

## Aislamiento de 5 cepas de *Clostridium haemolyticum*: descripción de la metodología para aislamiento y t

Vet. Arg. ? Vol. XXXI ? N° 314 ? Junio 2014.

Saint Martin, M.; Ferreyra, A.; Brutti, C.; López, C.; López, S.; Bentancor, L.; Koval, A.

### Resumen.

Se describe la metodología utilizada para el aislamiento y tipificación de 5 cepas de *Clostridium haemolyticum* partir de muestras de hígado de bovinos muertos con signología clínica compatible con hemoglobinuria bacilar. Los aspectos a considerar desde la toma de muestras, remisión al laboratorio, procesamiento de las muestras y métodos bacteriológicos evaluados, son fundamentales para incrementar las posibilidades de lograr un aislamiento de este microorganismo anaerobio estricto. Finalmente se describen los métodos utilizados para la tipificación de las cepas aisladas.

### Summary.

We describe the methods for isolation and typing of 5 strains of *Clostridium haemolyticum* from liver samples of bovines dead with clinical signology compatible with bacillary hemoglobinuria. The aspects to consider from sampling, submission to the laboratory, processing of samples and bacteriological methods evaluated, are essential to increase the isolation possibilities of this strict anaerobic microorganism. Finally we describe the methods used for typing the isolated strains.

### Introducción.

Desde el primer aislamiento efectuado por Vawter y Records<sup>1</sup> en Nevada en 1926, la hemoglobinuria bacilar ha sido descrita en numerosas partes del mundo. Su agente etiológico, *Clostridium haemolyticum*, es un bacilo Gram positivo, anaerobio, esporulado, también denominado *Clostridium novyi* tipo D2-5.

Tradicionalmente en Argentina la enfermedad se observa en campos de la precordillera patagónica y en campos bajos de la Pcia. De Entre Ríos, en asociación con el área de distribución del parásito *Fasciola hepatica* y la presencia del huésped intermediario del ciclo de vida parasitario, un caracol del género *Lymnaea*.

Sin embargo, en los últimos años se han descripto numerosos casos en Provincia de Buenos Aires, particularmente en la cuenca del Salado, con mortalidades por goteo que han provocado pérdidas económicas importantes en numerosos

establecimientos<sup>3</sup>.

La sola presencia de este clostridio es condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la enfermedad. Muchos animales pueden ser portadores sanos de esporas en el hígado<sup>2</sup>. Para que la enfermedad se manifieste, se requiere que exista un daño a nivel hepático que genere una zona de anaerobiosis. Dicha área con baja tensión de oxígeno favorece la germinación de esporas, la multiplicación del microorganismo y la producción de toxina hemolítica.

El desencadenante más común de esta patología es el daño que provocan las larvas migrantes de *Fasciola* al atravesar el parénquima hepático<sup>2-4</sup>. También se describe como predisponente la compresión que produce un feto grande sobre el hígado de la madre, provocando isquemia, baja tensión de oxígeno y germinación de esporas con instalación de la infección<sup>3</sup>.

En los casos estudiados por nosotros en los últimos 3 años, nunca observamos presencia de *Fasciola* o lesiones que indiquen su presencia, y, en la mayoría de los casos, se trató de vacas con preñez avanzada.

Sin embargo, la presencia de *Fasciola* se ha confirmado en algunos establecimientos problema, mediante detección de huevos en análisis copro parasitológico.

También han muerto animales no gestantes y, si bien no podemos descartar la presencia de larvas migrantes de *Fasciola*, tampoco descartamos un mecanismo de lesión hepática por factores aún no dilucidados.

En aquellas áreas donde la enfermedad es común, los veterinarios y el personal de campo rápidamente llegan al diagnóstico sin requerir análisis de laboratorio, ya que la presencia de hemoglobinuria y de una o varias áreas necróticas características en el hígado (mal denominadas "infartos hepáticos") se consideran patognomónicos de hemoglobinuria bacilar<sup>4</sup>.

De todos modos, se requiere del aislamiento y tipificación del agente causal para llegar al diagnóstico confirmatorio, lo cual constituye un verdadero desafío para el microbiólogo.

El objetivo de esta publicación es contribuir a optimizar los métodos de cultivo, aislamiento y tipificación de este microorganismo anaerobio estricto.

## **Materiales y métodos.**

### Muestras.

Los 5 aislamientos se lograron a partir de hígados obtenidos de animales recientemente muertos, 3 remitidos refrigerados y 2 en glicerina al 50 % en agua destilada.

### Medios de cultivo.

Medio de cultivo líquido: se trabajó con medio tipo Tarozzi elaborado con carnaza e hígado bovinos, según fórmula (para 100 ml de medio):

Proteosapeptona	1 g
Extracto de levadura	0.5 g
Sulfato de magnesioheptahidratado	0.01 g
Caldo infusión de carne e hígado c.s.p.	100 ml
Caldo infusión	
Carnaza bovina	1 kg
Hígado bovino	1 kg
Agua c.s.p.	6.6 l

Cortar la carnaza y el hígado en cubos de aproximadamente 4 x 4 cm, colocarlos en un recipiente, incorporar el agua y calentar hasta ebullición. Hervir durante 30 minutos. Dejar enfriar, filtrar por algodón y gasa, fraccionar y congelar hasta su utilización. Cortar en trocitos menores la carnaza y el hígado (deben entrar en los tubos) y congelar hasta su utilización.

### Preparación del medio.

Introducir en los tubos 2-3 cm de trocitos de carnaza e hígado. Incorporar el medio líquido hasta aproximadamente 20 ml por tubo y esterilizar en autoclave durante 15 minutos (con tapas flojas).

Retirar del autoclave, ajustar las tapas de los tubos y guardar en jarra de anaerobiosis con atmósfera reducida a temperatura de laboratorio.

### Medios de cultivo sólidos:

Agar sangre ovina endurecido:	
Caldo cerebro corazón	40 g
L-cisteína	0.5 g
Agar	25 g
Agua c.s.p.	1.000 ml

Se disuelven las drogas y se esteriliza 15 minutos en autoclave.

Se retira el medio, se deja enfriar hasta aproximadamente 40 ? 50 °C y se le incorporan 70 ml de sangre ovina estéril.

Plaquear y usar inmediatamente o conservar en jarra de anaerobiosis con atmósfera reducida a temperatura de laboratorio no más de una semana.

Agar yema de huevo:

Proteosa peptona	20 g
Peptona de caseína	20 g
Fosfato disódico anhidro	5 g
Fosfato monopotásico	1 g
Cloruro de sodio	2 g
Glucosa	2 g
Solución de sulfato de magnesio al 5 % p/v	0.1 ml
Agar	20 g

Se disuelven las drogas y se esteriliza 15 minutos en autoclave.

Se retira el medio, se deja enfriar hasta aproximadamente 40 ? 50 °C y se le incorpora 10% de una solución de yema de huevo al 50 % en solución salina estéril.

Plaquear y usar inmediatamente o conservar en jarra de anaerobiosis con atmósfera reducida a temperatura de laboratorio no más de una semana.

### *Cepas de referencia.*

Se utilizaron cepas de *Clostridium novyi* tipos A, B y D como controles en la tipificación de los aislamientos efectuados. Las mismas fueron:

Tipo A: cepa Ames (National Veterinary Service Laboratories) de Estados Unidos.

Tipo B: cepa Wellcome (Inglaterra)

Tipo D: NVSL (National Veterinary Service Laboratories) de Estados Unidos y ATCC 9650 y 9652.

### *Antitoxinas de referencia.*

Antitoxina ? : Patrón Internacional de antitoxina de la OMS, provista por el NIBSC (National Institute of Biological Standards and Control) de Inglaterra.

Antitoxina ? : como no existe Patrón Internacional de esta antitoxina, la misma se elaboró en nuestro laboratorio a partir de la cepa de referencia de tipo DNVSL, en conejo.

### *Técnicas de siembra.*

Siembra directa en medios sólidos:

Para la siembra directa en medios sólidos se introdujo el ansa en el interior del parénquima hepático afectado y se estriaron placas de agar sangre y agar yema.

Siembra directa en medio líquido:

Para la siembra directa en medio líquido se extrajo asépticamente del interior del parénquima hepático un trozo pequeño y se sembró directamente en un tubo de medio Tarozzi.

Siembra de muestras colectadas en glicerina al 50 %

El tratamiento con glicerina se efectuó incluyendo pequeños trozos de hígado (2 x 2 cm aproximadamente) en un tubo plástico de boca ancha con 15 ? 20 ml de glicerina estéril al 50 % en agua destilada. Las muestras se incubaron a 37 ° C durante 7 a 15 días y se sembraron 0,1 a 0.5 ml del sobrenadante en tubos de medio Tarozzi.

Tanto las placas como los tubos se incubaron en jarras con sobres para generación de anaerobiosis (Anaerogen, Oxoid), a 37 °C durante 48 h.

### Tipificación

La tipificación de *C. Novyi* se realizó por seroneutralización de las toxinas mayores  $\alpha$  y  $\beta$ , según la siguiente tabla 4:

C. novyi tipo:	Toxina $\alpha$	Toxina $\beta$
A	+++	-
B	+++	+
D ( <i>C. haemolyticum</i> )	-	+++

Esta es la metodología clásica de referencia, que resulta aplicable cuando la cepa a tipificar produce cantidades de toxina suficientes para la realización de la seroneutralización.

Otras pruebas complementarias para tipificar los aislamientos fueron:

Presencia de hemólisis, lecitinasas, lipasa, reacción de indol e inoculación experimental en animales de laboratorio.

#### Obtención de toxina de cada cepa.

Se cultivaron las cepas aisladas en medio Tarozzicon posterior repique a medio TPGY durante 18 horas. Se tomaron muestras de sobrenadante de cada una, se centrifugaron y filtraron por 0.22  $\mu$ . Las muestras se conservaron a  $70^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de los ensayos de seroneutralización.

También se cultivó la cepa NVSL (tipo D), una cepa de *C. novyi* tipo A y una de tipo B para incluir como controles en el ensayo.

#### Titulación de toxinas.

Se titularon las muestras de cada toxina (NVSL y cepas aisladas) en diluciones 1:5, 1:10 y 1:20 para establecer las DL 50 %, utilizando como diluyente agua peptonada. La toxina  $\alpha$  del tipo A se tituló en diluciones 1:100, 1:200 y 1:400 dada su mayor letalidad.

#### Seroneutralización.

Por cada muestra de toxina se prepararon 3 tubos, con 1 mL de toxina cada uno.

Al primer tubo se le agregó 1 mL de antitoxina  $\alpha$ , al segundo 1 mL de antitoxina  $\beta$  y al tercero 1 mL de agua peptonada (control negativo).

Se incubaron los tubos 1 hora a temperatura de laboratorio.

Por cada tubo se inocularon 2 ratones con 0.5 ml de cada combinación por vía intravenosa, se observaron durante 3 días y se registraron las muertes.

#### *Estudios de patogenicidad en cobayos*

De cada cepa aislada se inocularon esporas conservadas en glicerina al 50 % a 70 °C. Se combinaron 0.5 mL de suspensión de esporos con 0.5 mL de solución al 10 % de cloruro de calcio y se inyectaron por vía intramuscular en la pata derecha de cobayos de 300-500 g.

Los animales fueron observados por 48 horas y se efectuó necropsia y siembra de músculo, incluyendo también muestras tratadas con glicerina, en los medios descriptos.

### **Resultados**

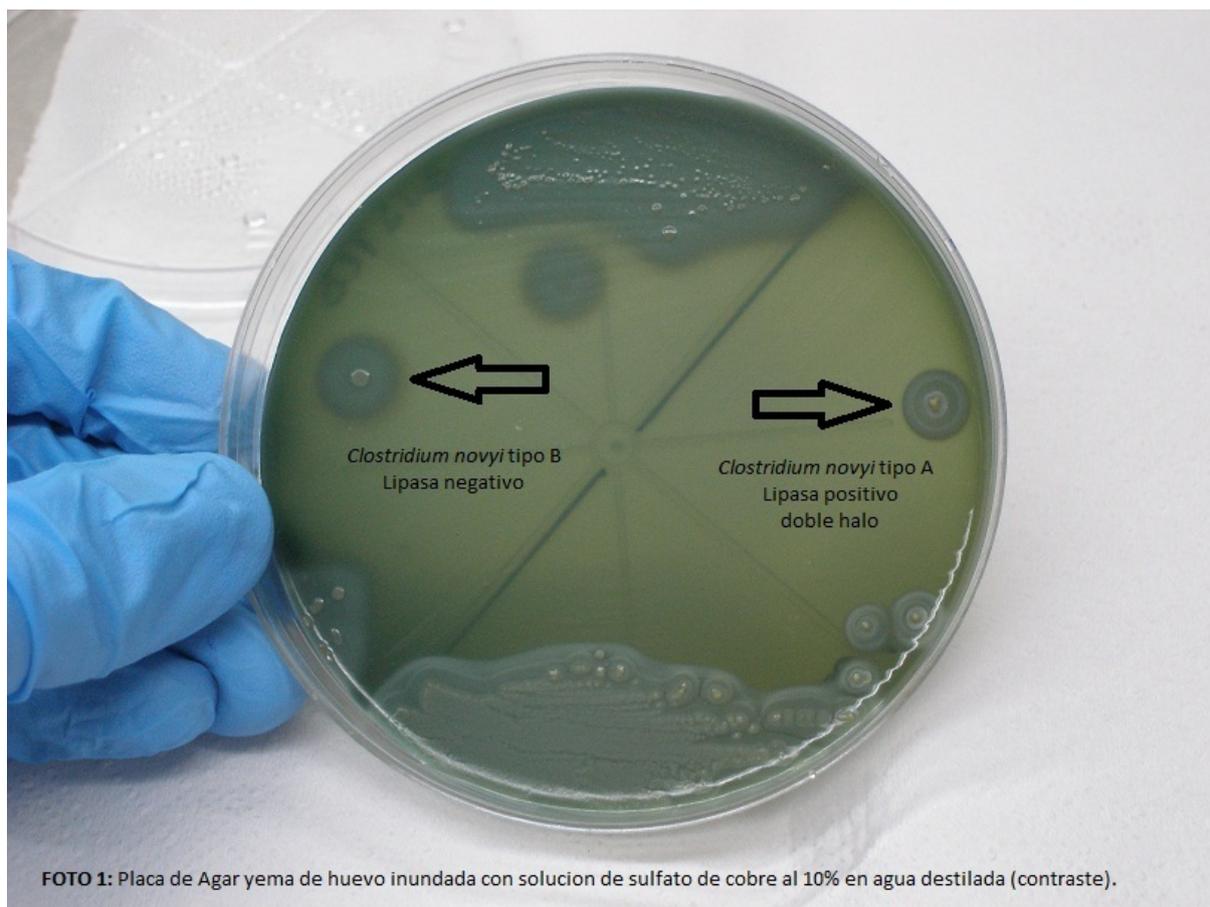
Técnicas de siembra

Siembra directa en medios sólidos

Pese a utilizar medios frescos, recientemente preparados y conservados en anaerobiosis, minimizando la exposición al aire, el *Clostridium haemolyticum* no desarrolló en primo aislamiento cuando se lo sembró directamente en placas de agar sangre o yema de huevo. Esto puede tomarse como criterio diagnóstico, si la observación microscópica nos muestra presencia de microorganismos compatibles en la impronta de hígado.

Siembra directa en medio Tarozzi con posterior aislamiento en placas

El éxito de esta metodología dependió mucho de la calidad de la muestra. Si la muestra se tomó muy próxima a la muerte del animal, en condiciones asépticas sin presencia de microorganismos contaminantes, la siembra directa en medio Tarozzi con posterior aislamiento en placas de agar sangre y agar yema de huevo se mostró efectiva.



Tratamiento de la muestra con glicerina al 50 %.

Esta técnica resultó la mejor opción debido a que la glicerina se puede utilizar como medio de transporte de la muestra recién obtenida y no requiere cadena de frío, por lo que se evitan todos los problemas relacionados a la logística de la remisión de la muestra al laboratorio.

En la mayoría de los casos se observó que en las lesiones hepáticas existen microorganismos en avanzado estado de esporulación. Así, la glicerina al 50 % elimina formas vegetativas del clostridio y microorganismos contaminantes, permitiendo recuperar esporos viables.

### Tipificación

De los 5 aislamientos obtenidos, solamente 2 se pudieron tipificar por seroneutralización en ratón.

De las 3 cepas de referencia, únicamente 2 (NVSL y ATCC 9652) se pudieron tipificar por esta metodología.

De acuerdo con lo observado por Lozano<sup>6</sup> sobre 151 cepas estudiadas, la mayoría de las cepas de *C. haemolyticum* pierden rápidamente la capacidad de producir toxina "in vitro".

Esta característica dificulta la tipificación con los métodos clásicos, lo que obligó a confirmar la identidad tanto de las cepas de referencia como los aislamientos no

toxigénicos con una técnica de PCR, que será motivo de otra publicación.

Todos los *C. novyi* son lecitinasa positivos. Solamente el tipo A es Lipasa positivo, y saber interpretar esta reacción permite rápidamente diferenciarlo de los tipos B y D. Esto es importante ya que puede aislarse tipo A como contaminante o invasor post mortem, sin tener implicancia en el cuadro clínico.

Resultó indispensable contar con cepas de *C. novyi* tipo A, B y D para verificar la reacción Lipasa positiva del tipo A, que se visualiza por un doble halo alrededor de la colonia en el agar yema de huevo. Los tipos B y D no presentan este doble halo (ver foto 1).

Todas las cepas de *C. haemolyticum* resultaron Lipasa negativas e Indol positivas. La reacción de Indol de nuestra cepa de *C. novyi* tipo A también resultó positiva, por lo que recomendamos precaución a la hora de interpretar esta reacción, ya que la mayoría de cepas de tipo A se describen como Indol negativas<sup>8</sup>.

#### *Obtención de toxina de cada cepa.*

La mayoría de las cepas aisladas producen muy poca cantidad de toxina "in vitro" y tienden a perder fácilmente esta propiedad en repiques sucesivos. Incluso algunas, en pocos pasajes no producen toxina e imposibilitan la tipificación clásica por seroneutralización.

#### *Titulación de toxinas.*

En comparación con otras toxinas clostridiales, la toxina Beta de *C. haemolyticum* no alcanza títulos muy elevados en los medios que evaluamos.

Una muy buena cepa alcanza las 100 DL 50% /ml, pero la mayoría no supera las 5 DL 50 %/ml.

Por el contrario, la toxina Alfa de los tipos A y B alcanza títulos que pueden superar las 10.000 DL 50 %/ml.

#### *Seroneutralización.*

Dada la baja letalidad de la toxina, resultó dificultosa la tipificación de las cepas aisladas, porque en los volúmenes que se pueden inocular en ratones no se alcanzan las dosis letales requeridas para este ensayo.

#### *Estudios de patogenicidad en cobayos.*

Si bien las cepas aisladas producen baja cantidad de toxina "in vitro", todas resultaron letales en cobayos a las 48 horas, inoculando esporas resuspendidas en cloruro de calcio al 5 % por vía intra muscular.

Cuando se inocula un tipo A o B productores de toxina Alfa la muerte se produce a las 24 horas.

Es importante distinguir la presencia de toxina Alfa en los animales inoculados experimentalmente, que se caracteriza por producir un extenso edema gelatinoso

que rezuma líquido.

La lesión por *C. haemolyticum* no presenta un edema tan extenso y es serosanguinolento.

### **Discusión.**

En regiones donde se presenta con frecuencia la hemoglobinuria bacilar el diagnóstico se suele realizar "a campo". Tanto el personal de los establecimientos como los profesionales veterinarios que trabajan en la zona conocen esta enfermedad. La observación de animales con hemoglobinuria que mueren al poco tiempo sumado a las lesiones hepáticas características son suficientes para que se confirme la causa de muerte y rara vez se recurre al laboratorio de diagnóstico.

Por otro lado, son pocos los laboratorios con capacidad técnica para el cultivo, aislamiento y tipificación de clostridios en general. Y este clostridio en particular, presenta las mayores dificultades para lograr un aislamiento exitoso debido a sus requerimientos de anaerobiosis estricta.

Así, en Argentina se han aislado en años muy pocas cepas y, al no existir un centro de referencia de anaerobios en veterinaria capaz de recibir, tipificar y preservar adecuadamente los aislamientos, las pocas cepas aisladas se han ido perdiendo.

No se puede comprender a fondo una enfermedad que evidentemente en los últimos años se ha modificado en cuanto a su distribución geográfica clásica y ha adquirido un nuevo protagonismo, si no se dispone de varios aislamientos y cepas para ser estudiadas.

Tampoco se pueden desafiar las vacunas, efectuar estudios de inmunidad cruzada o seleccionar cepas vacunales mejores, si no se conocen las cepas que están circulando al no aislarse y preservarse adecuadamente.

Este trabajo pretende transmitir nuestra experiencia para quienes quieran implementar el cultivo de clostridios en sus laboratorios y contribuir así a mejorar el conocimiento en el campo de las enfermedades clostridiales en general y de la hemoglobinuria bacilar en particular.

### **Conclusiones.**

La metodología descrita resume la experiencia de los autores en el aislamiento, cultivo y tipificación de 5 cepas de *Clostridium haemolyticum*. La toma de muestras de hígado de animales recientemente muertos, en condiciones asépticas y remitidas al laboratorio en glicerina al 50 % en agua destilada, resultó el método de elección para lograr un aislamiento de este microorganismo.

Las muestras conservadas en glicerina al 50 %, sembradas directamente en medio Tarozzi elaborado según la fórmula descrita en este trabajo, constituye el método por nosotros recomendado para el cultivo y aislamiento. No recomendamos intentar el primo aislamiento utilizando únicamente medios sólidos.

Una vez desarrollados en medio Tarozzi, los cultivos se sembraron en placas de agar sangre y agar yema de huevo, obteniendo colonias aisladas, la mayoría de las veces en pureza.

Destacamos la importancia de utilizar los medios de cultivo recientemente preparados o conservados pocos días en atmósfera reducida.

La tipificación de este microorganismo por la metodología clásica resultó muy dificultosa, debido a la escasa producción de toxina "in vitro" de las cepas aisladas. Las cepas obtenidas esporularon a las 48 horas en medio Tarozzi. La inoculación de esporos activados con cloruro de calcio al 5 % por vía intramuscular en cobayo, resultó letal luego de 48 horas, lo cual demuestra que estas cepas son capaces de producir cantidades letales de toxina "in vivo".

Sin embargo, un anaerobio obtenido de una lesión característica de hemoglobinuria en hígado, que no desarrolla en primo aislamiento en medios sólidos, es lecitinasa fuertemente positivo, no produce lipasa y es indol positivo debe resultar altamente sospechoso.

La tipificación clásica de los diferentes tipos de *C. novyi* se basa en la identificación de las toxinas Alfa y Beta por seroneutralización. Cuando las cepas aisladas no producen las cantidades necesarias de toxina para realizar este ensayo, se deberá recurrir a técnicas alternativas inmunológicas o moleculares para arribar a un diagnóstico definitivo.

### **Bibliografía.**

- 1- RECORDS, E. and VAWTER, L.R., J. Am. Vet. Med. Ass. 68, 1-19 (1926).  
Recent studies on ictero-hemoglobinuria of cattle.
- 2- BLOOD, D.C., HENDERSON, J.A., RADOSTITS, O.M. Medicina Veterinaria, 6ª edición, 600-602 (1988).
- 3-GUGLIELMONE, V. PREISEGGER, G. Y RIVERO, M. Tesina de la Orientación Producción Bovinos de Carne, UNCPBA (2010). Hemoglobinuria Bacilar Bovina en el área de influencia del INTA Balcarce, Provincia de Buenos Aires.
- 4- STERNE, M., BATTY, I. Clostridios Patógenos (1978).

5- DARAKHSHAN, H., LAUERMAN, L.H. Comp. Immun. Microbiol. Infect Dis. Vol. 4, 307-316 (1981). Some properties of beta toxin produced by *Clostridium haemolyticum* strain IRP-135.

6- LOZANO, E.A. Can. J. Comp. Med. Vol. 41, 188-194 (1977). Inactivation of *Clostridium haemolyticum* toxic fluids and their antigenicity.

7- HAUER, P., YEARY, T.J., ROSEMBUSCH, R.F. Vaccine 24, 124-132 (2006). Evidence of the protective immunogenicity of native and recombinant *Clostridium haemolyticum* phospholipase C (beta toxin) in guinea pigs.

8- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Springer Ed. Second Edition. Volume Two.

---