

01/06/16 - Enteritis hemorrágica en un equino atribuida a *Clostridium perfringens* tipo A.

Vet. Arg. ? Vol. XXXIII ? Nº 338 ? Junio 2016.

Robles, C.A.1*; Pavan, M.E.2,3; Chaperó, C.4; Marcellino, R.1; Cairó, F.2,5;
 Mignaqui, A.C.1,6

Resumen

La muerte de equinos con cuadros clínicos de cólico es frecuente, especialmente en animales estabulados y con fines deportivos. Sin embargo, al ser muy bajo el porcentaje de animales que son necropsiados y muestreados, la mayoría de los casos queda con un diagnóstico incierto, que impide establecer la causa de muerte. En el presente trabajo se presentan y analizan los hallazgos clínicos, histopatológicos y bacteriológicos de un equino que muere a las 48 h con un cuadro clínico de cólico. A la necropsia los hallazgos más importantes fueron ruptura del estómago, intestino delgado color rojo oscuro con la pared aumentada de espesor y el hígado color amarillento y aspecto de nuez moscada. De los cultivos anaeróbicos de hígado se aisló *Clostridium perfringens* tipo A.

Si bien el rol de *C. perfringens* en infecciones intestinales en equinos es motivo de controversias, en este caso se aporta información sobre la posible relación entre la presencia de esta bacteria y casos de enteritis hemorrágicas severas o enterotoxemias en equinos.

Se alerta sobre la posibilidad de que las enteritis hemorrágicas sean más frecuentes de lo esperado y por ende la necesidad de estudiarlas en mayor profundidad.

Palabras clave: equinos, cólicos, enteritis hemorrágica, enterotoxemia, Clostridium perfringens.

Equine haemorrhagic enteritis attributed to *Clostridium perfringens* type A.

Summary

The death of horses with clinical symptoms of colic is common, especially in confined and for sport animals. Since a small percentage of death horses due to colics are necropsied and sampled, it prevents Vets to reach a final diagnosis and to establish the cause of death.

The aim of the present work was to describe the clinical, histopathological and bacteriological findings of a horse that died after having colics. The most important findings observed during necropsy were rupture of the stomach, dark red colour of the small intestine with increased wall thickness and a yellowish colour of the liver with nutmeg appearance. *Clostridium perfringens* type A was isolated from the liver. While the role of *C. perfringens* in intestinal infections in horses is controversial, in

this case information on the possible relationship between the presence of this bacterium in cases of severe hemorrhagic enteritis or enterotoxemias in horses is provided.

It is possible that hemorrhagic enteritis is more frequent than expected; therefore there is a need to be alert on the occurrence of this disease in horses with colics.

Keywords: equine, colic, haemorrhagic enteritis, enterotoxemia, Clostridium perfringens.

1 Grupo de Salud Animal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Bariloche, Argentina.

2 Laboratorio de Biología Molecular, Biochemiq S.A., Buenos Aires, Argentina.

3 Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

4 Actividad privada, Bariloche, Argentina.

5 Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

6 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.

* Correspondencia: Dr. Carlos Robles. email: robles.carlos@inta.gob.ar
Grupo de Salud Animal, INTA, CC 277 (8400) Bariloche, Argentina

Introducción

Clostridium perfringens es un microorganismo anaerobio que reside en el suelo y el agua, donde puede sobrevivir por años en estado de spora y también es un habitante normal del intestino de varios mamíferos, incluyendo al hombre (Sterne y Batty, 1978). Ocasionalmente, ante cambios bruscos de alimentación, stress u otros factores que alteran el ambiente intestinal del huésped, puede proliferar y liberar toxinas u otras enzimas hidrolíticas produciendo enfermedad. En base a la producción de las cuatro toxinas mayores (? , ? , ? y ?), *C. perfringens* se clasifica en cinco toxinotipos: A, B, C, D y E (Sterne y Batty, 1978). Además de las toxinas mayores las diferentes cepas de *C. perfringens* pueden producir otras toxinas, algunas de las cuales son importantes factores de virulencia como las toxinas beta-2 y enterotoxina. (Songer, 1996).

Es escasa la información existente sobre infecciones intestinales en equinos atribuidas a *C. perfringens* (Wierup, 1977; Sáez, 1992; Radostitis y col., 1994). A pesar de ello, esporádicamente se reciben en el Grupo de Salud Animal del INTA Bariloche, casos de muerte aguda de equinos con sintomatología de cólicos, que al realizar la necropsia, presentan o un cuadro de paresia intestinal con estomago dilatado y acúmulo de materia fecal en intestino grueso correspondiente a la forma aguda de Mal Seco (Robles y col. 1993; Robles y col 1998 b), o un cuadro de enteritis hemorrágica con presencia de bacilos Gram positivos compatibles con *Clostridium spp*, en raspajes de mucosa intestinal.

El objetivo de este trabajo es presentar un caso clínico de enteritis hemorrágica en equinos, que llamó la atención por la severidad de las lesiones observadas en el intestino delgado y alertar sobre la posibilidad de que este cuadro de enteritis hemorrágica esté asociado a *C. perfringens* tipo A.

Materiales y métodos

Caso clínico

Un equino de polo, macho, castrado, de 15 años de edad, muere tras padecer un cuadro de cólico severo. El animal había estado bajo confinamiento en un club de polo y a mediados del otoño (abril) había sido llevado junto con otros 30 caballos a una estancia ubicada en la precordillera neuquina donde permaneció hasta mediados de la primavera (octubre). Durante ese período murieron seis de los 30 animales, desconociéndose la causa de muerte de los mismos. A su regreso al club de polo, el animal fue sometido a una dieta consistente en 3 kg de heno de alfalfa, dos veces por día y 3 kg de avena, una vez por día. A los 15 días el animal presenta fascie dolorosa con ollares retraídos, mirada ansiosa, aumento de los borborigmos intestinales, 80 pulsaciones por m, llenado capilar en 3 s, repleción yugular de 5 s y deshidratación leve. El animal es medicado con meglumina de flunixin, hioscina, novalgina y 10 millones de penicilina con 1 gramo de estreptomicina como dosis de ataque, continuándose con la mitad de la dosis cada 12 h. También recibió vaselina con agua tibia y antiespumantes por sonda nasoesofágica y por enema. Al día siguiente se encuentra al animal echado, con signos de golpes en la cabeza y con manifestaciones de cólico, muriendo a las 48 h de iniciado el cuadro.

Obtención y procesamiento de muestras

Tras la muerte del animal se procedió a realizar la necropsia. Durante la misma se realizaron raspajes con portaobjetos de la mucosa intestinal afectada, se tomaron muestras de hígado y duodeno en forma aséptica para cultivos bacteriológicos y muestras de hígado, duodeno y ganglio celíaco mesentérico que fueron fijadas en formol buferado al 10% para estudios histopatológicos (Robles, y col, 1996; Robles, 1998 a). Los raspajes intestinales fueron teñidos con la coloración de Gram y las muestras para histopatología fueron incluidas en parafina, cortadas a 5 micras de espesor y teñidas con hematoxilina-eosina, según técnicas de rutina.

Las muestras frescas de hígado y duodeno fueron cultivadas en medio Tarozzi a 37°C durante 24 h, en jarra de anaerobiosis. Transcurrido ese período se realizaron repiques en placas de Agar Sangre Columbia (ASC) y se incubaron nuevamente a 37°C en anaerobiosis. Las placas de ASC se observaron luego de 24 h de incubación y las colonias, que reunían las características compatibles con *C.*

perfringens tanto macro como microscópicamente, fueron aisladas en placas de ASC para su posterior identificación mediante las siguientes pruebas bioquímicas: CAMP inversa, gelatinasa, producción de H₂S, esculina, lecitinasa, lipasa, almidón e indol. (Sterne y Batty, 1978).

La caracterización molecular de la cepa aislada se realizó mediante una PCR múltiple que permite la diferenciación de los toxinotipos de *C. perfringens* y la detección de las toxinas menores beta 2 y enterotoxina. A partir de una alícuota de cultivo líquido se realizó la extracción de ADN utilizando la resina Chelex (Biorad) según las instrucciones del fabricante.

La mezcla de reacción consistió de buffer Taq ADN polimerasa, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 2 unidades de Taq ADN polimerasa y los oligonucleótidos previamente descritos para los genes *cpa*, *cpb*, *cbp2*, *etx*, *iA* y *cpe* (Meer, 1977; Garmory, 2000). En los ensayos se incluyó agua como control negativo y como controles positivos se utilizaron las siguientes cepas: *C. perfringens* tipo C (toxinas *cpa* y *cpb*), tipo D (toxinas *cpa* y *etx*) y tipo E (toxinas *cpa*, *iA*, *cbp2* *cpe*). Las PCRs se realizaron de la siguiente manera: incubación a 94°C durante 2 min., seguida de 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 s, anillado a 55°C por 45 s y extensión a 72°C por 60 s, con un ciclo final a 72°C durante 10 m. Los productos de amplificación se analizaron en gel de agarosa. Los tamaños de los fragmentos fueron estimados usando un marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder 100 pb Precision, PB-L).

Resultados

Al abrir el animal se observó ruptura del estómago con presencia de unos 3 litros de líquido sero-sanguinolento, con esparcimiento de parte del contenido estomacal en el abdomen. Llamó la atención una porción de unos 2,5 m de intestino delgado que presentaba un color rojo oscuro brillante (Figura 1).



Figura 1: Intestino delgado al momento de la necropsia. Nótese el contraste entre las zonas afectadas (color rojo oscuro) de las zonas sanas (color rosado claro). Al corte, se pudo observar que en el sector afectado la pared estaba aumentada de espesor y completamente hemorrágica (Figura 2).

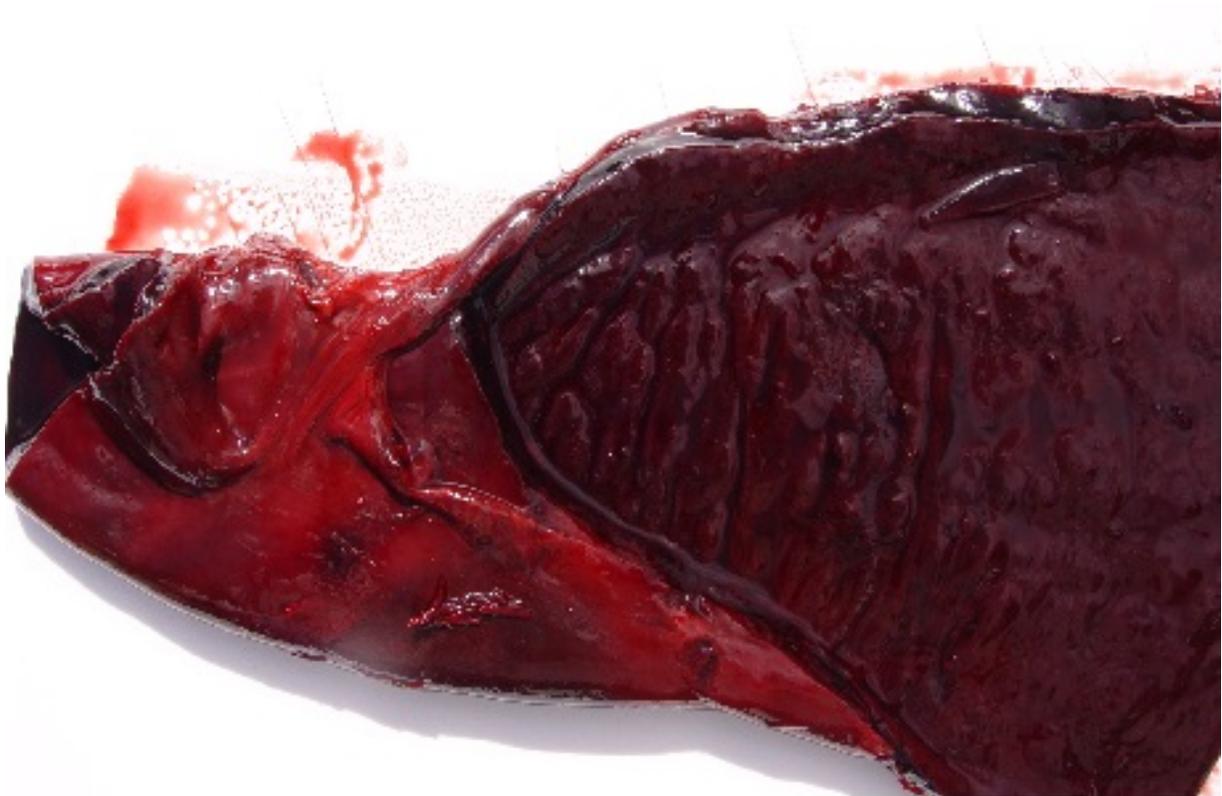


Figura 2: Corte de intestino delgado, donde puede observarse el estado hemorrágico de la mucosa y de la serosa como así también el espesor aumentado de la pared intestinal. El contenido de esta sección intestinal era líquido y hemorrágico. El resto del intestino delgado y el intestino grueso conservaban un aspecto normal. El hígado presentaba una coloración amarillenta y con aspecto de nuez moscada al corte (Figura 3).



Figura 3: Corte de hígado a la necropsia, con un típico aspecto de nuez moscada. A la histopatología pudo observarse hemorragia masiva de la mucosa y sobre todo de la submucosa, con necrosis y erosión del epitelio intestinal. En hígado se detectó vacuolación severa de hepatocitos a nivel centro y medio acinar con degeneración de los mismos y hemorragia severa a nivel centrolobulillar con edema de la pared de la vena central (Figura 4). En el ganglio celíaco mesentérico no se detectaron cambios en los cuerpos neuronales.

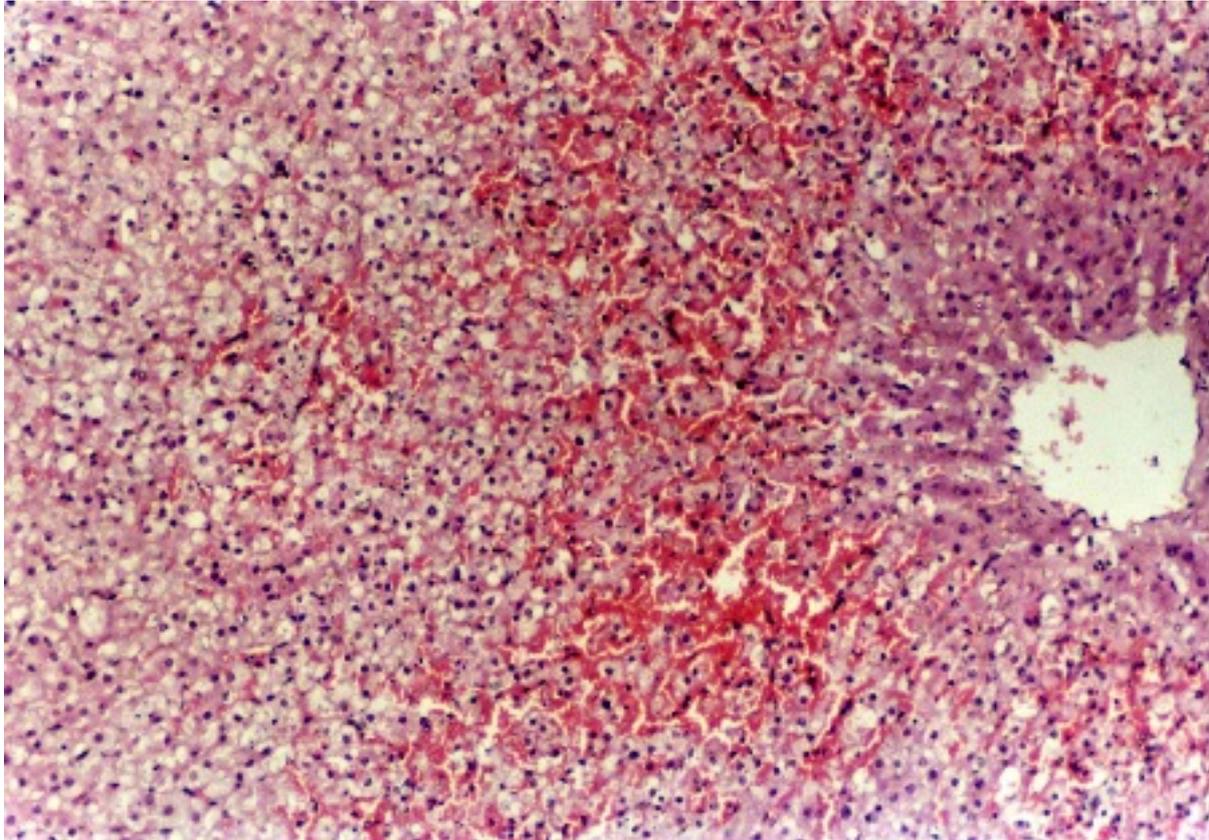


Figura 4: Corte histológico de hígado donde puede observarse vacuolación severa y degeneración de hepatocitos y hemorragia a nivel centrolobulillar. En los raspajes de mucosa de la zona afectada, realizados durante la necropsia, se observó la presencia de escasa cantidad de bacilos Gram positivos grandes compatibles con *Clostridium spp.*

Del cultivo anaeróbico de la muestra de hígado se aisló un bacilo Gram positivo que presentó doble halo de hemólisis y que en las pruebas bioquímicas permitió obtener los siguientes resultados: CAMP inversa (+), gelatinasa (+), producción de H₂S (+), esculina (+ débil), lecitinasa (+), lipasa (-), almidón (+) e indol (-). Estos resultados permitieron identificar al aislamiento bacteriano como *C. perfringens*. El aislamiento fue caracterizado molecularmente con la PCR múltiple descrita, observándose únicamente la banda para el gen de la toxina ? (tamaño esperado ? 325 pares bases), correspondiente a *C. perfringens* tipo A (Figura 5).

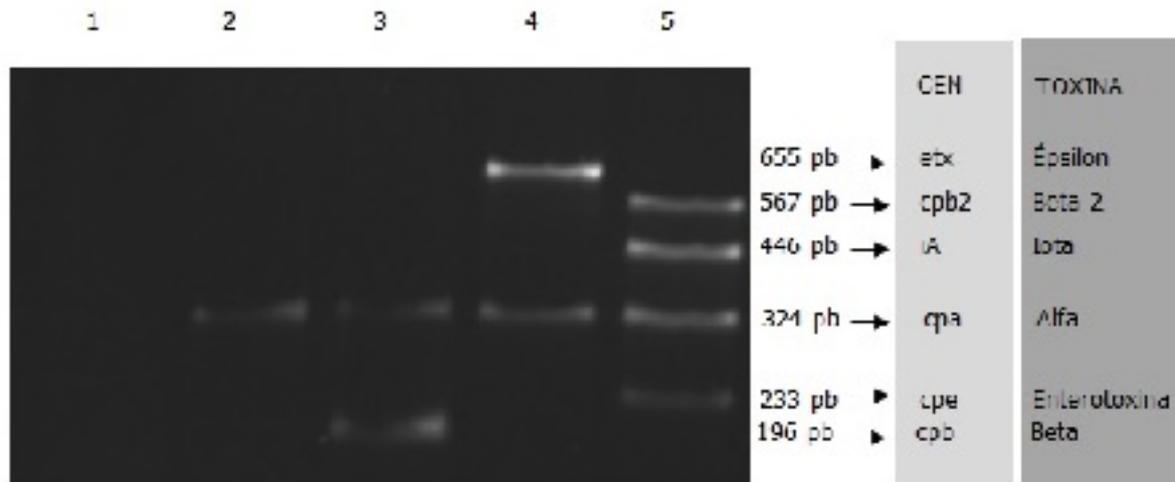


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de la PCR múltiple. Calles: 1, control negativo; 2, *C. perfringens* aislado de hígado del presente caso; 3, *C. perfringens* tipo C; 4, *C. perfringens* tipo D; 5, *C. perfringens* tipo E cpe+ cpb2 +, pb: pares de bases. **Discusión**

La muerte de equinos por cólico es uno de los diagnósticos más frecuentes en esta especie, sobre todo en animales estabulados y con fines deportivos.

Llamativamente, sólo un muy bajo porcentaje de los caballos que mueren por cólicos son necropsiados y muestreados para estudios microbiológicos e histopatológicos con la finalidad de arribar a un diagnóstico definitivo.

En el caso estudiado en este trabajo, durante la necropsia se observó que el órgano mayormente afectado era el intestino delgado, con una gran porción de la pared y el contenido intestinal hemorrágicos. En observaciones previas para otros animales con un cuadro clínico semejante, realizadas por este grupo de trabajo, se han visualizado gran cantidad de bacilos Gram positivos compatibles con *Clostridium* en raspajes de mucosa intestinal, pero en esta oportunidad los microorganismos eran escasos, probablemente porque el animal había sido previamente tratado con antibióticos y se le habían realizado sondajes nasoesofágicos.

Por otro lado, el hígado presentaba una coloración amarillenta y con aspecto de nuez moscada y de la muestra tomada se aisló una cepa de *C. perfringens*. De esta manera, se descartó a otro patógeno importante el *Clostridium difficile*, concordando con lo observado clínicamente ya que el animal no presentaba el cuadro de colitis aguda asociada a *C. difficile* en caballos adultos (Båverud, y col., 2003; Keel y Songer, 2006).

Actualmente, el uso de una PCR múltiple específica para los genes de las toxinas

de *C. perfringens*, permite la tipificación de este microorganismo a nivel genético. La PCR, positiva únicamente para el gen de la toxina α , indicó que el aislamiento se trataba de *C. perfringens* tipo A. La toxina α es una fosfolipasa C que hidroliza la lecitina, un componente de las membranas de las células, lo que conduce a la destrucción celular en el intestino del hombre y los animales (Sakuray y col., 2004). Por otro lado, la PCR permitió descartar al *C. perfringens* tipo C, otro patógeno que ocasionalmente produce enteritis hemorrágica en caballos adultos (Niilo, 1988; Drolet y col., 1990; Songer, 1996). Esto es importante porque las observaciones clínicas e histológicas podían también sugerir una enteritis necrótica aguda producida por *C. perfringens* tipo C, que es causada básicamente por la acción a nivel intestinal de la toxina α . En este trabajo no se realizó la detección de las toxinas α o β en el contenido intestinal del animal por carecer de los medios en ese momento, sin embargo se comprobó que la cepa aislada producía toxina alfa ya que in-vitro fue neutralizada por suero antitoxina alfa de *C. perfringens* Tipo A.

La toxina β y la enterotoxina, producidas por algunas cepas de todos los toxinotipos de *C. perfringens*, son capaces de producir lesiones hemorrágicas y necróticas como las descritas en este trabajo (Netherwood y col., 1998; Waters y col., 2005), sin embargo, no fueron detectadas en la cepa bacteriana aislada en este caso.

Por otro lado, en la Patagonia son frecuentes las muertes por "mal seco", una enfermedad de origen aún desconocido y que podría estar asociada a un sobrecrecimiento clostridial generalizado en un intestino disfuncional (Garret y col., 2002; Waggett y col., 2010; Pirie y col., 2014). En su forma aguda cursa con fuertes cólicos (Robles y col., 1993; Uzal y col., 1993) y produce lesiones degenerativas en neuronas del sistema nervioso central y periférico, principalmente en el ganglio celíaco-mesentérico anterior (Uzal y col., 1992). En este caso, se tomaron muestras de dicho ganglio, sin encontrarse las lesiones degenerativas típicas del "mal seco" por lo cual, se descartó que se tratara de un caso agudo de esta enfermedad.

Si bien la causa de muerte de este animal podría haber sido imputada a la ruptura del estómago por el cólico sufrido, las lesiones hemorrágicas en intestino delgado sumadas al aislamiento de *C. perfringens* tipo A, remiten a la clostridiosis intestinal equina descrita por Wierup (1977), Radostitis y col. (1994) y Dart y col., 1988 y a la enterotoxemia equina descrita por Sáez y col. (1992). En el primero de estos trabajos, Wierup (1977) realizó un estudio sobre 31 equinos y las lesiones más frecuentes y llamativas estuvieron restringidas al tracto digestivo, presentándose enteritis, desde catarral hasta hemorrágica y necrotizante. En ocho de los doce animales necropsiados en ese trabajo el intestino delgado estaba afectado, encontraron lesiones degenerativas en el parénquima de hígado y riñones y en

todos los casos se aisló *C. perfringens* tipo A. Por otro lado, Sáez y col. (1992) describen el caso de una enterotoxemia equina en una yegua de tiro de ocho años de edad que a la necropsia mostraba hemorragias generalizadas, hígado friable y de color pardo claro, e íleon con mucosa hemorrágica, aislando también *C. perfringens* tipo A.

Conclusiones

Debido a que las muertes de equinos con cuadros de cólicos no son mayormente investigadas, es probable que las enteritis hemorrágicas o enterotoxemias, como la descrita en este caso, pasen desapercibidas. Por ello es posible que, con mayor frecuencia de lo esperado, *C. perfringens* tipo A esté involucrado en este tipo de patologías por lo que se recomienda a los veterinarios de campo, estar alerta ante casos de cólicos severos en equinos y que se trate de llegar a un diagnóstico definitivo para clarificar los aspectos clínicos y etiológicos de esta enfermedad, enviando muestras tanto para intentar el aislamiento del agente actuante, como tejidos formolados para caracterizar histopatológicamente las lesiones presentes.

Agradecimientos: al Dr. Mariano Fernández Miyakawa, por proporcionar cepas de referencia de *Clostridium Perfringens* tipo C, D y E.

Bibliografía

- Båverud, V.; Gustafsson, A.; Franklin, A.; Aspán, A.; Gunnarsson, A. *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Vet J.* 2003; 35:465-71.
- Dart, A.J.; Pacoe, R.R.; Gibson, J.A.; HarRower, B.J. ? Enterotoxaemia in a foal due to *Clostridium perfringens* type A. *Aust vet Tour*, 1988, 65: 330-331.
- Drolet, R.; Higgins, R.; Cecyre, A. ? Necrohemorrhagic enterocolitis caused by *Clostridium perfringens* type C in a foal. *Can. Vet. Jour.*, 1990, 31 : 449-450.
- Garmory, H.S.; Chanter, N.; French, N.P.; Bueschel, D.; Songer, J.G.; Tittball, R.W. Occurrence of *Clostridium perfringens* ?2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol Infect.* 2000; 124:61-7.
- Garrett, L.A.; Brown, R.; Poxton, I.R. A comparative study of the intestinal microbiota of healthy horses and those suffering from equine grass sickness. *Vet Microbiol.* 2002; 87:81-8.
- Keel, M.K.; Songer, J.G. The comparative pathology of *Clostridium difficile* -associated disease. *Vet Pathol.* 2006; 43:225-40.
- Meer, R.; Songer, J.G.; Park, D.L. Human disease associated with *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Rev Environ Contam Toxicol.* 1997; 150:75-94.
- Netherwood, T.; Binns, M.; Townsend, H.; Wood, J.L.; Mumford, J.A.; Chanter, N. The *Clostridium perfringens* enterotoxin from equine isolates; its characterization, sequence and role in foal diarrhoea. *Epidemiol Infect.* 1998; 120:193-200.

Niilo, I. ? *Clostridium perfringens* Type C Enterotoxemia. Can Vet Jour. 1988, 29: 658-664.

Pirie, R.S.; Jago, R.C.; Hudson, N.P. Equine grass sickness. Equine Vet J. 2014; 46:545-53.

Radostitis, O.M.; Blood, D.C.; Gay, C.C. Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 8th Edition. Baillière Tindall. London, UK, 1994.

Robles, C.A.; Uzal, F.A.; Pueyo, J.M.; Pelliza-Sbriller, A. Aspectos clínicos, epidemiológicos y estudio de la dieta en equinos y mulares con Mal Seco. Revista de Medicina Veterinaria. 1993; 74:244-52.

Robles, C.A.; Uzal, F. A.; Olaechea, F. V. Guía práctica de muestreo de enfermedades en ovinos y caprinos. 1ra. edición. (1996) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Bariloche, Argentina.

Robles, C. A. Enfermedades Clostridiales del Ganado ? Ed. Robles, C., INTA Bariloche. 1ra edición (1998 a), Bariloche, Argentina. 19 pág. ISBN Nº 950-43-9347

Robles, C.A.; Uzal, F.A.; Olaechea, F.V.; Pueyo, J.M ? Hallazgos anatomopatológicos en equinos y mulares de la región Patagónica afectados de Mal Seco. Revista de Medicina Veterinaria. 1998 b; Vol 79 (3) :194-196.

Sáez, S.; Cifuentes, A.; Jara, O.; Rex, A. Enterotoxemia en equino atribuida a *Clostridium perfringens* tipo A. Avances en Ciencias Veterinarias. 1992; 7(1). doi: 10.5354/0716-260X.1992.4690.

Sakuray, j.; Nagahama, M.; Oda, M ? *Clostridium perfringens* Alpha toxin: Characterization and mode of action. J. Biochem., 2004, 135: 569-574.

Songer, J.G. ? Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin. Microbiol. Rev., 1996, 9:216-234.

Sterne, M. y Batty, I. ? Clostridios Patógenos. Ed. Butterworths, London, UK. (1978) 168 pág.

Uzal, F.A.; Robles, C.A.; Olaechea, F.V. Histopathological changes in the coeliaco-mesenteric ganglia of horses with "mal seco", a grass sickness-like syndrome, in Argentina. Vet Rec. 1992; 130:244-46.

Uzal, F.A. y Robles, C.A. Mal seco, a grass sickness-like syndrome of horses in Argentina. Vet Res Commun. 1993; 17:449-57.

Waggett, B.E.; McGorum, B.C.; Wernery, U.; Shaw, D.J.; Pirie, R.S. Prevalence of *Clostridium perfringens* in faeces and ileal contents from grass sickness affected horses: comparisons with 3 control populations. Equine Vet J. 2010; 42:94-499.

Waters, M.; Raju, D.; Garmony, H.; Popoff, M.; Sarker, M. Regulated expression of the beta2-toxin gene (cpb2) in *Clostridium perfringens* type A isolates from horses with gastrointestinal diseases. J Clin Microbiol. 2005; 43:4002-9.

Wierup, M. Equine intestinal clostridiosis. An acute disease in horses associated with high intestinal counts of *Clostridium perfringens* type A. Acta Vet Scand Suppl. 1977; 62:1-182.

