

HEPATITIS NECROTICA INFECCIOSA OVINA

Ana R. Moreira ¹ y A. Guzmán Salamanco ²

RESUMEN

Se describe un brote de Hepatitis Necrótica ovina, ocurrido en el mes de noviembre de **1980** en un establecimiento del Partido de Coronel Pringles (Peña, de Buenos Aires).

Se detallan los antecedentes del caso, así como la información epidemiológica disponible, lesiones macro y microscópicas y los procedimientos y técnicas bacteriológicas empleadas para el aislamiento y tipificación del *Clostridium novyi* tipo B.

Ovine **necrotic** hepatitis

SUMMARY

An outbreak of ovine necrotizing hepatitis occurred in november 1980 in a farm in the Coronel Pringles county (Buenos Aires Province). The antecedents and the gross pathology and histopathology of the disease are reported.

The bacteriological techniques used for the isolation and identification of the *Clostridium novyi* type B are described.

INTRODUCCIÓN

La Hepatitis Necrótica (Black disease) es una enfermedad infecciosa hiperaguda que afecta principalmente al ganado ovino y ocasionalmente al bovino y porcino, causada por la absorción de toxinas elaboradas por el *Clostridium novyi* tipo B en focos necróticos del hígado y generalmente asociada con una invasión previa de fasciolas inmaduras (1,2,18).

Esta enfermedad, probablemente existió en Australia desde 1880; en 1911 Gilruth describe la enfermedad en Tasmania aislando una bacteria la que más tarde fue identificada como *Clostridium oedematiens* (15) Dodd entre 1919 y 1921 describe las características clínicas, epidemiológicas de la enfermedad y el germen causal sin nominarlo. (15)

Albiston en 1927 aisla de hígados afectados un *Bacillus* anaeróbico el cual se

asemeja al *Cl. oedematiens*, pero fue Turner en 1928 y 1930 quien demostró la verdadera naturaleza de la enfermedad. El autor concluye que la hepatitis necrótica es una enfermedad infecciosa aguda causada por el *Cl. oedematiens* por una infección localizada en el hígado, con áreas de necrosis. Esta bacteria se encuentra usualmente sola aunque en raros casos está asociada a otros anaerobios; la infección es acompañada con la invasión del hígado por fasciolas inmaduras, además Turner demostró que un cuadro similar puede ser producido en cobayos por infestación artificial con fasciolas. Obtiene también logros en la inmunización de animales experimentales y en el control de la enfermedad a campo (18).

Edgar en 1928 comprobó que algunas ovejas sanas en áreas donde la enfermedad era endémica mantenían las esporas en el hígado y que las ovejas de otras

1 - Médico Veterinario, Técnico, I.N.T.A. Balcarce

2. — Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata

áreas estaban libres de ellas. <¹) Dicho hallazgo fue confirmado en los trabajos posteriores de Jamieson en 1949 y Williams en 1962(18).

En la República Argentina Rottgardt y Riglos en 1937 aislaron **Clostridium oedematiens** de músculo y médula ósea ovina en la Patagonia no pudiendo determinar la presencia en nuestro país de la enfermedad descrita por Turner en Australia (17).

Más tarde Riglos (1939) describe la enfermedad y reconoce el mérito de Emilio Mettler de haber identificado por primera vez a la Hepatitis Necrótica en nuestro país. En esa oportunidad se constató la existencia de las típicas lesiones del hígado y se cultivó un germen con todos los caracteres del **Clostridium oedematiens** d⁴).

De Diego cita la existencia de la enfermedad en la Argentina y aisló el **Clostridium novyi** tipo B de médula ósea en ovinos muertos en una epizootia en la Provincia de Chubut <⁶).

En el presente trabajo se describe un brote de Hepatitis Necrótica asociado a fasciolosis aguda en ovinos.

ANTECEDENTES DEL BROTE

Durante el mes de noviembre de 1980 la Unidad de Investigaciones en Patología Animal fue consultada por una mortandad en ovinos en el Partido de Coronel Pringles (Buenos Aires). El establecimiento ubicado en el Cuartef I y dedicado a la explotación mixta ovina-bovina, no posee lagunas permanentes, pero sí temporarias y es cruzado por dos canales. Durante el año 1980 permaneció inundado desde abril hasta setiembre.

La explotación ovina comenzó hace 10 años y no existían antecedentes de Fasciolosis ni de mortandades relevantes.

La población en riesgo estaba compuesta por 1.426 animales de la raza Co-

metiále divididos en cuatro majadas. Todas recibieron el mismo manejo en lo que respecta a rotación y/o permanencia en los distintos potreros. El único grupo de animales afectados fue el de ovejas adultas estimándose una mortandad del 45%.

La enfermedad comenzó durante el mes de julio, muriendo uno o dos animales diarios y se prolongó hasta el mes de noviembre en que se tomó participación en el caso. Durante ese período fueron aplicadas tres dosis de vacunas contra en-terotoxemia a intervalos de 20 días, sin obtenerse resultados efectivos. A fines de setiembre se desparasitó contra **Fasciola hepática** y se vacunó contra Hemoglobi-nuria bacilar deteniéndose la mortandad por un período de 15 días.

SÍNTOMAS Y LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS

Muy pocos animales presentaron síntomas,- las muertes ocurrieron preferentemente durante la noche; al revisar la majada no se encontraban animales enfermos, no obstante esto, a la mañana siguiente aparecían varios animales muertos. Un solo animal se encontró en decúbito esternal con hipertemia y respiración acelerada (Foto 1).

En nuestra visita se necropsiaron ocho animales con distintos grados de autólisis, identificados de la siguiente manera: ovejas N° 1, 2, 6, 7 y 8, con moderado grado de autólisis (aproximadamente 6 hs. de muertas). Oveja N° 3: sacrificada en estado agónico. Oveja N° 4: 3 hs. de muerta. Oveja N° 5: recién muerta. Salvo pequeñas diferencias, el cuadro patológico observado coincidió en todas las necropsias.

El tejido subcutáneo presentó un tinte rosado-grisáceo, aún en el animal sacrificado; edema gelatinoso amarillento en región pectoral; colecta serosanguinolenta en saco pericárdico, cavidades torácica y



FOTO N° 1: Oveja con síntomas

abdominales; ligera congestión y hemorragia en sectores de intestino delgado; riñones tumefactos y oscuros; hemorragias sub-serosas en pleura diafragmática y peritoneo visceral y parietal; hemorragias en napa en el endocardio del ventrículo izquierdo; congestión y edema de abomaso, edema y hemorragia en pared de vesícula biliar. Se observó la presencia de formas inmaduras de **Fasciola hepática** en canalículos biliares y libres en cavidad abdominal; múltiples infartos hepáticos, de 2 a 4 cm de diámetro, amarillos y de superficie rugosa, algunos de ellos hemorrágicos, rodeados de un área de congestión y recubiertos por una capa densa de fibrina. (Foto 2). Pudieron apreciarse lesiones de la cápsula de Glisson y de parénquima hepático, producidas por la penetración de formas inmaduras de fasciolas.

LESIONES HISTOPATOLÓGICAS

En el hígado se observaron múltiples focos de necrosis con fuerte infiltración de polimorfonucleares (PMN) en la periferia, sectores francamente hemorrágicos con aspecto de lagunas y pérdida total de la arquitectura del tejido. Se observó intensa infiltración de PMN y eosinófilos en espacios porta (Foto 3). Proliferación de conductos biliares y fibroplasia marcada en algunas zonas portales. En áreas donde el parénquima es normal, hay retención de pigmento biliar y congestión de sinusoides, además de cambios degenerativos en los hepatocitos y presencia de formas inmaduras de **Fasciola hepática** libres dentro del parénquima rodeado de una zona hemorrágica (Foto 4).

En el bazo se pudo apreciar una depleción linfoidea, cordones de la pulpa roja más prominentes y en algunos sectores acúmulos de polimorfoculares.

Los linfonódulos hepáticos presentaron una severa congestión y hemorragia desde la zona paracortical a la zona medular. La cápsula estaba infiltrada con PMN y congestiva. En los senos sub-capsulares se visualizó acúmulos de células inflamatorias con predominio de PMN. Se observó prominencia de los centros germinativos de los folículos, con células linfocíticas inmaduras y con sectores necróticos. El proceso necrotizante se hace también extensivo a sectores de la zona medular.

TÉCNICAS BACTERIOLÓGICAS Y PARA INMUNOFLORESCENCIA

Se efectuó la coloración de Gram-Hucker y visualización de esporas con la tinción de Schaeffer y Fulton. Los aislamientos se realizaron sembrando la muestra en caldo infusión de hígado y carne trozada (IH y C) con el agregado de glucosa 0,5%, triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, almidón soluble 0,2%, sulfato de magnesio 0,01% y cloruro de sodio 0,85% en atmósfera anaeróbica, efectuando a partir de allí repiques a agar Viande Levure (V-L) con sangre desfibrinada 7% y agar yema de huevo.

Para la identificación bioquímica se utilizaron los siguientes medios y reactivos: nitrato-movilidad y reactivo de Griess-Ilosvay, para detectar la reducción de nitratos a nitritos; medio indol y reactivo de Kovacs para su determinación; leche tornasolada; medio para la investigación de sulfhídrico; medio tioglicolato glucosado con la adición de discos de gelatina para determinar su licuefacción; medio para investigar la producción de

lecitinasa y los siguientes azúcares al 1% en medio V-L semisólido (con 0.05 de agar): glucosa, lactosa, maltosa, mani-tol, salicina, sacarosa, arabinosa, dulcitol, galactosa, inositol, mañosa, rafinosa, sor-bitol, trehalbosa y xilosa.

Se realizaron improntas y frotis para inmunofluorescencia directa (IFD), utilizando acetona químicamente pura para su fijación. Solución bufferada tamponada pH 7,2 para el lavado en agitador, anticuerpos marcados (*) y glicerina bufferada pH 8,2 para montaje y visualización en microscopio de Inmunofluorescencia.

Se inocularon 6 cobayos por vía intramuscular, 4 con 1 ce de macerado hepático efectuado con solución fisiológica estéril (SFE) y los dos restantes con 1 ce de cultivo a partir de un caldo I H y C.

PROCEDIMIENTO Y RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS

De las ocho ovejas necropsiadas se tomaron muestras de cuatro de ellas N° 2, 3, 4 y 5. Se transportaron al laboratorio en recipientes estériles, colocados inmediatamente en jarras con sobres de mezcla gaseosa para obtener una atmósfera anaeróbica (**).

Los hígados se maceraron con SFE, sembrándolos en Caldo I H y C en medio V-L sangre y medio yema de huevo. Se incubó en jarras para anaerobiosis a 37°C durante 48 horas.

Se observó abundante crecimiento en los tubos con desplazamiento del tapón de Vas-Par (Vaselina y Parafina) debido a la producción de gas. Las placas de V-L y de yema de huevo no mostraron crecimiento en siembra directa.

A partir de los tubos con crecimiento se hicieron: a) Frotis donde se pudieron

observar bacilos Gram positivos, de aproximadamente 5 a 6 micras de longitud, con espora oval en posición subterminal. En los tubos correspondientes a las ovejas N° 2 y IM° 4 se visualizaron además abundantes cocos Gram positivos y en menor proporción para las ovejas IM° 3 y N° 5. La purificación de la bacteria se logró por sucesivos pasajes en medio V-L e inoculación en animales de laboratorio, b) Repiques a agar V-L sangre y agar yema de huevo, obteniéndose al cabo de 48 horas de incubación a 37°C en anaerobiosis, crecimiento de colonias beta hemolíticas de aproximadamente 3 mm de diámetro, de bordes irregulares, las cuales se repican a caldo I H y C para efectuar a partir de allí las pruebas bioquímicas correspondientes, c) Frotis para IFD siendo positiva para aquellos teñidos con anticuerpos anti —**Cl-novyí**. d) Se inocularon dos cobayos por vía *i/m* muriendo a las 12 horas post-inoculación.

Los cuatro cobayos inoculados con macerado hepático murieron entre las 12 y 24 hs. post-inoculación.

Los cobayos inoculados con macerado hepático y con cultivo presentaron a la necropsia en correspondencia con la zona de inoculación: edema gelatinoso y colecta serosanguinolenta en tejido subcutáneo, con necrosis muscular subyacente.

Se sembró músculo de la zona de inoculación siguiendo la metodología descrita anteriormente, recuperándose en pureza **Clostridium novyi** tipo B.

Las cepas aisladas de los hígados ovinos y reaisladas de los cobayos inoculados fueron Beta hemolíticas, licuaron la gelatina, redujeron los nitratos a nitritos, no produjeron índol, fueron móviles, produjeron digestión de la leche tornasolada, fueron lecitinasa positiva, no produjeron

sulfhídrico, prueba de aerotolerancia negativa, fermentaron a la glucosa, maltosa, inositol, mañosa y ribosa; no fermentaron el resto de los azúcares.

Las cepas liofilizadas fueron viables y conservaron la patogenicidad.

DISCUSIÓN

Es bien conocida la asociación que existe entre la fasciolosis y la hepatitis ne-crótica en áreas donde ambas enfermedades son enzoóticas (12) La presentación es estacional y depende de los períodos de invasión hepática por formas inmaduras de *Fasciola*, siendo más frecuente a fines de otoño o principios de invierno (12,13).

Si bien no existían antecedentes de fasciolosis en el establecimiento, la enfermedad está presente en la región, confinada en general a potreros sobre las sierras o con cursos de aguas permanentes o semipermanentes.

Jamieson (1948) observa un aumento en el número de casos en correspondencia con épocas muy lluviosas. Durante el otoño de 1980 ocurrieron lluvias muy intensas que provocaron una inundación inusual en el sud-este de la provincia de Buenos Aires. El establecimiento se encuentra ubicado sobre la pendiente Este de uno de los macizos serranos existentes en la región. Es de suponer entonces que la infestación de los pastos fue producida por el arrastre de cantidades importantes de metacercarias o de caracoles contaminados que se depositaron en los potreros problema. Esta observación es avalada por la ausencia de lesiones de fasciolosis crónica y por el desconocimiento de la enfermedad en el establecimiento.

Diversos estudios confirman la existencia de esporas de *Cl. novyi* en hígados de ovejas normales (16)

La brusca detención de la mortandad a posteriori del tratamiento contra *Fasciola hepática* indicaría en este caso que ésta fue indispensable para crear las condiciones de desarrollo del *Clostridium*.

La ocurrencia de la enfermedad solamente en ovejas adultas estaría en correspondencia con lo observado por Parker (1948) y Osborne (1958). (12,18).

Dodd (1918) cita un caso en corderos de seis meses de edad pero habitualmente ocurre en animales de 3 a 5 años (Jamieson al 1948). (18)

La vacunación (15) o la utilización de anatoxinas (9) han demostrado ser eficaces en la prevención y control de la hepatitis necrótica cuando son acompañadas de tratamientos estratégicos contra *Fasciola hepática*. Debido a la falta de preparados comerciales para prevenir la hepatitis necrótica, en este caso se

utilizó únicamente tratamiento contra Fasciolosis, repetido cada 15 días en cuatro aplicaciones. La mortandad se detuvo dentro de las 24 horas posteriores a la primera dosificación.

La cepa de *Clostridium novyi* tipo B aislada del brote descrito fue cedida al Servicio Nacional de Sanidad Animal quien la entregó a una empresa privada para la elaboración de una bacterina o-xoide. La majada fue vacunada con este preparado y en los dos años siguientes no se presentó la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bagadi, H.O., Seweil, M.M.H. (1973). Res. Vet. Sci. 1:49-53.
2. Bagadi, H.O., Seweil, M.M.H. (1973) Res. Vet.Sci. 15:53-61.
3. Bagadi, H.O., Seweil, M.M.H. (1974) Res. Vet. Sci. 17:320-322.
4. Bourne, F.J, Kerry, JLB. (1965). The Vet. Rec, 77 (49): 1463-1464.
5. Bittiaux, R., Beerens, H., Tacquet, A. (1969). Manual de techniques Bacteriologiques. Ed. Medicales Flammanon, Cap. XV.
6. de Diego, A.I. (1974). Hepatitis necrosante. En Su : Guía para el estudio de las Enfermedades Infecciosas de los animales. Ed. Farro, Buenos Aires, pág. 325-326.