



## ASLAMIENTO DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TIPO A BETA2 POSITIVO EN OVINO

Cattáneo, M. ; Bermúdez, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Bacteriología. Departamento de Ciencias Microbiológicas. Facultad de Veterinaria. Udelar. Uruguay. catta1973uy@yahoo.es

### Resumen

*Clostridium perfringens* es el agente causal de importantes enfermedades entéricas de los animales domésticos denominadas enterotoxemias. Este microorganismo se clasifica en 5 taxonotipos (A, B, C, D y E) de acuerdo a la producción de cuatro toxinas mayores llamadas alfa (á-), beta (â-), epsilon (ê-) e iota (é-). También pueden producir otras toxinas denominadas menores como la beta2 (â2-). El objetivo de esta comunicación es el de reportar el aislamiento de *Clostridium perfringens* tipo A â2 positivo en un caso de muerte de un ovino. Este es el primer reporte sobre el aislamiento de este agente en nuestro país. Si bien la bibliografía describe patologías ocasionadas por *Clostridium perfringens* tipo A â2 positivo esta es discutida ya que este microorganismo se aísla de animales clínicamente sanos, por lo que se recomienda realizar más estudios e incluir este agente en el diagnóstico bacteriológico en casos de muertes de ovinos.

### Summary

*Clostridium perfringens* is the major causative agent of enteric diseases of domestic animals called enterotoxemias. This organism is classified into five toxinotypes (A, B, C, D and E) according to the production of four major toxins called alpha (á-), beta (â-), epsilon (ê-) and iota (é-). They can also produce other toxins, including beta2 (â2-). The purpose of this communication is to report the isolation of *Clostridium perfringens* type A positive â2 in a case of death of a sheep. This is the first report on the isolation of this agent in our country. Although the literature describes diseases caused by *Clostridium perfringens* type A positive â2 this is discussed as this organism is isolated from clinically healthy animals, so further study is recommended to include this agent in the bacteriological diagnosis in cases of deaths of sheep.

### Introducción

*Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) es el agente causal de importantes enfermedades entéricas de los animales domésticos denominadas enterotoxemias. *C. perfringens* se clasifica en 5 taxonotipos (A, B, C, D y E) de acuerdo a la producción de cuatro toxinas mayores llamadas alfa (á-), beta (â-), epsilon (ê-) e iota (é-). También pueden producir otras toxinas, incluyendo beta2 (â2-) (Garmory, 2000; Johansson, 2006; Lobato, 2007; Uzal, 2010). La toxina alfa es producida por todas las cepas de *C. perfringens*. Esta provoca lisis de los eritrocitos, plaquetas, células endoteliales, musculares y enterocitos, y tiene una potente acción necrótica y letal (Costa, 2004). La toxina â2 puede ser producida por

todo los biotipos de *Clostridium perfringens*, pero no por todas las cepas (Songer, 2005). *C. perfringens* tipo A, productores de toxina â2, fueron aislados en lechones y caballos con enterocolitis necrótica. Estudios revelan que las cepas de *C. perfringens* tipo A pueden ser â2 positivo o negativo (Klaasen, 1999). Aunque *C. perfringens* tipo A ha sido aislado de casos de enteritis, abomasitis y / o enterotoxemia en vacas, ovejas, equinos, cabras y cerdos, el rol de esta toxina en producción de enfermedad es controvertido ya que también está presente en el contenido intestinal de animales clínicamente sanos. Si hay trabajos experimentales en donde se ha reproducido la enfermedad por *C. perfringens* tipo A en diferentes especies animales (Uzal, 2010).

### Objetivo

El objetivo de esta comunicación es el de reportar el aislamiento de *Clostridium perfringens* tipo A â2 positivo en un caso de muerte de un ovino.

### Materiales y método

El caso ocurrió en un establecimiento del Departamento de Salto y el ovino afectado fue una hembra, boca llena, raza Corriedale, con gestación de mellizos. El animal presentaba un buen estado corporal y se alimentaba en una pradera de trigo y raigrás en excelente estado junto a novillos. Se observó al animal postrado y una hora más tarde murió. A la necropsia se encontraron pulmones con zonas de hepatización, hígado friable, intestino delgado sin contenido con zonas hemorrágicas y la placenta con focos de necrosis. No se encontraron parásitos en el aparato digestivo ni faciola hepática en hígado. El resto de la majada se encontraba en campo natural y no presentaron problemas al igual que los novillos que pastoreaban en la pradera. Se remitieron hígado, riñón y contenido intestinal para diagnóstico bacteriológico.

### Diagnóstico bacteriológico

Las muestras remitidas se procesaron para aislamiento de bacterias aerobias y anaerobias. Para aislamiento aerobio se sembró en caldo tripticasa soya y placas de agar sangre. Para aislamiento anaerobio se sembró en medio cooked meat (CM) y placas de agar sangre. A las colonias obtenidas se le realizó tinción de Gram y posteriormente inoculación de animales de laboratorio, PCR y seroneutralización en ratones. Del cultivo aerobio no se obtuvo crecimiento y del anaerobio se obtuvo crecimiento de colonias con doble hemólisis. Estas colonias se repicaron en medio CM, el sobrenadante se centrifugó y filtró por filtros de 0.2 µm e inocularon ratones y se realizó la técnica de seroneutralización en ratones con las antitoxinas alfa, beta y epsilon de referencia. A estas colonias se le realizó PCR para la búsqueda de los genes

para las toxinas alfa, beta, épsilon y beta 2 de *C. perfringens*. Se observó en las muestras procesadas bacilos Gram positivos únicamente. A la inoculación de ratones se observó la muerte de estos a los 10 minutos de inoculados con hemorragias por los orificios naturales. Por la técnica de seroneutralización resultó positivo para la toxina alfa y negativo para las restantes. El PCR de las colonias obtenidas del cultivo del hígado, riñón e intestino resultó positivo para la toxina alfa y  $\beta$ 2. Con la cepa aislada se realizó la reproducción experimental de la enfermedad en ovinos. Se inoculó un ovino (cordero) por vía intraduodenal, con un cultivo con  $2 \times 10^8$  UFC/mL y no vacunado contra clostridiosis. Al animal presentó a las dos horas de inoculado aumento de temperatura, decaimiento, muriendo a las 8 horas. Se realizó la necropsia encontrándose yeyuno con gas y hemorrágico. Previo a la inoculación se retiró materia fecal para bacteriología aislándose *C. perfringens* tipo A  $\beta$ 2 negativo. Del yeyuno hemorrágico se aisló *C. perfringens* tipo A  $\beta$ 2 positivo.

#### Discusión y conclusión

Se aisló e identificó *C. perfringens* tipo A  $\beta$ 2 positivo del material estudiado. Se discute la participación de esta bacteria como causante de muerte en los animales domésticos debido a que también se encuentran en el intestino de los animales sanos y es un invasor post mortem. Se han reportado diferentes patologías digestivas y se han reproducido enfermedades en forma experimental asociado a *C. perfringens* tipo A (Uzal, 2010). La toxina  $\beta$ 2 está asociada a enfermedades entéricas en suínos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos y animales salvajes y actúa en forma sinérgica junto a toxinas mayores de *C. perfringens* en la producción de una enteritis necrótica y hemorrágica. Si bien se han encontrado cepas  $\beta$ 2 positivo de *C. perfringens* en el intestino de animales sanos, se han aislado en mayor proporción cepas  $\beta$ 2 en el intestino de suínos con diarrea comparado con animales sin diarrea (Garmory, 2000; Uzal, 2010). Este es el primer reporte sobre el aislamiento de este agente en nuestro país y teniendo en cuenta que se discute su participación como agente etiológico en

muertes de animales domésticos, se recomienda realizar más estudios e incluir este agente en el diagnóstico bacteriológico en casos de muertes de ovinos.

#### Referencias bibliográficas

- Costa, G.M.; Assis, R.A.; Lobato, F.C.F.; Abreu, V.L.V.; Santos, J.L.; Uzal, F.A. (2004) Diarréia em leitões lactentes por *Clostridium perfringens* tipo A em granjas tecnificadas nos estados de Minas Gerais e Sao Paulo. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. V. 56, n.3.p. 401-404.
- Dray, T. (2004) *Clostridium perfringens* type A and B2 toxin associated with enterotoxemia in a 5-week-old goat. Can. Vet. J. 45. Pág.:251-253.
- Garmory, H.S.; Chanter, N.; French, N.P. Bueschel, D.; Songer, J.S.; Titball, R.W. (2000) Occurrence of *Clostridium perfringens*  $\beta$ 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. Epidemiol. Infect. 124, p. 61-67.
- Johansson, A.; Aspan, A.; Bagge, E.; Baverud, V.; Engstron, B.E.; Johansson, K.E. (2006) Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. BMC Microbiology. 6: 47, p. 2-12
- Klaasen, H.; Molkenboer, M.; Bakker, J.; Miserez, R.; Hani, H.; Frey, J.; Popoff, M.; van de Bosch, J. (1999) Detection of the  $\beta$ 2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. Immunology and Medical Microbiology. 24. Pág.: 325-332.
- Lobato, F.C.; Salvarani, F.M.; Assis, R.A. (2007) Clostridioses dos pequenos ruminantes. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. 102 (561-562), p. 23-34.
- Songer, J.G.; Uzal, F.A. (2005) Clostridial enteric infections in pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 17. P. 528-536.
- Uzal, F.A.; Vidal, J.E.; McClane, B.A.; Gurjar, A.A. (2010) *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian Veterinary diseases. The Open Toxinology Journal. 3, p. 24-42.