

Brote de Hemoglobinuria Bacilar: diagnóstico confirmatorio y medidas de control.

Vet. Arg. ? Vol. XXXVI ? N° 377 ? Septiembre 2019.

Koval, A.1, Saint Martin¹, M., Ferreyra¹, A., Di Paolo¹, J., Rodriguez, A.2, Elias, G.3

Resumen

Se describe un brote de hemoglobinuria bacilar detectado en 2 establecimientos ganaderos pertenecientes a la misma firma, próximos a la localidad de Rauch, Provincia de Buenos Aires. Se detalla la metodología diagnóstica y el plan sanitario implementado para frenar la mortandad de animales.

Palabras clave: hemoglo0binuria, vacunos, medidas de control.

**Outbreak of Bacillary Hemoglobinuria: confirmatory diagnosis and control measures
Summary**

An outbreak of bacillary hemoglobinuria detected in 2 livestock establishments belonging to the same firm, near the town of Rauch, Province of Buenos Aires, is described. The diagnostic methodology and the health plan implemented to curb animal mortality are detailed.

Key words: hemoglobinuria, bovine cattle, control.

1-Biogénesis Bagó

2-INTA Balcarce

3-Actividad privada

Ariel.koval@biogenesisbago.com

Introducción

La Hemoglobinuria Bacilar es una enfermedad aguda y mortal producida por *Clostridium haemolyticum*, también denominado *Clostridium novyi* tipo D.

Se ha descrito en numerosas regiones del mundo, pero siempre circunscriptas y asociada a la presencia del parásito *Fasciola hepatica*.

Su patogenia es compleja dado que la presencia de esporas del microorganismo en el hígado de los animales afectados es una condición necesaria pero no suficiente para desencadenar la enfermedad. Debe coincidir con una lesión hepática que genere las condiciones de destrucción tisular y anaerobiosis para la germinación de los esporos y la producción de toxinas.

Las larvas migrantes de *Fasciola* son el factor primario del daño del parénquima hepático descrito en la literatura clásica¹.

También la compresión hepática que produce un feto en los últimos meses de preñez

puede generar una zona de hipoxia que favorezca la germinación y posterior multiplicación del clostridio.

Sin embargo, en la región donde se encuentran ambos establecimientos (cuenca del salado) se han descrito en los últimos años numerosos casos sin encontrar presencia del parásito y en animales no gestantes por lo cual la causa predisponente no ha sido aún dilucidada².

El personal y los veterinarios que trabajan en establecimientos donde la enfermedad se presenta con frecuencia, aprenden rápidamente a identificar los animales afectados ya sea por la hemoglobinuria o bien en la necropsia por la observación de los focos necróticos característicos en el hígado.

Durante años la aplicación de las vacunas disponibles resultó poco eficaz para controlar esta enfermedad hasta la aparición de una vacuna monovalente específica que ha probado su eficacia en algunos establecimientos donde murieron muchos animales antes de su inclusión dentro del plan sanitario*.

La confirmación diagnóstica por cultivo, aislamiento y tipificación del agente etiológico requiere un equipamiento relativamente sencillo pero de personal capacitado y de una técnica anaerobia estricta, porque *Clostridium haemolyticum* es extremadamente sensible a la presencia de oxígeno 3, 4, 5 .

Se describe una metodología que ha resultado muy efectiva para el aislamiento exitoso de la bacteria y también la implementación de un plan sanitario que a lo largo de los años se ha consolidado para controlar esta enfermedad en los establecimientos problema.

Materiales y métodos

Descripción de los casos y toma de muestras

Se encontraron animales muertos en 2 campos de la misma empresa, ambos atravesados por el mismo curso de agua como factor en común. En el primero de ellos, en un rodeo de 128 vacas adultas con 126 terneros, se detectaron 12 animales adultos muertos en el transcurso de 3 semanas.

En el segundo establecimiento de la firma, en un rodeo de 882 vaquillonas se registraron 28 muertes en aproximadamente el mismo período.

Los primeros animales se encontraron muertos en avanzado estado de putrefacción, por lo cual con posterioridad se procedió a efectuar necropsias sobre animales recientemente muertos. En estos se observaron focos necróticos característicos en el hígado, determinantes para el diagnóstico clínico.

Se tomaron muestras de 2 animales, consistentes en 2 cubos de hígado, tomando parte del foco necrótico y parte adyacente, de aproximadamente 5 cm de lado colocados en frascos de boca ancha con glicerina al 50 % en agua.

Las muestras se conservaron a temperatura ambiente y se remitieron al laboratorio.

Procesamiento de muestras y técnicas de siembra

La metodología utilizada para la conservación, transporte y procesamiento de muestras, medios de cultivo y técnica bacteriológica ha sido descrita en una publicación anterior³.

Tipificación por seroneutralización

Se efectuó la tipificación clásica para *C. novyi*, utilizando antitoxinas Alfa y Beta de referencia⁴. Se cultivó el microorganismo, se centrifugó, se pasó el sobrenadante de cultivo por un filtro de 0.22 μ y se congeló a -90°C hasta la realización de la prueba.

En 2 tubos plásticos se combinaron muestras del cultivo filtrado (0,5 mL) con antitoxinas Alfa (0,5 mL, tubo 1) y Beta (0,5 mL, tubo 2) de *Clostridium novyi*. Como control se empleó agua peptonada (0,5 mL) en combinación con la muestra de cultivo filtrado (0,5 mL, tubo 3). Los 3 tubos se incubaron 30 minutos a 37°C en baño térmico. Con cada combinación se inocularon 2 ratones por vía intravenosa con 0.2 mL y se observaron durante 72 horas.

Reacción de PCR

La reacción de amplificación se realizó a partir de ADN plasmídico, extraído con un kit Wizard Plus minipreps DNA purification system, de Promega, usando los siguientes primers:

F: 5'-GCTACTGAGACTATGCACA-3' (nucleótidos 1043-1061)

R: 5'-GCTATATCTTGAAGTGTTAACTTA-3' (nucleótidos 1324-1347)

La reacción se llevó a cabo usando el kit TaqPegasus (PB-L) en un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf), bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95°C por 5 min., seguidos por 30 ciclos a 95°C por 30 seg., 55°C por 30 seg. y 70°C por 20 seg. Por último una extensión final a 70°C por 5 minutos.

La electroforesis se efectuó sobre gel de agarosa 2% (Biodynamics) y la visualización de los productos de amplificación en un foto documentador marca Syn-Gen, modelo GBox XT-4, calibrado para lectura de productos teñidos con Sybr-Green II.

Medidas de control a campo

La presentación de los casos en potreros bajos atravesados por el mismo arroyo y la presencia, en estos, de caracoles del género *Lymnaea*, huésped intermediario indispensable para el ciclo parasitario, hizo sospechar de *Fasciola hepatica*. Se tomaron muestras de materia fecal de 30 animales para su examen coproparasitológico.

Al mismo tiempo, se aplicaron 2 dosis de vacuna monovalente para prevención de hemoglobinuria bacilar con un intervalo de 15 días a todo el rodeo.

Resultados

Procesamiento de muestras y técnicas de siembra

De las 2 muestras analizadas se aisló *Clostridium haemolyticum*. En el caldo Tarozzi se observó presencia de bacilos grandes, Gram positivos, esporulados compatibles con un *Clostridium*, y otras formas microbianas.

El caldo Tarozzi se calentó a 70 ° C durante 30 minutos y se sembró en placas de agar sangre y agar yema de huevo, incubando en atmósfera anaerobia, durante 48 horas a 37°C. Se evidenciaron colonias hemolíticas, lecitinasa positivas, de las cuales se repicó a nuevos medios para continuar con la identificación.

Tipificación por seroneutralización

La clasificación de *C. novyi* en tipos A,B y D (*C. haemolyticum*) se basa en la producción de 2 toxinas mayores, Alfa y Beta. El tipo A produce solamente toxina Alfa, el B produce ambas y *C. haemolyticum* produce solamente toxina Beta.

Los ratones inoculados con la muestra y agua peptonada (control, tubo 3) y muestra y antitoxina Alfa (tubo 1), murieron antes de las 24 horas.

Los ratones inoculados con la combinación de muestra y antitoxina Beta (tubo 2) sobrevivieron, indicando que el microorganismo aislado produce únicamente toxina Beta y, por lo tanto, se identificó como *C. haemolyticum*.

Reacción de PCR

Se amplificó un fragmento de 304 pb perteneciente al gen que codifica la producción de toxina Beta de *C. haemolyticum*.

Discusión

El objetivo de la conservación en glicerina al 50 % es permitir la esporulación del clostridio y la reducción de contaminantes presentes en las muestras obtenidas en condiciones "de campo".

Esta metodología ha sido probada con muestras obtenidas poco tiempo después de la

muerte del animal. Si el animal lleva varias horas muerto es probable que la invasión post mortem por otros esporulados limite las chances para el aislamiento 3.

Según resultados de los autores 3, la siembra previa en un medio enriquecido para anaerobios, como el clásico caldo Tarozzi, permite una mayor recuperación de los clostridios exigentes, como *C. haemolyticum*, a pesar del desarrollo potencial de otras bacterias. Si se observa al microscopio la presencia de bacilos grandes, esporulados, Gram positivos, se puede someter una alícuota a 70 °C en baño maría durante 15 a 30 minutos para eliminar los contaminantes y a partir de allí realizar la siembra en placas de agar sangre y agar yema de huevo.

A todo lo anterior tener en cuenta el empleo de medios de cultivo de reciente preparación, con mayor concentración de agar en el caso de los sólidos y la regeneración por ebullición en baño maría de los medios líquidos, como así también el empleo de recipientes y sistemas de anaerobiosis probados y tener los materiales listos para pruebas de identificación, reduciendo al mínimo el tiempo de exposición de las muestras al aire atmosférico 5, 6.

En cuanto a la profilaxis, a partir de la aplicación de la segunda dosis de la vacuna monovalente, cesó la mortandad de animales. En estos casos se recomienda repetir la vacunación cada 4 meses durante el primer año, para luego aplicar cada 6 meses a partir del segundo año.

En campos donde se confirme la presencia de *Fasciola* deberá implementarse un tratamiento antiparasitario específico dentro del plan sanitario.

Con posterioridad a los muestreos y vacunación de los rodeos problema, en un potrero lindante murieron 17 vacas preñadas sobre un total de 150 que componían el rodeo, en el transcurso de una semana. Este rodeo no estaba vacunado.

Pese a que se remitieron muestras al laboratorio para examen coproparasitológico y se efectuó análisis histopatológico de hígados de animales muertos no se pudo poner en evidencia la presencia de *Fasciola hepatica*.

Tampoco las vacas preñadas que murieron tenían preñeces tan avanzadas para justificar una hipoxia a nivel hepático por compresión de un feto grande, por lo cual el factor desencadenante de la enfermedad no pudo ser esclarecido.

**Revervac Hemoglobinuria*

Bibliografía

1-Blood, D.C., Henderson, J.A., Radostits, O. Medicina Veterinaria, 7º edición (1992).

2-Guglielmone, V., Preisseger, G., Rivero, M. Tesina de Orientación en Producción de Bovinos de Carne, UNCPBA (2010). Hemoglobinuria Bacilar Bovina en el área de influencia de INTA Balcarce, Provincia de Buenos Aires.

3- Saint Martin, M., Ferreyra, A., Brutti, C., López, C., López, S., Bentancor, L., Koval, A. Aislamiento de 5 cepas de *Clostridium haemolyticum*: descripción de la metodología para aislamiento y tipificación (2014). Vet.Arg. Vol. XXXI N° 314.

4-Popoff M, Bouvet P. Clostridial toxins. Future Microbiol. (2009). 4:1021-64.

5-Carlóni G. El género *Clostridium*. En: Stanchi N, editor. Microbiología Veterinaria, 1º edición (2007). Buenos Aires, Inter-Médica.

6-Sterne, M., Batty, I. Clostridios Patógenos (1978). Editorial Acribia.
