 | - | + | - | - | + | - | + | + | - | - | - | - |
| 9 | 9 | - | - | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| 10 | 10 | - | - | + | - | + | - | + | + | - | - | - | - |
| 11 | 11 | - | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| 12 | 12 | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | - |

* Fácil de evaluar por defecto del corte

(-) No lesión

(+) Cambios leves

(++) Cambios moderados

(+++) Cambios severos

0 Control

Tabla 15. Hallazgos histopatológicos en diferentes segmentos del Intestino : Cuarta inoculación

| Nº de Segmento Depa. to Nº | VISCERA | | | SUBMUCOSA | | | MUSCULAR | | | ADVENTICIA | | | |
|-------------------------------|---------------------|---------------|------------|---------------------------------|------------------------|---------------------------------|----------------------|------------|------------------------|------------|-----------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| | Des- com- pón | Necro- sis | Ede- ma | Congest. y Hemorr. lar | Infil. celu- lar | Congest. y Hemorr. lar | Hemo- rrag. ma | Ede- ma | Infil. celu- lar | | Ede- ma y Hemorr. lar | Congest. y Hemorr. lar | Infil. celu- lar |
| 11 | + | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | - | - | - | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 43 | + | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | + | + |
| 5 | + | - | - | ++ | - | + | - | - | + | - | - | - | - |
| 44 | - | - | + | - | - | + | + | - | + | - | + | - | + |
| 5 | - | - | - | ++ | - | + | + | - | - | - | + | - | - |
| 45 | + | + | ++ | ++ | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 5 | + | - | - | + | - | + | + | - | + | - | + | - | + |
| 27 | - | - | ++ | + | - | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 5 | + | - | - | ++ | - | + | + | - | + | - | + | - | + |

(-) No hay lesión
 (+) Cambios leves
 (++) Cambios moderados
 (*) Control
 * Corresponde a la cepa A3 11

Tabla 16. Hallazgos histopatológicos en diferentes segmentos del intestino ; quinta inoculación.

| Nº de lección | M U C O S A | | | S U B - M U C O S A | | | M U S C U L A R | | | ADVENTICIA |
|------------------|---------------------------|--|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|------------|
| | Lesión de la mucosa | Lesión de la mucosa y hemorragia | Edema y hemorragia | Conj. y hemorragia | Edema y hemorragia | Infiltrado celular | Edema y hemorragia | Conj. y hemorragia | Infiltrado celular | |
| 47 | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 48 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 49 | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 50 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 51 | ++ | + | + | + | + | - | - | - | - | + |
| 52 | + | - | + | - | - | - | - | - | - | + |
| 53 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 54 | + | - | + | - | - | - | - | - | - | + |
| 55 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 56 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 57 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 58 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 59 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 60 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 61 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 62 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 63 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 64 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 65 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 66 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 67 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 68 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 69 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 70 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 71 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 72 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 73 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 74 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 75 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 76 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 77 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 78 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 79 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 80 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 81 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 82 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 83 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 84 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 85 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 86 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 87 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 88 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 89 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 90 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 91 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 92 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 93 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 94 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 95 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 96 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 97 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 98 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 99 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 100 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

() = 10% lesión
 (+) = 25% lesión
 (++) = 50% lesión moderada
 (-) = control
 * correspondiente al ser humano

TABLE 17. Hallazgos histopatológicos en diferentes segmentos del intestino : Sexta inoculación

| Nº de Cepes | M U C O S A | | | | | S U B - M U C O S A | | | | | MUSCULAR | | ADVENTICIA | | OBSERV. |
|----------------|--------------------------------------|-----------------------|------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------|------------------------|------------|--------------------------|------------------------|---------------------|------------|--|---|
| | Des- carga bacteri- ológica | Des- necro- sis | Ede- ma | Conjest. y Hemorr. | Infil. celu- lar | Conjest. y Hemorr. | Ede- ma | Infil. celu- lar | Ede- ma | Conjest. y Hemorr. | Infil. celu- lar | Infil. con past. | Hemorr. | | |
| 13 | + | +++ | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | | |
| 2 | + | +++ | - | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | | |
| 29 | + | ++ | - | + | - | + | + | + | - | + | ++ | - | - | | Vacuolizac. del plexo de Auerbach |
| 3 | + | + | - | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | | Coagulación y margina- ción de PMN |
| 52 | + | ++ | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | | Diapedesis e infiltración |
| 7 | + | - | - | + | - | + | + | + | - | + | + | - | - | | Hemorragia en la luz del tubo |
| 57 | + | + | - | + | - | + | + | + | - | + | + | + | + | | |
| 5 | ++ | + | - | ++ | - | ++ | + | + | - | + | + | + | - | | |
| 60 | - | - | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + | + | | |
| 6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | |

(+) No hay lesión
 (+) Hemorragia
 (++) Muchos macrófagos
 (+++) Muchos eosinófilos
 (-) Control

TABLA 19. Cálculo de Chi cuadrado (χ^2) para patogenicidad de las cepas ahaladas.

| | Cepas patógenas | Cepas no patógenas | Total | Porcentaje patogenicidad |
|--------------------------------|--------------------|--------------------------|-------|-----------------------------|
| Sanos | 3 | 7 | 10 | 30% |
| Enfermos y/o Recuperados | 4 | 1 | 5 | 80% |
| Total | 7 | 8 | 15 | |

Los datos son significantes con un 95% de confiabilidad y 5% de error.

H_0 : El estado clínico del animal es independiente de la patogenicidad de las cepas

H_a : El estado clínico del animal depende de la patogenicidad de las cepas.

$$\chi^2_C = 3.15 < \chi^2_T = 3.86$$

Tabla 20. Identificación y comportamiento en el intestino delgado de conejo de las cepas de *C. parviformis* tipo A aisladas de heces de equinos.

| Cepas No. | Estado clínico del animal | Comportamiento* | | % de formas vegetativas | | % de formas esporuladas | |
|-----------|---------------------------|-----------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------------------|-------------|
| | | la. inoculación | Replicación | la. inoculación | Replicación | la. inoculación | Replicación |
| 1 | Enfermo | + | + | 43.15 | 100 | 56.85 | 100 |
| 13 | Enfermo | + | + | 92 | 100 | 8 | 0 |
| 11 | Enfermo | + | + | 85.8 | 60 | 14.2 | 40 |
| 6 | Recuperado | + | + | 95.78 | 99.2 | 4.12 | 10.8 |
| 7 | Recuperado | + | - | 100 | 100 | 0 | 0 |
| 60 | Sano | + | - | 92.86 | 100 | 7.14 | 0 |
| 49 | Sano | + | - | 90 | 100 | 10 | 0 |
| 52 | Sano | + | - | 81.68 | 100 | 18.42 | 0 |
| 57 | Sano | + | - | 50 | 100 | 50 | 0 |
| 44 | Sano | - | + | 96.7 | 88.6 | 3.3 | 11.4 |
| 47 | Sano | + | + | 90 | 95 | 10 | 5 |
| 43 | Sane | - | - | 99.2 | 35.7 | 0.63 | 64.3 |
| 4 | Sano | + | + | 97.15 | 100 | 2.85 | 0 |
| 45 | Sano | + | + | 100 | 92 | 0 | 8 |
| 8 | Sano | - | - | 100 | 100 | 0 | 0 |

* : Comportamiento de la cepa en el segmento intestinal ligado de conejo.
 + : Cuando hubo acúmulo de líquido en los segmentos intestinales del conejo.
 - : Cuando no hubo acúmulo de líquido en los segmentos intestinales del conejo.

TABLA 21. Distribución de muestreo y aislamiento de C. perfringens en equinos.

| Animales | Animales muestreados | Aislamientos positivos | Porcentaje aislamientos |
|-------------|----------------------|------------------------|-------------------------|
| Recuperados | 5 | 2 | 40% |
| Enfermos | 7 | 3 | 43 |
| Sanos | 50 | 10 | 20 |
| TOTAL | 62 | 15 | |
