

AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y VARIACIONES EN LA MORBILIDAD DEL AGENTE CAUSAL DE LAS ENTERO TOXEMIAS DEL CONEJO.

J. López i Ros

Laboratorios Taberner, S.A. - Barcelona

La identificación del grupo de gérmenes anaerobios esporulados descansa sobre tres pilares fundamentales que son: 1. La posición de la spora, 2. Las propiedades bioquímicas, y 3. La toxinogénesis y toxinotipia. Pero es necesario remarcar algunas características propias del grupo que aquí nos interesa, es decir, *Welchia* o *Clostridium perfringens*.

En primer lugar, la experiencia nos ha enseñado que estos gérmenes no son estrictamente anaerobios y pueden crecer en presencia de, eso sí, muy escasas concentraciones de oxígeno. En segundo lugar, su crecimiento es notable en 12-18 horas a temperaturas de 37°C, cosa poco frecuente cuando se trata de otros anaerobios como son los de las llamadas gangrenas gaseosas; dando lugar, en los caldos con indicador de Andrade, a la aparición de una coloración rosada que luego, por acidificación, desaparece para dar paso a una coloración francamente amarillenta; y en los medios sólidos a colonias de 2-4 mm. de diámetro, convexas, translúcidas, lisas y con un borde entero. Las colonias con borde estriado son muy poco frecuentes en los primeros aislamientos. En los medios líquidos ya pueden comprobarse formas vegetativas de bacilo más o menos largos, Gram-Positivos, a las 3 horas de efectuada la siembra. En tercer lugar, es muy difícil encontrar formas esporuladas, pese a la utilización de caldos apropiados carentes de glucosa. Para comprobar la esporulación y el tipo de spora, cosa por otra parte de sumo interés, es menester calentar durante 10 minutos a 80°C un c/c de un cultivo de 24-48 horas. Entonces, en las formas bacilares que restan se podrá comprobar la presencia de una spora central o subterminal, nunca terminal. Y, finalmente, hacer mención de una de las características de especie: La inmovilidad, propia únicamente

de este Clostridio.

Con estas características señaladas y la observación de cultivos muy gasógenos se puede llegar a una presunción de es especie; especie que, por otra parte, es muy sacarolítica, muy proteolítica y escasamente putrefactora. Todos los biotipos son fermentadores de la lactosa, glucosa y sacarosa. Producen gelatinasa muy activa, son indol-negativos y sulfhídrico-positivos. Los grandes metabolitos producidos son los ácidos acético y bu tírico.

Medios sencillos y muy útiles para el aislamiento son el me dio de Rosenow cisteinado y parafinado y la placa de agar V.L. al que se ha añadido un 0,5 por 100 de yema de huevo e incuba da en atmósfera de nitrógeno.

La identificación propiamente dicha descansa sobre:

- A. Estudio de las propiedades bioquímicas señaladas.
- B. Seroneutralización "in vitro", y
- C. Toxinogénesis y toxínotipia.

Solamente consideramos aquí el último de los apartados por considerarlo realmente de sumo interés epidemiológico y profiláctico con vistas al esclarecimiento de la patogenia y al enfoque de las medidas de lucha contra la enfermedad.

Si bien hemos enunciado una seroneutralización "in vitro", basada en la utilización de un antisuero somático de *W. perfringens*, que serviría como inhibidor del crecimiento de la especie cuando se siembra en placa de agar V.L. adicionada con di cho anticuerpo, todas las pruebas serológicas destinadas a la comprobación de la estructura antigénica de estos microorganismos están carentes de validez. *W. perfringens* posee dicha estructura pero con una muy notable heterogeneidad.

Lo verdaderamente importante es la clasificación actual en cinco biotipos conocidos por las letras A-E, de la que hacemos exclusión del biotipo F, de Zeissler y Rassfeld-Sternberg, por considerarse imprudente clasificarlo como realmente per teneiente a un nuevo serotipo. Y estas clasificaciones tienen co mo base la estructura de las exotoxinas elaboradas por estos gérmenes, tanto en el tubo digestivo de los animales afectados como en los cultivos convenientemente tratados.

En la práctica de laboratorio se han comprobado de gran utilidad diagnóstica una serie de conceptos que en muchas ocasiones se pasan por alto. En primer lugar, para la comprobación de toxinas, es menester que el material de necropsia sea lo más fresco posible y siempre en un tiempo inferior a las doce horas de la muerte. Es errónea la idea de que un asa intestinal convenientemente ligada y transportada en glicerina conserva las propiedades objeto de búsqueda.

La mejor forma de conservar estos productos objeto de un análisis para determinación de Enterotoxinas a *W. perfringens* es la de recoger los líquidos intestinales de animales recién muertos en frasco aparte al que se añade una gota de éter ocloroformo por cada 10 c/c.

Y estamos hablando de las toxinas porque el aislamiento del germen a partir de intestino no indica en absoluto la presencia de Enterotoxemia.

Otro de los puntos a recomendar es el tratamiento a adición, en uno de los tubos de cultivo, de una solución de tripsina que transforme la protoxina elaborada en toxina verdadera y letal (es el caso de las toxinas épsilon e iota que precisan de una activación química).

Veamos, a continuación, algunos puntos relacionados con estas toxinas que caracterizan a cada uno de los biotipos serológicos.

La toxina alfa es producida por todos los serotipos conocidos, aunque de manera muy principal por el serotipo A. Suprincipal efecto es letal sobre cobaya, ratón y el mismo conejo. La muerte aparece a las 4 - 6 horas de postinoculación. Esta toxina es también la responsable de la aparición de necrosis (por inyección i. m.), de una actividad hemolítica y de una acción sobre la lecitina (opalescencia del suero humano o emulsiones débiles de yema de huevo). Hoy en día ya nadie pone en duda la identidad de la lecitinasa C con la propia toxina alfa.

Otro de los llamados antígenos mayores de *W. perfringens* es el constituido por la toxina beta, presente en los biotipos B y C.

Es necrotizante, letal pero no hemolítica. Es termolabil, a diferencia de la toxina alfa, cosa a tener en cuenta en la preparación de anatoxinas, y con aparición en la máxima proporción dentro de las primeras 24 horas de cultivo; después va desapareciendo como consecuencia de la aparición de otros metabolitos proteolíticos.

La toxina épsilon es producida solamente que por los serotipos B y D. Es ésta una toxina que se absorbe por el tracto intestinal y su formación es, inicialmente, en forma de protoxina que, por acción enzimática proteolítica, pasa a toxina. La adición de tripsina al 5 por 100 es suficiente para llevar a cabo la mencionada transformación de activación de la protoxina. Y este efecto se comprueba ya sea en las muestras de contenido intestinal como en los medios de producción de anatoxinas en los laboratorios.

La toxina iota es propia del serotipo E, y es, en cuanto a propiedades químicas, muy parecida a la toxina épsilon.

Así, en esquema, tenemos que los biotipos A-E ofrecen las siguientes estructuras en relación a los que se han dado en llamar antígenos mayores:

- Serotipo A = Toxina alfa
- Serotipo B = Toxina alfa, beta y épsilon
- Serotipo C = Toxina alfa y beta
- Serotipo D = Toxina alfa y épsilon
- Serotipo E = Toxina alfa y iota

Estas exotoxinas se ponen de manifiesta mediante las pruebas de neutralización sobre ratón o conejo con los sueros anti tóxicos correspondientes.

Pero es que la complejidad del cuadro clínico de este grupo de enfermedades se ve complicado por la presencia de las denominadas endotoxinas, propias de aquellas fracciones del germen somáticas y que se encuentran en fase de esporulación. Es decir, esta endotoxina se elabora por el bacilo que está en fase de esporulación y solamente a partir de las fracciones que todavía conservan la característica vegetativa somática. La espora es incapaz de dar lugar a una endotoxina como tal.

Este componente endotóxico es letal y responsable del acúmulo de líquidos en el intestino, así como del aumento de la permeabilidad capilar. Es una fracción antigénica, termolabil y químicamente sensible a la acción de enzimas proteolíticos. Inoculada al organismo, previa inactivación, da lugar a la elaboración de una antitoxina que es capaz de neutralizar sus efectos letales pero, en cambio, es incapaz de neutralizar a la toxina a nivel intestinal.

A esta complejidad estructural de las diferentes toxinas se une el hecho de que algunas cepas de estos gérmenes pueden perder la capacidad de producir ciertas toxinas después de un cierto número de pases por los medios de cultivo artificiales. Así, ha quedado demostrado el hecho de que el serotipo B puede perder la capacidad de producir el factor épsilon y, antigénicamente, queda como un serotipo C. El serotipo C, a su vez, puede dejar de producir toxina beta, y entonces se convierte prácticamente en una variante del serotipo A.

Todos estos hechos quizás tengan valor en el momento de enjuiciar las variaciones de la morbilidad del agente causal de las Enterotoxemias del conejo.

En primer lugar, y desde el punto de vista clínico, debemos distinguir dos formas de presentación de la enfermedad:

A. Forma agua sintomática, con diarreas bien apreciables, y de aparición posterior al destete, y

B. Forma subaguda o crónica, asintomática, o a lo sumo 24 horas con anorexia y muerte fulminante, más propia de los animales reproductores después de los segundos partos.

Esta distinción, con un interés exclusivamente práctico, no es reflejo de una diferenciación de biotipo, sino simplemente es un exponente más de la gran variabilidad patogénica de este grupo de enfermedades. Y esta variabilidad exige que toda lucha profiláctica sea precedida por un exhaustivo estudio de la toxinogénesis de los agentes causales propios de un territorio epidemiológicamente establecido. Solo entonces se podrán considerar los resultados obtenidos.

Y veamos ahora unos resultados de análisis. De todos los problemas patológicos del conejo nosotros hemos establecido

que un 43 por 100 corresponden a procesos entéricos con diarrea. Y de estas formas diarreicas infecciosas un 58 por 100 son debidas a afección por W. perfringens.

De los serotipos toxigénicos hallados en el conejo doméstico han sido identificados por toxinotipia los siguientes: A= 6 por 100, B= 11 por 100, C= 22 por 100, D= 16 por 100, y E= 32 por 100. Un total de 13 por 100 no han podido ser tipificados correctamente, haciendo mención de que los identificados como serotipo A podrían no ser tales y si producto de la alteración de las toxinas de los serotipos C, D ó E. De todas formas llama la atención el porcentaje de los serotipos E, la mayoría de ellos aislados de animales jóvenes con diarrea e intensos trastornos del equilibrio hídrico.

Estos datos hacen referencia al último mes del año 78 y hasta septiembre del año en curso. Queremos hacer constancia de este hecho ya que hemos observado ciertas diferencias según los periodos de tiempo estudiados y aun los distintos años de referencia.

Creemos que con estos datos se hacen innecesarios todos los comentarios destinados a demostrar la gran importancia de las Enterotoxemias en los rendimientos de la explotación del conejo.