

DETECCIÓN DE LA ENTEROTOXINA DEL *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TIPO A, EN MUESTRAS DE HECES DE LECHONES LACTANTES CON DIARREA PROVENIENTES DE GRANJAS PORCINAS DEL ESTADO ARAGUA

Detection of *Clostridium perfringens* Enterotoxine Type A in Samples of Nursing Suckling Pigs with diarrhea from Porcine Farms of Aragua State

María A. Trujillo^{*1}, Luis Mariño^{**} y Vitelio Utrera^{**}

^{*}*Agropecuaria El Progreso, Zuata-San Mateo, estado Aragua, Venezuela.* ^{**}*Cátedra de Medicina Poblacional, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay 2101, estado Aragua, Venezuela*

Correo-E:marutre@hotmail.com

Recibido: 26/03/08 - Aprobado: 21/05/08

RESUMEN

En lechones lactantes, las diarreas de origen bacteriano son las más comunes. Una de ellas es la causada por *C. perfringens* tipo A, que a pesar de ser parte de la flora intestinal normal, se ha reportado como agente causante de enteritis a partir de la primera semana de vida. El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de la enterotoxina de *C. perfringens* tipo A en lechones lactantes con diarrea, en edades comprendidas entre 1 y 15 días. La investigación se llevó a cabo en 20 granjas porcinas ubicadas en los municipios José Félix Ribas y Revenga del estado Aragua, que poseen una alta densidad de granjas porcinas. Los lechones fueron seleccionados mediante un muestreo al azar simple. Se obtuvo un total de 20 muestras, correspondientes a 20 granjas, las cuales fueron procesadas para la detección de la enterotoxina de *C. perfringens* tipo A, aplicando la prueba serológica de Aglutinación Pasiva Reversa en Látex (RPLA), resultando 6 granjas positivas (30%), lo que confirma la presencia de la enterotoxina de *C. perfringens* tipo A, asociado a diarreas en lechones lactantes entre 1 y 15 días de edad en granjas porcinas del estado Aragua.

ABSTRACT

Diarrheas of bacterial origin are the most common diarrheas in suckling pigs, especially those caused by *C. perfringens* Type A, which is a natural inhabitant of their normal intestinal flora. The *C. perfringens* Type A has been reported as a causative agent of enteritis from the first week of life. The purpose of this study was to detect the presence of *C. perfringens* enterotoxin Type A in suckling pigs with diarrhea from 1 to 15 days of age. The study was carried out in 20 porcine farms, located at José Félix Ribas and Revenga municipalities of Aragua State, Venezuela, which have a high density of porcine farms. Suckling pigs were selected by means of a random sampling. A total of 20 stool samples from 20 farms was obtained. The detection of *C. perfringens* enterotoxin Type A was made using the reverse passive latex agglutination test (RPLA). Results of the present study show that 6 farms (30 %) were detected positive, which confirms the presence of *C. perfringens* enterotoxin Type A, in association with diarrheas in suckling pigs between 1 to 15 days of age in porcine farms of Aragua State.

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

(Palabras clave: Lechón, *Clostridium perfringens*, lactación, diarrea, enterotoxinas, Aragua)

(Key words: Piglets, *Clostridium perfringens*, lactation, diarrhea, faeces, enterotoxins, Aragua)

INTRODUCCIÓN

Las diarreas de origen bacteriano son las más comunes que afectan a los lechones durante la primera semana de vida. Entre éstas se encuentra la producida por el *C. perfringens*, la cual puede ser de dos tipos: *C. perfringens* tipo C y *C. perfringens* tipo A, éste último objeto de este estudio.

El *C. perfringens* tipo A forma parte de la flora intestinal normal de los cerdos, no obstante, existen evidencias de que está involucrado en la enfermedad entérica tanto en lechones lactantes como en destetados. Esta enteritis se caracteriza por diarrea moderada, de consistencia y color variable, de baja mortalidad, y con una morbilidad que puede alcanzar valores elevados, generando pérdidas de gran impacto económico (Taylor, 1999; Songer y Taylor, 2006).

El papel del *C. perfringens* tipo A en la diarrea de lechones lactantes ha sido reconocida a nivel mundial (Kohler, 1997; Taylor, 1999). La vía principal de entrada al organismo de todas las enterotoxemias clostridiales es por ingestión (Madsen, 1995; Gresham, 1997). Las cerdas al ser portadoras intestinales del *C. perfringens* tipo A, constituyen la principal fuente de infección para sus lechones a temprana edad, a través de las heces o la piel contaminada (Estrada y Taylor, 1989; Taylor, 1999). El *C. perfringens* tipo A, está asociado con diarreas en otras especies animales (potros, corderos, perros, terneros y gatos), siendo éste el toxovar predominante (Miwa *et al.*, 1997; Sipos y Schmoll, 2005). El *C. perfringens* tipo A se ha aislado hasta en un 90 % de las muestras provenientes de lechones con historia de enteritis; por otra parte, se ha observado una disminución en la frecuencia de *C. perfringens* tipo C (Sipos y Schmoll, 2005).

La enteritis es inducida por la acción de la enterotoxina del *C. perfringens* tipo A, a nivel intestinal (Popoff y Jestin, 1985; Estrada y Taylor, 1989; Taylor, 1999). La habilidad del *C. perfringens* tipo A para producir enterotoxinas está relacionada directamente con su habilidad para esporular. Cepas no esporulantes no producen enterotoxinas (Estrada y Taylor, 1989, Sipos y

Schmoll, 2005). La enterotoxina producida por el toxovar A durante la esporulación, es considerada la principal toxina involucrada en las intoxicaciones producidas por alimentos en humanos (Sipos y Schmoll, 2005; Songer y Taylor, 2006). Las cepas causantes de la enfermedad, pueden estar presentes en el tracto intestinal antes de que las condiciones predisponentes induzcan a producir la enfermedad, siendo la interacción huésped-toxina-micro-organismo, lo que determina el inicio y desarrollo de la enterotoxemia (Niilo, 1993).

Uno de los métodos utilizados para detectar la presencia de la enterotoxina de *C. perfringens* tipo A en muestras de heces provenientes de animales afectados con diarrea, es la Aglutinación Pasiva Inversa en Látex (RPLA, por sus siglas en inglés) (Sihvo, E. 1991). El presente trabajo reporta la presencia de la enterotoxina de *C. perfringens* tipo A, detectada mediante la prueba serológica de RPLA, en granjas porcinas del estado Aragua, confirmando que este microorganismo está asociado a los cuadros de diarreas en lechones lactantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y Población

Se seleccionaron 20 granjas ubicadas en los municipios José Félix Ribas y Revenga, del estado Aragua, los cuales poseen el mayor número de granjas porcinas del estado (SASA, 2005). Estas granjas se caracterizan por tener sistemas de producción de flujo continuo, con una población ≥ 400 madres y con mayor frecuencia de diarrea en lechones lactantes, en edades comprendidas entre 1 y 15 días.

Recolección de muestras

Los lechones fueron seleccionados mediante un muestreo simple al azar. Una vez seleccionado el animal con diarrea, se procedió a sujetarlo, se limpió la región perineal del mismo y se presionó ligeramente el abdomen, con la finalidad de favorecer la expulsión de las heces, colectando posteriormente las mismas en un envase estéril previamente identificado. De cada granja visitada, se tomó una mezcla de 5 muestras de heces obtenidas de 5 lechones con diarreas,

asegurando la recolección de por lo menos 1 mL de heces por animal, para un total 5 mL de heces, y ser procesadas como una muestra independiente. Se obtuvo un total de 20 muestras, correspondiente a 20 granjas. Las muestras se colocaron en una cava con refrigerante para ser transportadas al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, donde fueron procesadas para la detección de la enterotoxina de *C. perfringens* tipo A, aplicando la prueba de RPLA.

Detección de la enterotoxina del *Clostridium perfringens* mediante la prueba de Aglutinación Pasiva Reversa en Látex (RPLA)

El procesamiento de las muestras se realizó según la metodología descrita por Oxioid (2003), la cual se detalla a continuación:

Procesamiento de las muestras de heces

Cada muestra de heces se diluyó con Solución Buffer Fosfato (PBS) a pH 7,2, en una relación 1:1. La mezcla fue suficientemente homogeneizada y posteriormente centrifugada durante 20 min a 1300 g en una centrífuga refrigerada (marca Damon/IEC) a 4°C. Una vez centrifugada, el sobrenadante se colocó en una inyectadora desechable, para ser filtrado, utilizando filtros tipo Millipore®, con un diámetro de poro de 0,45 µm. El filtrado obtenido se colocó en tubos Eppendorf con capacidad para 1,5 mL, los cuales se refrigeraron a 4°C hasta el momento de ser utilizados para la detección de la enterotoxina a través de la prueba de RPLA.

Aplicación de la prueba de RPLA

Se utilizó un estuche comercial de RPLA (Laboratorio Oxioid), el cual tiene capacidad para procesar 20 muestras. El estuche se almacenó a una temperatura entre 2 a 8°C, hasta que todas las muestras fueron colectadas. El estuche comercial de RPLA, consta de lo siguiente: partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos específicos contra la enterotoxina del *C. perfringens* tipo A; partículas de látex control, sensibilizado con globulinas de conejos no inmunes; diluyente (Solución buffer fosfato); enterotoxina control.

Se procedió a agitar bien los tubos contentivos de las partículas de látex. Posteriormente se reconstituyó la enterotoxina control añadiendo 0,5 mL de diluyente

agitándolo bien hasta que todo el contenido estuviera bien disuelto. Se utilizaron placas de 96 pozos fondo en V, las cuales se colocaron de tal manera que cada fila constara de 8 pozos. Para cada muestra se utilizaron 2 filas iguales (una donde se colocó el látex sensibilizado y otra el látex no sensibilizado). Con la micropipeta se procedió a dispensar 25 µL de diluyente (solución buffer fosfato) en cada pozo de las dos filas, excepto para el primer pozo en cada fila. Se añadió 25 µL de la muestra problema al 1er y 2do pozo de cada fila. Con la micropipeta e iniciando en el 2do pozo de cada fila, se tomaron 25 µL y se efectuaron dobles diluciones a lo largo de cada una de las 2 filas, hasta llegar al 7^{mo} pozo. En el 8^{vo} pozo solo quedó con diluyente. Se añadió 25 µL de látex sensibilizado para cada pozo de la 1^{ra} fila y luego se procedió a añadir 25 µL de látex control para cada pozo de la 2^{da} fila. Luego se procedió a mezclar agitando manualmente con sumo cuidado, para evitar que el contenido en la placa se derramara. Con el objeto de evitar la evaporación, cada placa se cubrió con papel plástico transparente adherente y luego se colocaron las placas dentro de una cámara húmeda. Dicha cámara se ubicó sobre una superficie lisa y lejos de cualquier vibración o movimiento, a temperatura ambiente por 24 h. Transcurridas las 24 h se procedió a la lectura de la prueba. Se examinó cada placa contra un fondo negro.

Las partículas de látex están sensibilizadas con anticuerpos específicos purificados (Inmunoglobulina G) de conejos inmunizados contra la enterotoxina de *C. perfringens*, aglutinándose en presencia de dicha enterotoxina. Igualmente, un control está presente y consiste en partículas de látex sensibilizadas con globulinas de conejos no inmunes.

Si la enterotoxina del *C. perfringens* tipo A está presente, ocurre la aglutinación debido a la formación de estructuras similares a una malla, producto de la reacción antígeno-anticuerpo. Si la enterotoxina no está presente, o está a un nivel inferior al detectado por esta prueba, dichas estructuras estarán ausentes.

La lectura e interpretación de los resultados se consideró de acuerdo al patrón de aglutinación que se muestra en la Figura 1.

Si la muestra (filtrado) reacciona con el látex sensibilizado a una dilución mayor de aquella observada con el látex control (látex no sensibilizado) el resultado se considera positivo (+). El último pozo de cada fila

en la placa (8^{vo} pozo) sólo contiene diluyente y éste debe dar un patrón negativo; si se observa un patrón positivo, el ensayo se debe considerar inválido.

La sensibilidad de esta prueba en la detección de la enterotoxina es de aproximadamente 2 ng/g, la enterotoxina presente en concentraciones menores que éstas, dará resultados negativos (Oxoid, 2003).

RESULTADOS

De las 20 granjas evaluadas, resultaron positivas a la prueba de RPLA, las granjas 2, 3, 4, 11, 15 y 17, lo que representa un 30%. El resto de las granjas resultaron negativas a la prueba de RPLA, correspondiendo al 70% del total de las granjas evaluadas.

En la Tabla 1, se detallan los resultados obtenidos en cada una de las muestras tanto en látex sensibilizado (LS) como en el látex no sensibilizado (LNS). Las muestras que reaccionaron con el LS a una dilución mayor que aquella observada con el látex control (LNS) fueron consideradas como positivas, tal como lo indica la casa comercial (Oxoid, 2003).

La Figura 2, muestra claramente la aglutinación formada en el caso de los resultados positivos del control, de la cepa de referencia y la cepa problema, así como también la ausencia de aglutinación en caso de los resultados negativos.

DISCUSIÓN

La detección de la enterotoxina de *C. perfringens* a través de la prueba de RPLA ha sido sugerida por otros investigadores y considerada útil en la detección de dicha enterotoxina, para realizar evaluaciones preliminares al respecto (Mpamugo et al., 1995).

A pesar de que el 70% (14 de 20 granjas) de las muestras procesadas para la detección de la enterotoxina de *C. perfringens* tipo A, resultó negativo

al RPLA, no significa que la enterotoxina no esté presente, ya que la sensibilidad de dicha prueba es de 2 a 4 ng/g (Berry et al., 1988; Oxoid, 2003); concentraciones menores a éstas, darían resultados negativos a la prueba de RPLA.

Por otra parte, Estrada y Taylor (1989), reportan que no todas las cepas esporulantes de *C. perfringens* tipo A producen niveles detectables de enterotoxina y cepas no esporulantes no producen enterotoxina. La habilidad para esporular es un requisito indispensable para la producción de enterotoxina (Rood y Cole, 1991; Quinn et al., 1994; Gresham, 1997; Taylor, 1999).

Es importante señalar la subjetividad de la prueba de RPLA (Berry et al., 1988), además de considerar que las pruebas realizadas hasta ahora, para la detección de la enterotoxina del *C. perfringens* tipo A, son propensas a dar resultados falsos positivos; sin embargo, los títulos de enterotoxina detectados en heces están asociados a las diarreas de lechones afectados (Songer y Taylor, 2006).

Estrada y Taylor (1989), reportaron que la diarrea en lechones lactantes durante la primera semana de vida era causada por la acción de la enterotoxina, coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio. Por otra parte, Taylor (1999) reporta la presencia de diarrea por acción de la enterotoxina a partir de las 48 horas después de nacidos; sin embargo, en este estudio, se observó la presencia de la enterotoxina en lechones de 1 día de edad.

CONCLUSIONES

El *C. perfringens* tipo A debe ser considerado como un agente importante involucrado en las diarreas de lechones lactantes en Venezuela.

La detección de la enterotoxina del *C. perfringens*

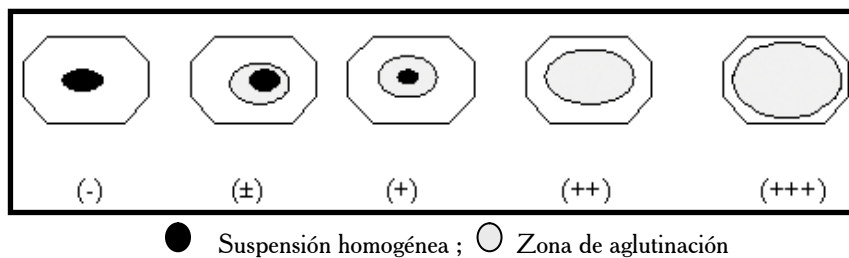


Figura 1. Patrón de aglutinación. Los resultados clasificados como +, ++ y +++ son considerados como positivos

Tabla 1. Detección de la enterotoxina de *C. perfringens* tipo A, mediante la prueba de RPLA, en heces de lechones lactantes con diarrea, provenientes de las 20 granjas evaluadas

Granja		SD*	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	D*	Resultado
1	LS*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LNS*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	LS	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	LNS	+	+	+	+	+	-	-	-	-
3	LS	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	LNS	+	+	+	+	+	+	-	-	-
4	LS	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	LNS	+	+	+	+	-	-	-	-	-
5	LN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	LS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	LS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	LS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	LS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	LS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	LS	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	LNS	+	+	+	+	-	-	-	-	-
12	LN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	LS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	LS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	LS	-	-	-	+	+	+	-	-	+
	LNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	LS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	LS	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	LNS	+	+	+	+	+	-	-	-	-
18	LS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	LS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	LS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LNS	-	-	-	-	-	-	-	-	-

SD*: Sin diluyente (Dilución 1/1). LS*: Látex sensibilizado. LNS*: Látex no sensibilizado. D*: Diluyente

tipo A, en muestras de heces provenientes de lechones lactantes con diarrea, mediante la prueba serológica de Aglutinación Pasiva Reversa en Látex (RPLA), podría ser una herramienta útil en el diagnóstico de la enfermedad.

Esta investigación orienta a los veterinarios

clínicos de campo en Venezuela, a incluir al agente causal estudiado, dentro del diagnóstico diferencial de las diarreas producidas en lechones en las primeras semanas de vida, las cuales inciden significativamente en la productividad porcina.

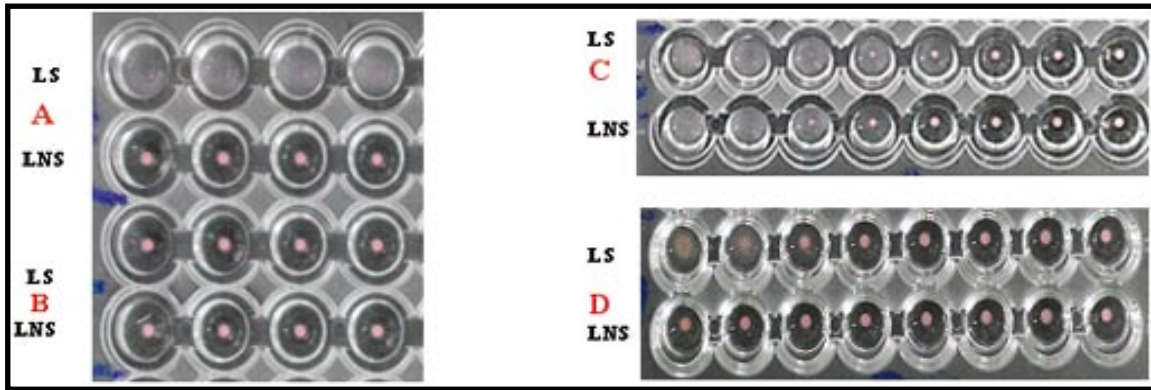


Figura 2. Resultados de la RPLA observados en la placa. A: Control Positivo. B: Control Negativo. C: Cepa de referencia, obsérvese aglutinación hasta la dilución 1/32 en el LS, dos diluciones por encima del LNS. D: Cepa problema. LS: Látex Sensibilizado. LNS: Látex No Sensibilizado

REFERENCIAS

- Berry, P.; Crodhouse, J.; Hughes, S.; Bartholomew, B. 1988. Evaluation of ELISA, RPLA, and Vero cell assays for detecting *Clostridium perfringens* enterotoxin in fecal specimens. *J. Clin. Pathol.*, 41:458-461.
- Estrada, A.E.; Taylor, D.J. 1989. Porcine *Clostridium perfringens* type A spores, enterotoxin and antibody to enterotoxin. *Vet. Rec.*, 124:606-610.
- Gresham, A. 1997. Enteritis and enterotoxaemia associated with *Clostridium perfringens* infection in young pigs. *Pig J. Proceed. Sect.*, 40:99-108.
- Kohler, B. 1997. Diagnosis and epidemiology of necrotizing enteritis in pigs from Northern Germany. *Praktische Tierarzt*, 78:1078-1094.
- Madsen, D. 1995. Managing management induced *Clostridium perfringens* type A infection in suckling pigs: A Case study. *Swine Health Prod.*, 3:207-208.
- Miwa, N.; Nishina, T.; Kubo S.; Atsumi, M. 1997. Most probable method combined with nested polymerase chain reaction for detection and enumeration of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of cattle, pig and chicken. *J. Vet. Med. Sci.*, 59:89-92.
- Mpamugo, O.; Donovan, T.; Brett, M. 1995. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* as a cause of sporadic cases of diarrhea. *J. Med. Microbiol.*, 43:442-445.
- Niilo, L. 1993. Enterotoxemic *Clostridium perfringens*. En: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. (2nd ed.). Press Ames. Iowa. pp. 114-122.
- Oxoid. 2003. Pet-RPLA toxin detection kit. [en línea]. Dirección URL: http://www.oxoid/product_detail.html [Consulta: 09/07/2003].
- Popoff, M.R.; Jestin, A. 1985. Enteropathogenicity of purified *Clostridium perfringens* enterotoxin in the pig. *Am. J. Vet. Res.*, 46:2147-2148.
- Quinn, P.J.; Carter, M.E.; Markey, B.K.; Carter, G.R. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. M. Wolfe. (1st ed.), pp. 191-308.
- Rood, J.; Cole, S. 1991. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev.*, 55:621-648.
- SASA. 2005. Comunicación personal.
- Sihvo, E. 1991. PET-RPLA, a new test for detection of *Clostridium perfringens* enterotoxina A. *Soumen Elainlaakarilehti*, 97:128-133.
- Sipos, W.; Schmoll, F. 2005. Clostridial infection in pigs. *Pig Progress*, 18-19.
- Songer, G.; Taylor, D. 2006. Clostridial Infections. En: *Diseases of Swine*. (9th ed.). Press Ames. Iowa. pp. 613-620.
- Taylor, D. 1999. Clostridial Infections. En: *Diseases of Swine*. (8th ed.). Press Ames. Iowa. pp. 395-401.