

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**"HEMOGLOBINURIA BACILAR: DESCRIPCIÓN DE UN BROTE,  
PRESENTACIÓN, DIAGNÓSTICO Y CONTROL"**

**Por**

**ALGORTA MEDEROS, María Belén  
CABRERA TABELIRA, Eliane**

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD Estudio de caso

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2015**

## **PÁGINA DE APROBACIÓN**

**Tesis de grado aprobada por:**

**Presidente de mesa:**

---

Dr. Carlos Morón

**Segundo miembro (tutor):**

---

Dr. Julián Bermúdez

**Tercer miembro:**

---

Dr. Álvaro Núñez

**Cuarto miembro:**

---

Dra. Matilde Piquet

**Quinto miembro:**

---

Dr. Juan Ignacio Bermúdez

**Fecha:** 17 de Noviembre del 2015

**Autores:**

---

Br. María Belén Algorta Mederos

---

Br. Eliane Cabrera Tabeira

## **AGRADECIMIENTOS**

A los Dres. Julián Bermúdez, Matilde Piquet y Juan Ignacio Bermúdez por su dedicación y colaboración permanente, así como la transferencia de conocimiento y experiencia tan valiosa para nosotras.

Al Dr. Carlos Aristimuño por la disposición y el material que nos acercó para crear los antecedentes del caso clínico.

Al Laboratorio SANTA ELENA-VIRBAC por proporcionarnos material para la descripción del caso.

Al Ing. Agr. Diego Rodríguez (Establecimiento “Doña Chica”) por su contribución.

A las funcionarias de biblioteca y bedelía de Facultad de Veterinaria por su paciencia.

A todos de los integrantes del Grupo de Producción Animal 2013 y demás amigos que hemos hecho durante el paso por Facultad de Veterinaria.

A nuestras familias y amigos por el apoyo incondicional recibido durante la realización de la carrera.

## TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN .....	2
AGRADECIMIENTOS .....	3
TABLA DE CONTENIDO .....	4
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	6
1. RESUMEN .....	7
2. SUMMARY .....	8
3. ENFERMEDADES CLOSTRIDIALES.....	9
3.1. Mancha: .....	11
3.2. Enterotoxemia: .....	11
3.3. Edema Maligno o Gangrena gaseosa: .....	12
3.4. Hepatitis Necrótica Infecciosa: .....	13
3.5. Tétanos: .....	14
3.6. Botulismo: .....	15
3.7. Hemoglobinuria bacilar: .....	15
4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES CLOSTRIDIALES: .....	16
4.1. Obtención y remisión de muestras: .....	16
4.2. Procesamiento en el laboratorio: .....	16
4.2.1. Siembra y aislamiento: .....	16
4.2.2. Pruebas bioquímicas: .....	16
4.2.3. Técnica de inmunofluorescencia: .....	17
4.2.4. PCR: .....	17
4.2.5. Inmunohistoquímica: .....	18
5. Inmunoprofilaxis y métodos de control .....	18
6. CLOSTRIDIOSIS EN EL URUGUAY: .....	18
7. INTRODUCCIÓN AL CASO DE ESTUDIO .....	22
7.1. Agente etiológico: <i>Clostridium haemolyticum</i> .....	22
7.1.1. Clasificación y morfología: .....	22
7.1.2. Características del cultivo: .....	22
7.2. La enfermedad Hemoglobinuria bacilar: .....	23
7.3. Diagnóstico de Hemoglobinuria bacilar: .....	25
7.4. Diagnóstico diferencial: .....	26

7.5.Situación de la enfermedad a nivel mundial, regional y de Uruguay: .....	28
8.HIPÓTESIS .....	31
9.OBJETIVO GENERAL.....	31
9.1.Objetivos particulares .....	31
10.ESTUDIO DEL BROTE.....	32
10.1.Predio en estudio .....	32
10.2.Epidemiología.....	32
10.3.Motivo de consulta.....	33
10.3.1.Antecedentes del caso .....	33
10.4.Descripción de la sintomatología clínica:.....	35
10.5.Metodología de diagnóstico realizada: .....	36
10.5.1.En el campo:.....	36
10.5.2.En el Laboratorio: .....	40
10.6.Descripción de las medidas de control, producción y uso de una vacuna monovalente.....	42
11.RESULTADOS .....	42
12.CONCLUSIONES – RECOMENDACIONES .....	44
13. BIBLIOGRAFÍA .....	45

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

### CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de <i>C. perfringens</i> de acuerdo con la producción de las principales toxinas.....	12
Cuadro 2. Pruebas bioquímicas de los Clostridios.....	17
Cuadro 3. Enfermedades Clostridiales diagnosticadas en Uruguay.....	18
Cuadro 4. Vacunas clostridiales registradas en nuestro país.....	20

### FIGURAS

Figura 1. Ubicación de los focos de Hemoglobinuria bacilar registrados en la zona este del país.....	31
Figura 2. Visualización aérea del establecimiento “Doña Chica”.....	32
Figura 3. Cadáveres bovinos en zona inundable.....	33
Figura 4. Número de muertes por año y descripción de vacunas clostridiales polivalentes comerciales utilizadas.....	35
Figura 5. Cadáver con distensión abdominal.....	37
Figura 6. Espuma sanguinolenta por la nariz.....	37
Figura 7. Sangre no coagulada por ano y vulva.....	37
Figura 8. Cadáver en decúbito costal, con aumento del diámetro abdominal y materia fecal con sangre.....	38
Figura 9. Hemorragias en pared abdominal.....	38
Figura 10. Hemorragias en peritoneo y epiplón.....	38
Figura 11. Hemorragias en intestino delgado, intestino grueso y pre estómagos.....	38
Figura 12. Cavidad torácica con hemorragias en pleura parietal, en pulmones y corazón.....	39
Figura 13. Muestras de hígado remitidas al laboratorio Santa Elena-Virbac....	39
Figura 14. Muestras de hígado remitidas al laboratorio Santa Elena-Virbac....	39
Figura 15. Hígado remitido con una coloración ocre al corte.....	40
Figura 16. Cobayo con hemorragias y líquido sanguinolento en subcutáneo...42	
Figura 17. Colonias compatibles con <i>Clostridium novyi</i> en medio de agar sangre.....	43
Figura 18. Medio de cultivo Cooked meat.....	43

**1. RESUMEN** La Hemoglobinuria bacilar es una enfermedad clostridial producida por el *Clostridium haemolyticum* y es una de las clostridiosis más importantes que afecta a los bovinos adultos de la zona este de la República Oriental del Uruguay. La hipótesis que se pretende develar en el presente estudio de caso sería que la mortandad de ganado bovino en un predio en el departamento de Rocha se debía a una infección por clostridios patógenos, especialmente una Hemoglobinuria bacilar. Por lo tanto el objetivo de este trabajo es la identificación de la causa de muerte aguda en bovinos, y para lograr dicho propósito se realiza una descripción de la sintomatología clínica, así como la descripción de la metodología de diagnóstico realizada, y para finalizar se detallan las medidas de control y profilaxis que se tomaron en dicho caso clínico así como sus consecuencias. Con los datos epidemiológicos, clínicos, patológicos, de laboratorio y la respuesta a la vacuna monovalente utilizada, nos inclinamos el diagnóstico a *C. haemolyticum*, agente responsable de la Hemoglobinuria bacilar, lo que confirma la hipótesis planteada.

2. **SUMMARY** Bacillary hemoglobinuria is a disease caused by clostridial *Clostridium haemolyticum* and is one of the most important clostridiosis that affects adult cattle in the eastern part of the country. The hypothesis to be revealed in this case of study would be that the death of the cattle in a farm in the department of Rocha was due to an infection by pathogenic clostridia, especially Bacillary hemoglobinuria. Therefore the aim of this study is to identify the cause of death in bovines, and to achieve this purpose, a description of the clinical symptoms, as well as the description of the diagnostic methodology was performed, and finally a detailed description of the control and prevention measures taken in this clinical case and its consequences. With the epidemiological; clinical; pathological and laboratory data, altogether with the response to the monovalent vaccine used, we are inclined to diagnose *C. haemolyticum* as the responsible agent of Bacillary hemoglobinuria, confirming the planned hypothesis.

Revisión Lingüística



Prof. Adj. Carmen Silvia Gallo Muniz TT EPE MDL  
Encargada del Área de Inglés  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República



### 3. ENFERMEDADES CLOSTRIDIALES

Las clostridiosis son enfermedades toxico-infecciosas, no contagiosas, producidas por bacterias del género *Clostridium*, caracterizadas por requerir condiciones de anaerobiosis para su crecimiento y desarrollo. Poseen una forma bacilar, con esporas generalmente deformantes, y toman positivamente la coloración de Gram. Son telúricos, nitrificantes y productores de gas. Los clostridios producen enfermedades conocidas desde la antigüedad, que se caracterizan por ser súbitas, con alta mortalidad, generalmente en forma de brotes aunque bajo ciertas condiciones pueden producir también, muertes en forma de goteo. (De Freitas, 1987; Robles, 1998; Radostits, 2002; Uzal, 2008).

El género *Clostridium* es un conjunto de microorganismos muy difundidos en la naturaleza cuyo hábitat puede ser el suelo, los sedimentos marinos, las pasturas vegetales en descomposición y el tracto digestivo de diversas especies de animales. En los animales domésticos se comportan, en la mayoría de los casos, como causantes primarios de enfermedad, ya que rara vez actúan como invasores secundarios. Debido que el contacto con el oxígeno les resulta letal para los microorganismos anaerobios, en el caso de los clostridios la capacidad de formar esporas asegura la sobrevivencia y la diseminación en el medio (Carlioni, G., 2007).

Estos gérmenes elaboran proteínas denominadas toxinas y que por su actividad biológica son las responsables su patogenicidad. La actividad de las toxinas permite su identificación y caracterización y se puede evidenciar por los efectos producidos en animales de laboratorio, sobre cultivo de tejidos, o in vitro, detectando la degradación de distintos sustratos sobre los que actúan como enzimas. Luego que las toxinas son secretadas al medio que rodea a la bacteria, son absorbidas por el medio interno (toxemia), alcanzando zonas de acción específica y ejerciendo su acción patógena mediante alguno de estos procedimientos:

- Hidrolizando componentes esenciales de la integridad de los tejidos, como la lecitina y el colágeno.
- Alterando la permeabilidad capilar y produciendo como consecuencia edemas
- Hemólisis.
- Hidrolizando las uniones trabeculares de los tejidos a través de hialuronidasas.
- Produciendo neurotoxinas que bloquean la liberación de acetilcolina en las terminaciones nerviosas (De Freitas, 1987; Carlioni, G., 2007).

Según su capacidad invasiva, las especies clostridiales se separan en dos grupos:

- No invasoras o toxi-infecciosas, caracterizadas por tener poco poder de multiplicación en tejidos vivos, y ser productoras de toxinas muy potentes. Dentro de ellos están incluidos los agentes causales de tétanos y botulismo.
- Invasoras, con gran capacidad para colonizar tejidos, productoras de toxinas de variada potencia sin llegar a la toxicidad de los agentes no invasores. Incluye a las especies causantes de mancha, edema maligno, enterotoxemia, etc. (Uzal, 2008).

Algunas toxinas pueden ingerirse pre-formadas en el alimento como ocurre con la toxina botulínica. Otras pueden ser absorbidas desde el intestino después de una proliferación anormal del microorganismo causal en las vías digestivas, hecho que ocurre en la mayoría de los cuadros de enterotoxemias. En otros casos, como sucede con el Carbunco sintomático o en gangrenas gaseosas, las formas vegetativas del microorganismo elaboran toxinas cuando las esporas germinan en los tejidos. Éstas toxinas ejercen su acción en forma local sobre los tejidos lesionados, se absorben y se difunden produciendo una toxemia generalizada que induce la muerte del individuo afectado. Por último, otras infecciones se desarrollan con carácter local, con elaboración de potentes toxinas que actúan a distancia como en el tétanos, la Hemoglobinuria bacilar y también en algunos tipos de enterotoxemias (Carloni, G., 2007).

Existen en la literatura distintas clasificaciones de las enfermedades histotóxicas producidas por clostridios. Aquí presentamos una clasificación basada en el tipo de enfermedad producida (Uzal, 2013).

1. Grupo mancha/gangrena gaseosa

Enfermedades producidas por *Clostridium chauvoei* (*C. chauvoei*), *Clostridium septicum* (*C. septicum*), *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), *Clostridium novyi* (*C. novyi*), *Clostridium sordellii* (*C. sordellii*).

2. Grupo infecciones hepáticas

Enfermedades causadas por *Clostridium novyi* (*C. novyi*)

Enfermedades causadas por *Clostridium piliforme* (*C. piliforme*)

3. Grupo neurotóxicas

Enfermedades causadas por *Clostridium tetani* (*C. tetani*)

Enfermedades causadas por *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*).

El carácter ubicuo de estos microorganismos hace que la erradicación de las enfermedades por clostridios sea prácticamente imposible y necesite un control mediante medidas profilácticas (Radostits, 2002).

### **3.1. Mancha:**

Esta enfermedad es una infección producida por el *Clostridium chauvoei*, caracterizada por ser febril, enzoótica, que afecta al ganado vacuno, habitualmente en edades entre los 6 meses a 2 años de edad y con un buen estado corporal; por ello tiene un gran impacto en la economía (Radostits, 2002).

Es de origen endógena, es decir que la bacteria está presente en la musculatura del animal previamente a que se desencadene la enfermedad. Afecta principalmente las zonas de mayor masa muscular como lo son las zonas de grupas, paletas y el dorso. Los animales llegan a presentar fiebre alta, cojera asociada con fluctuaciones, enfisema y en la mayoría de los casos termina con la vida del animal en un periodo de 1 a 3 días después de la aparición de los síntomas. La forma de ingreso de *C. chauvoei* al organismo es comúnmente por vía oral, al consumir agua o pastos contaminados con esporas de esta bacteria o a través de heridas en las mucosas, ingresa y se distribuye por vía hematógena, a diferentes órganos y tejidos del organismo del animal.

Para que se desencadene la enfermedad es necesario que se generen condiciones apropiadas para su crecimiento, como son la presencia de hematomas en el músculo, ejercicio excesivo, indigestión aguda o cualquier proceso que desvitalice al tejido, debido a la presencia de glucógeno del músculo y un pH alcalino. Una vez que dichas condiciones son alcanzadas, se genera la forma vegetativa de esta bacteria, produciéndose toxinas y otras enzimas, cada una con un fin específico. En general causan severa inflamación del músculo, hemorragia, edema gaseoso, degeneración, produciendo un aumento de la temperatura corporal, alrededor de los 40°C. Finalmente, hay una bacteriemia que se da únicamente en la fase final de la enfermedad y que conlleva a la muerte del animal (Robles, 1998; Radostits, 2002).

### **3.2. Enterotoxemia:**

Enterotoxemia es el término empleado para denominar aquellas enfermedades causadas por las toxinas de los diferentes tipos de *C. perfringens* dentro del intestino. Existen 5 tipos diferentes de *C. perfringens*; A, B, C, D y E productores cada uno de ellos de 4 toxinas principales, alfa, beta, épsilon e iota. Cada tipo está asociado con una infección entérica específica que varía con cada animal.

Otras toxinas denominadas mayores (enterotoxina y  $\beta$  2) pueden ser producidas por cualquier tipo de *C. perfringens* pero no se las utiliza actualmente para la clasificación de este microorganismo (Uzal, 2010).

Cuadro 1. Clasificación de *C. perfringens* de acuerdo con la producción de las principales toxinas (Uzal, 2010).

Tipo de <i>C. perfringens</i>	Toxina alfa	Toxina beta	Toxina épsilon	Toxina iota
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

Los cinco tipos de *C. perfringens* pueden ser habitantes normales del intestino de animales sanos, y que mediante cambios bruscos de alimentación, u otros factores que aún no están bien comprendidos del ambiente intestinal proliferan en grandes cantidades y producen toxinas, las cuales son responsables de las distintas formas de enterotoxemia (Uzal, 2010).

El *C. perfringens* tipo A produce la toxina alfa siendo asociado a gangrena gaseosa y dolencias entéricas de animales domésticos. El tipo B produce toxinas alfa, beta y épsilon, y está asociado a enterotoxemia y disentería en corderos. El *C. perfringens* tipo C, productor de toxinas alfa y beta, es la causa primaria de enteritis necrótica en lechones con edades entre 0 a 2 semanas y de enterotoxemia en rumiantes. El *C. perfringens* tipo D productor de toxinas alfa y épsilon es la causa más común de enterotoxemia en ovinos y caprinos. El tipo E produce toxinas alfa e iota y está asociado a enterotoxemia en los animales domésticos (De Freitas, 1987; Uzal, 2010).

### 3.3. Edema Maligno o Gangrena gaseosa:

Es una patología causada por uno o más de los siguientes microorganismos: *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. perfringens* tipo A, *C. sordellii* y *C. novyi* tipo A, y se observa tanto en bovinos como en ovinos (Uzal, 2008).

Aparece de forma esporádica y siempre relacionada a un traumatismo, ya sea accidental o quirúrgico, que es la puerta de entrada de la infección y crea las condiciones ambientales de crecimiento bacteriano. Las heridas muy penetrantes acompañadas por un traumatismo grave proporcionan las

condiciones más favorables para el crecimiento de los anaerobios. Afecta todas las especies animales y todas las categorías (Radostits, 2002).

La mayoría de los casos se observan como animales encontrados muertos en las 12-18 horas que siguen a un evento de castración, descole, esquila, balneación o cualquier otro tipo de traumatismo. En algunos casos se pueden observar signos clínicos como debilidad, temblores musculares, cojera y distensión de la zona afectada. Ésta generalmente se presenta con tono azulado y fría debida a la isquemia tisular, con una delgada línea hiperémica que la separa del tejido normal (Uzal, 2010).

Normalmente hay gangrena cutánea, con edema en los tejidos subcutáneo y conjuntivo intermuscular, alrededor del lugar de la infección. También puede estar afectado el músculo subyacente pero esto no es notable. El líquido del edema normalmente es sanguinolento y contiene burbujas de gas. Las cavidades peritoneal y torácica están cubiertas por un exudado serosanguinolento (Radostits, 2002).

### **3.4. Hepatitis Necrótica Infecciosa:**

El agente causal de la hepatitis necrótica infecciosa ó "Enfermedad Negra" (Black disease), es el *C. novyi* tipo B que afecta ovinos, bovinos y cerdos. Tiene una prevalencia mayor en ovinos, caracterizada por su aparición repentina y su ausencia de síntomas ya que los animales enfermos aparecen muertos. Lo poco que se puede observar es un gran decaimiento, hipertermia, inmovilidad, diarrea, coma y muerte. Afecta preferentemente a ovinos adultos, mayores de un año de edad y bien alimentados, siendo muy rara su aparición en corderos. Se presenta preferentemente en otoño e invierno en áreas bajas y húmedas, donde hay más posibilidades de infectarse con metacercarias de *Fasciola hepática*. Las esporas ingresan naturalmente con los alimentos y son transportadas al hígado, bazo y medula ósea, donde se alojan de forma latente, particularmente en la cápsula de Glisson alrededor del parénquima hepático. En condiciones normales las esporas no pueden germinar debido a la alta oxigenación de estos tejidos. Sin embargo, frente a una injuria hepática disminuye la irrigación sanguínea y cae el potencial redox, creando las condiciones adecuadas para la invasión del microorganismo (De Freitas, 1987; Radostits, 2002).

Otros predisponentes de la infección son la alta infestación por quiste hidático, cisticercosis por *Cysticercus tenuicollis*, tenias como *Thysanosoma actinoides*, factores químicos y plantas tóxicas que dañen el hígado. La ictericia es raramente observada, ya que se necesitan más horas de las que normalmente sobreviven los animales para que los pigmentos biliares se hagan visibles en los tejidos (Radostits, 2002; Uzal, 2008).

A la necropsia pueden observarse descargas sanguinolentas por nariz, ano y vulva, y una gran ingurgitación de los vasos sanguíneos subcutáneos, que le da color negro a la cara interna de la piel. Los músculos abdominales están

cubiertos por un exudado gelatinoso y se encuentra un abundante fluido seroso o serosanguinolento en las cavidades peritoneal, pleural y pericárdica. El hígado presenta congestión, de color rojo oscuro, y áreas focales de necrosis de color gris amarillento, rodeadas por una zona hiperémica de color rojo brillante. Las lesiones hepáticas pueden ser visibles en la superficie de la cara diafragmática del órgano, pueden estar en la profundidad y pasar desapercibidas a no ser que se hagan cortes seriados en el órgano, o pueden no estar presentes. Es habitual encontrar signos de una invasión reciente de *Fasciola hepática* en los canalículos biliares. Es posible también encontrar focos necróticos en riñones (De Freitas, 1987; Robles, 1998; Radostits, 2002).

### 3.5. Tétanos:

Es una enfermedad infecciosa grave, con alta tasa de mortalidad, causada por la toxina del *C. tetani*. Se relaciona la enfermedad a un proceso traumático contaminado que permite que las esporas germinen en un medio adecuado de tensión reducida de oxígeno, lográndose la proliferación masiva del agente y la producción de las toxinas. Estos microorganismos proliferan y producen tetanolisina y tetanoespasmina. La tetanolisina promueve la necrosis tisular local mientras que la tetanoespasmina se difunde a la circulación sistémica absorbiéndose por linfa y sangre, o neural a través de los nervios periféricos llegando a las neuronas motoras del cuerno ventral de la médula espinal por transporte retrógrado intraaxonal (De Freitas, 1987; Radostits, 2002).

El mecanismo de acción de la tetanoespasmina sobre el sistema nervioso consiste en el bloqueo del impulso nervioso espontáneo a nivel presináptico, que provoca la liberación de los neurotransmisores GABA y glicina, con la consiguiente desinhibición de las neuronas motoras.

Los factores que favorecen o predisponen su aparición son todas las heridas por esquila, castración, descole, inyecciones mal aplicadas o con instrumentos contaminados, balneaciones post esquilas, utilización de anillos para castración, cambio de dentición, mordeduras de perro entre otras. Los bacilos del tétanos permanecen localizados en el lugar de introducción y no invaden los tejidos adyacentes. La sintomatología clínica se deberá a la contracción espasmódica de los músculos de la zona afectada, frecuentemente la cabeza y la nuca, extendiéndose luego a los miembros y generalizándose a todo el cuerpo. Al comienzo de la enfermedad los animales se presentan envarados y con una hiperestesia manifiesta a los sonidos y golpes, con espasmos musculares en los párpados y en la nuca, protrusión del tercer párpado y blefaroespasma. A medida que avanza el cuadro las contracciones comienzan a generalizarse, hay opistótonos, trismo maxilar, incapacidad para masticar y deglutir, fiebre y postración. Presentan intensos temblores tónico clónicos de las extremidades seguidas de períodos de relajación. Adoptan en esta fase una expresión ansiosa

y disneica, sobreviniendo la muerte por asfixia entre las 12 y 18 horas de comenzados los síntomas, con marcada hipotermia. No existen alteraciones macroscópicas en el examen post mortem, sólo se puede llegar a observar la herida que sirvió de puerta de entrada. La mortalidad es del 80% (De Freitas, 1987; Radostits, 2002).

### **3.6. Botulismo:**

Es una enfermedad producida por la ingestión de la toxina del *C. botulinum*, caracterizada por desencadenar un cuadro de parálisis motora de consecuencias fatales. Existen 6 tipos toxigénicos: A, B, C, D, E, F, siendo los tipos C y D los más prevalentes en animales. Su acción farmacológica es la misma pero se diferencian serológicamente.

El agente se encuentra en el suelo, principalmente en áreas endémicas, y en el tracto gastrointestinal de los animales. La mayor concentración está en cadáveres, carroña, y materia orgánica en descomposición. Estas condiciones constituyen un hábitat ideal para las esporas, con activa multiplicación y producción de grandes cantidades de toxina de altísimo poder letal. Es una enfermedad típica del bovino que pasta en zonas carentes de fósforo y que come huesos. Es rarísima en ovinos y en caprinos, al punto de no haber sido diagnosticada en ovinos en Argentina ni en Uruguay; esto se puede deber a que los desbalances carenciales en ovinos son muy difíciles de encontrar. Se produce la enfermedad por consumir bajas cantidades de toxina, se absorbe por la sangre y es llevada al sistema nervioso provocando una parálisis flácida y causando la muerte del animal por asfixia. Los primeros síntomas son inquietud, incoordinación, cabeza sobre el flanco, parálisis muscular flácida de miembros posteriores, progresado a extremidades anteriores, cabeza y cuello, y en algunos casos protrusión de la lengua, sialorrea e incapacidad de deglución. (De Freitas, 1987; Radostits, 2002).

### **3.7. Hemoglobinuria bacilar:**

La Hemoglobinuria bacilar es una enfermedad infecciosa aguda, toxémica, altamente fatal, producida por el *Clostridium haemolyticum*, que afecta al ganado bovino, y ocasionalmente al ovino. Dicha bacteria es transmitida por el suelo, y en condiciones de hipoxia produce múltiples zonas necróticas en el hígado y una potente exotoxina hemolítica. La enfermedad se caracteriza por presentar alta fiebre, hemoglobinuria, rápida muerte e infartos en el hígado. Esta enfermedad es muy rara en los terneros menores de un año de edad y en el ganado bovino en mal estado. La mayoría de los casos ocurren en los animales adultos, especialmente aquellos en buenas condiciones o los recientemente introducidos en una pastura contaminada. Su patogenia y sintomatología es similar a la de la

hepatitis necrótica, apareciendo ictericia, anemia y hemoglobinuria. La muerte ocurre generalmente dentro de 24 a 36 horas de la aparición de la enfermedad clínica y se cree que es causada por anoxia, como resultado de la destrucción de los eritrocitos (Olander HJ y col. 1968; Smith LD., 1975; Gillespie JH y Timoney JF., 1981).

#### **4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES CLOSTRIDIALES:**

##### **4.1. Obtención y remisión de muestras:**

Con el fin de confirmar el agente etiológico que está involucrado en la enfermedad, se debe realizar una toma de muestras la cual se debe recolectar inmediatamente después de la muerte del animal, ya que la invasión post mortem del microorganismo dificulta los análisis de laboratorio. El objetivo principal de la conservación de las muestras para el estudio microbiológico es inhibir la multiplicación de gérmenes durante el envío, evitando dañar la flora presente cuando se realizó la toma de la misma. La muestra a enviar son trozos de tejido afectado y tejido sano, exudados pleural, peritoneal, orina y sangre refrigerados entre + 4° y - 8°C para diagnóstico bacteriológico. En el caso de los tejidos también pueden ir en formol al 10% para histopatología (Sterne y Batty, 1978; Quinn y col. 1994; Popoff y Bouvet, 2009).

##### **4.2. Procesamiento en el laboratorio:**

###### **4.2.1. Siembra y aislamiento:**

El diagnóstico exige una gama de medios que aseguren un crecimiento satisfactorio y la producción de toxinas en cantidad suficiente para poder hacer las tipificaciones que sean necesarias. El éxito depende en gran parte de la forma en que sean utilizados los medios y de alcanzar un ambiente anaerobio y reductor adecuado. Para la recuperación de bacterias del género *Clostridium* a partir de muestras clínicas se pueden utilizar medios de cultivo nutritivos sólidos con el agregado de sangre. Es conveniente incluir un medio con yema de huevo para investigar la producción de lipasa y lecitinasa, y un medio líquido de enriquecimiento, como el Cooked meat. La temperatura de incubación es de 37°C, en anaerobiosis. (Sterne y Batty, 1978; Quinn y col. 1994; Popoff y Bouvet, 2009).

###### **4.2.2. Pruebas bioquímicas:**

Para la identificación de bacterias anaerobias, no solo es suficiente la citomorfología, sino también su patrón metabólico, es decir de su capacidad para fermentar de ciertos azúcares, producción de algunos metabolitos, hidrólisis de



algunos compuestos como esculina o la determinación del perfil de ácidos grasos producidos como producto final de la fermentación de la glucosa. Cada bacteria o grupo de bacterias tiene un perfil enzimático y por lo tanto su perfil de capacidad de comportamiento bioquímico lo que permite identificar usando tablas o cuadros que muestran el comportamiento de cada género y especie (García-Cano, 2003; Rodríguez-Cavallini y col. 2011).

Las comúnmente usadas para el género *Clostridium* son la determinación de lecitinasas y lipasas en yema de huevo, hidrólisis de gelatina, digestión de la leche, producción de indol y fermentación de carbohidratos (Martínez, 2011; Rodríguez-Cavallini y col. 2011).

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas de los Clostridios.

Especie	Glucosa	Maltosa	Lactosa	Salicilina	H <sub>2</sub> S	Gelatina	Indol	Leche
<b>C. haemolyticum</b>	+	-	-	-	+	+	+	Acidificada
<b>C. tetani</b>	-	-	-	-	+/-	-	-	Sin cambio
<b>C. perfringens</b>	+	+	+	-	+	+	-	Muy fermentada
<b>C. novyi tipo B</b>	+	+	+	-	+	-	-	Digerida
<b>C. chauvoei</b>	+	+	+	-	+	+	-	Acidificada
<b>C. botulinum</b>	+	+	-	-	+	+	-	Acidificada
<b>C. septicum</b>	+	+	+	+	+	+	-	Acidificada

Fuente: Holt, J. y col. (2000).

#### 4.2.3. Técnica de inmunofluorescencia:

La inmunofluorescencia es un proceso en el cual unos colorantes llamados fluorocromos se exponen a la luz UV, violeta o azul, para provocar en ellos fluorescencia y que emitan una luz visible. Dichos fluorocromos se pueden unir a moléculas de anticuerpos sin modificar la capacidad del mismo de unirse a un antígeno específico (inmunofluorescencia indirecta), y también se pueden unir a antígenos, llamado inmunofluorescencia directa (Prescott LM, y col., 2000).

Para identificar al *Clostridium haemolyticum*, así como otros clostridios de forma rápida y segura se puede utilizar la técnica de Inmunofluorescencia directa.

#### 4.2.4. PCR:

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de biología molecular que tiene como objetivo amplificar cantidades muy pequeñas de ADN específico y proporcionar material suficiente para secuenciar o clonar el fragmento con

precisión mediante técnicas estándar, con el fin de poder identificar con alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, detección de enfermedades genéticas y en medicina forense, entre otros. Las pruebas son rápidas, sensibles y específicas (Prescott LM, y col., 2000).

#### 4.2.5. Inmunohistoquímica:

La técnica de inmunohistoquímica se basa en la detección de los microorganismos y toxinas en cortes de tejidos con anticuerpos específicos, y brinda también un diagnóstico definitivo (Uzal, 2010).

### 5. Inmunoprofilaxis y métodos de control

La ubicuidad de estos microorganismos y la residencia en determinados tractos o aparatos de muchas especies de animales, implican que su erradicación sea prácticamente imposible. Se deben adoptar medidas de manejo y programas de inmunización activa para prevenir las diversas enfermedades que producen tanto en animales como en el hombre. El empleo de vacunas múltiples se ha convertido en una práctica habitual en producción animal. Éstas vacunas, debidamente elaboradas resultan sumamente eficaces y son recomendables justificando la inversión que su empleo representa (Carloni, G., 2007).

Las enfermedades provocadas por Clostridios, todas pueden ser prevenidas por inmunoprofilaxis, vacunas, antisueros o combinación de ambos (Sterne y Batty, 1978).

### 6. CLOSTRIDIOSIS EN EL URUGUAY:

La mayoría de las enfermedades clostridiales que afectan a bovinos y ovinos fueron identificadas en nuestro país. En el siguiente cuadro se muestran en detalle los agentes que fueron aislados en Uruguay.

Cuadro 3. Enfermedades Clostridiales diagnosticadas en Uruguay.

ENFERMEDAD	AGENTE ETIOLOGICO	AISLAMIENTO Y/O IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE	ESPECIE	OCURRENCIA EN URUGUAY
Mancha	<i>Clostridium chauvoei</i>	Dr.Casas Olascoaga, 1961- Dr.Leaniz, 1964	Bovino 6 meses - 2 años	XXXX
Gangrena gaseosa	<i>Clostridium chauvoei</i>	Dr.Casas Olascoaga, 1961-Dr.Leaniz, 1964	Bovino - ovino	XXXX
	<i>Clostridium septicum</i>	Dr.Casas Olascoaga, 1961- Dr.Leaniz, 1964	Bovino - ovino	XX
	<i>Clostridium sordellii</i>	Dr.Quiñones - 1992	Bovino	X
	<i>Clostridium perfringens</i> tipo A	Dr.Leaniz, 1964	Bovino	X

ENFERMEDAD	AGENTE ETIOLOGICO	AISLAMIENTO IDENTIFICACIÓN AGENTE	Y/O DEL	ESPECIE	OCURRENCIA EN URUGUAY
Mancha	<i>Clostridium chauvoei</i>	Dr.Casas Olascoaga, 1961 Dr.Leaniz, 1964	1961-	Bovino 6 meses -2 años	XXXX
Gangrena gaseosa	<i>Clostridium chauvoei</i>	Dr.Casas Olascoaga, 1961 Dr.Leaniz, 1964	1961-	Bovino ovino	XXXX
	<i>Clostridium septicum</i>	Dr.Casas Olascoaga, 1961 Dr.Leaniz, 1964	1961-	Bovino ovino	XX
	<i>Clostridium sordellii</i>	Dr.Quiñones - 1992		Bovino	X
	<i>Clostridium perfringens</i> tipo A	Dr.Leaniz, 1964		Bovino	X
Enterotoxemias	<i>Clostridium perfringens</i> tipo A	Dres.Cattáneo-Bermúdez,2013		Ovino	X
		Dres.Cattáneo–Dutra-Bermúdez, 2013*		Bovino	X
	<i>Clostridium perfringens</i> tipo B	Dres.Cattáneo–Bermúdez, 2013		Bovino	X
	<i>Clostridium perfringens</i> tipo C	Beta toxina positivo (sin publicar)			
	<i>Clostridium perfringens</i> tipo D	Dr.Casas Olascoaga, 1961 Dr.Leaniz, 1964	1961-	Ovino	XXXX
	<i>Clostridium sordellii</i>	Dr.Bermúdez, 1997 (sin publicar)		Bovino	X
Hepatitis necrótica	<i>Clostridium novyi</i> tipo B	Dr.Casas Olascoaga, 1961 Dr.Leaniz, 1964	1961-	Ovino	XX
Hemoglobinuria Bacilar	<i>Clostridium haemolyticum</i>	Dres.Perdomo – Carreto, 1984		Bovino	XX
Tétanos	<i>Clostridium tetani</i>	Dr.Bermúdez, 1981 (sin publicar) (clínica e identificación de toxina)		Bovino	X
	<i>Clostridium tetani</i>	Dr.Bermúdez, 1981 (clínica e identificación de la toxina)		Ovino	XXXX
Botulismo	<i>Clostridium botulinum</i> tipo D	Dr.Bermúdez, (clínica y presencia de toxina)		Bovino	XX

Fuente: Bermúdez y Cattáneo, 2013. Comunicación personal.

\*Caso de yeyunitis hemorrágica en bovino (primera identificación).

XXXX: MUY FRECUENTE; XXX: MEDIANAMENTE FRECUENTE ; XX: POCO FRECUENTE; X: ESPORÁDICO

Desde el punto de vista legal no es obligatoria la vacunación contra las clostridiosis en nuestro país, pero un Decreto del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) de julio del 2012, hace referencia al control sanitario de los campos de recría, en donde especifica que dentro de los primeros 30 días del ingreso de los animales a dicho establecimiento, el veterinario de libre ejercicio debe realizar la vacunación contra Carunco sintomático, así como revacunar una vez al año a todo el rodeo bovino susceptible, y el egreso de estos con el certificado extendido por el veterinario de libre ejercicio que ha de constatar dicha vacunación (MGAP, 2012).

En el siguiente cuadro se exponen las vacunas clostridiales registradas en el MGAP, las cuales cumplen los requisitos de inocuidad y potencia, para prevenir las enfermedades clostridiales que se diagnosticaron en el país y están presentes.

Cuadro 4. Vacunas clostridiales registradas en nuestro país.

Laboratorio	Nombre	Composición	Adyuvante	Estado	Dosis	Vía	Especie
Bayer	BAY BAC VISION MC	<i>Bacillus anthracis</i> y <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	2mL	SC	Bovinos, ovinos y caprinos
	BAY BAC VISION EMG PLUS	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B y <i>D</i> , <i>perfringens</i> D	Acuoso	Inactivada	5mL 2mL	SC SC	Bovinos Ovinos y caprinos
Biogénesis	BIOCLOSTRIGEN J5	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>perfringens</i> C y <i>D</i> , <i>E. coli</i> J5	Acuoso	Inactivada	5mL 2mL	SC SC	Bovinos Ovinos
	POLICLOSTRIGEN N	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B, <i>perfringens</i> C y <i>D</i> , <i>sordellii</i> , <i>haemolyticum</i> y <i>E. coli</i> J5	Acuoso	Inactivada	5mL 3mL	SC SC	Bovinos Ovinos
Hipra-Invet	TOXIPRA-S7	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> , <i>perfringens</i> B, C y <i>D</i> , <i>sordellii</i>	Oleosa	Inactivada	4mL	SC	Bovinos
					2mL	SC	Ovinos
Merial	SINTOXAN 9th	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B, <i>perfringens</i> B y <i>D</i> , <i>sordellii</i> , <i>haemolyticum</i> y <i>tetani</i>	Acuoso	Inactivada	3mL	SC	Bovinos, caprinos y ovinos
	ULTRAVAC	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B, <i>perfringens</i> D	Acuoso	Inactivada	4mL 2mL	SC SC	Bovinos Caprinos y ovinos
Microsules	CLOSTRIDIAL H+HEMOGLOBINURIA	<i>Clostridium haemolyticum</i>	Doble emulsión	Inactivada	-	-	Bovinos

Nutritex	CARBUMAN	<i>Bacillus anthracis</i> y <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	-	SC	Bovinos, ovinos y suinos
	MANCHA Y GANGRENA GASEOSA PLUS	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi B.</i>	-	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
Pfizer	ULTRACHOICE 8	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi, perfringens C y D, sordellii, haemolyticum</i>	Acuoso	Inactivada	2mL	SC	Bovinos
					1mL	SC	Ovinos
Rosenbusch	BACTERINA HEMOGLOBINUR IABACILAR	<i>Clostridium haemolyticum</i>	Acuoso	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
	IR9	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi A, B y D perfringens B, C y D,</i>	Acuoso	Inactivada	-	-	Bovinos, caprinos y ovinos
	MANCHA, GANGRENA GASEOSA Y ENTEROTOXEMIA	<i>Clostridium chauvoei, septicum, perfringens C y D</i>	Acuoso	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
Santa Elena	DUPLEX	<i>Bacillus anthracis</i> y <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	2mL	SC	Bovinos y suinos
					1mL	SC	Ovinos
	CLOSTRISAN	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi B, perfringens D, sordellii, haemolyticum</i>	Acuoso	Inactivada	4mL	SC	Bovinos
					2mL	SC	Caprinos y ovinos
	CLOSTRISAN 9+T	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi B, perfringens A, B, C y D, sordellii, haemolyticum y tetani</i>	Acuoso	Inactivada	5mL	SC	Bovinos
					2mL	SC	Caprinos y ovinos
	CLOSTRISAN Aduvac	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi B, perfringens D, sordellii, haemolyticum</i>	Oleoso	Inactivada	4mL	SC	Bovinos
CLOSTRISAN T	<i>Clostridium chauvoei, septicum, novyi B, perfringens D, sordellii, haemolyticum y tetani</i>	Acuoso	Inactivada	4mL	SC	Bovinos	
				2mL	SC	Caprinos y ovinos	
TETANIC	<i>Clostridium tetani</i>	Acuoso	Inactivada	3mL	SC	Bovinos	
				2mL	SC	Caprinos y ovinos	
Uruguay	CARMANVET	<i>Bacillus anthracis</i> y <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	-	-	Bovinos, caprinos, ovinos y suinos
	POLIVET	Mancha, gangrena gaseosa y otras clostridiosis	-	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
	TETANIVET	<i>Clostridium tetani</i>	Acuoso	Inactivada	-	SC	Bovinos, caprinos y ovinos

Fuente: Vademécum de especialidades veterinarias, 2014.

## 7. INTRODUCCIÓN AL CASO DE ESTUDIO

La Hemoglobinuria bacilar es una enfermedad infecciosa aguda, toxémica, altamente fatal, producida por el *Clostridium haemolyticum*, que afecta al ganado bovino, y ocasionalmente al ovino. Dicha bacteria es transmitida por el suelo, y en condiciones de hipoxia produce múltiples zonas necróticas en el hígado y una potente exotoxina hemolítica. La enfermedad se caracteriza por presentar fiebre alta, hemoglobinuria, rápida muerte e infartos en el hígado (Gillespie JH y Timoney JF., 1981).

### 7.1. Agente etiológico: *Clostridium haemolyticum*

#### 7.1.1. Clasificación y morfología:

Phylum: Firmicutes; Clase: Clostridia; Orden: Clostridiales; Familia: Clostridiaceae; Género: Clostridium; Especie: haemolyticum.

Las bacterias tienen forma de bastón, sus dimensiones son de 0,3-2,0  $\mu\text{m}$ , y con frecuencia están dispuestos en pares o en cadenas cortas, con extremos redondeados o a veces puntiagudos. Comúnmente son pleomórficos. Generalmente tienen tinción de Gram positiva en los cultivos jóvenes, y son móviles por sus flagelos peritricos. Forman endosporas ovales o esféricas que por lo general distienden la célula. La mayoría de las especies son quimioorganotrofas; algunos son quimioautotróficos o quimioorganotróficos también. Puede ser sacarolíticos, proteolíticos, ninguno o ambos. Por lo general se producen mezclas de ácidos orgánicos y alcoholes a partir de hidratos de carbono o peptonas. Tiene como condición para su desarrollo un medio anaerobio, si ocurre crecimiento en el aire, es escaso y la esporulación es inhibida. Metabólicamente son muy diversos, con la temperatura óptima de 10 a 65°C. El *Clostridium haemolyticum* produce exotoxinas potentes que son patogénicas para los animales (Holt J. y col. 2000).

#### 7.1.2. Características del cultivo:

Las colonias incluidas en el medio de cultivo son lenticulares al principio, después se convierten en rizoides. Se forma poco o nada de gas a menos que se añada al medio un azúcar fermentescible. Cuando la sangre está presente es hemolizada rápidamente. La gelatina se licúa en 2 a 4 días. El medio de suero y huevo coagulado no son reblandecidos ni licuados. El medio de carne cocida y el medio de cerebro producen un buen crecimiento, pero no hay digestión de los sólidos y ni ennegrecimiento, a menos que se añadan sales de hierro, con lo cual se desencadena un ennegrecimiento ligero. Estos cultivos no alteran la leche, y los únicos azúcares que son fermentados son la glucosa y la levulosa, que son activamente destruidos al formarse ácido y gas. En los medios que contienen

proteosa-peptona y en el medio de hígado se forman grandes cantidades de ácido sulfhídrico. Las pruebas del rojo de metilo y de Voges-Proskauer son negativas, y los nitratos no son reducidos. Forman indol en grandes cantidades. Este microorganismo es muy estricto en sus requerimientos de desarrollo, necesita buenas condiciones anaeróbicas y el medio debe contener triptófano para obtener un crecimiento óptimo con formación de la toxina (Gillespie JH y Timoney JF., 1981).

## **7.2. La enfermedad Hemoglobinuria bacilar:**

La enfermedad se presenta preferentemente en verano y otoño, en regiones bajas y húmedas, de forma esporádica, siendo infecciosa pero no contagiosa. La infección se produce por la ingestión de esporas latentes, que son muy resistentes al ambiente externo y pueden sobrevivir fuera del animal durante muchos años (Jasmin AM, 1947).

Las esporas del *Clostridium haemolyticum* son ingeridas con alimentos contaminados y en el intestino atraviesan la pared intestinal, pasando a la circulación portal a través de la cual llegan al hígado. En este órgano circulan por los capilares hepáticos y algunas de las esporas son fagocitadas por los macrófagos tisulares o células de Kupffer donde permanecen, a veces por años, hasta que se desencadenan las condiciones necesarias para la germinación y posterior producción de toxinas (Uzal, 2008).

Su ocurrencia está dada después de algún daño tisular hepático, en mucho de los casos como consecuencia de la infestación masiva de *Fasciola hepática*, pero no siempre se debe a esa causa predisponente. También puede ser iniciado por la invasión al hígado por *Cysticercus tenuicollis*, biopsias hepáticas con fines experimentales o evaluaciones del estado nutricional, dosificación con tetracloruro de carbono, telangiectasias, alteraciones metabólicas que resultan en una disminución de la perfusión del hígado, o por otras diversas causas de lesiones hepáticas focales. Una causa sugerida en ganado de feedlot es necrosis hepática debido a la infección por *Fusobacterium necrophorum* secundaria a ruminitis (Smith LDS., 1957; Hreczko I. 1959; Olander HJ y col. 1968; van Kampen KR y Kennedy PC., 1968; Janzed ED y col. 1981).

La Hemoglobinuria bacilar es muy rara en los terneros menores de un año de edad y en el ganado bovino en mal estado. La mayoría de los casos ocurren en los animales adultos, especialmente aquellos en buenas condiciones o los recientemente introducidos en una pastura infectada. Su patogenia y sintomatología es similar a la de la hepatitis necrótica, apareciendo ictericia, anemia y hemoglobinuria (Olander HJ y col. 1968).

Al igual que otras especies del género *Clostridium*, gran parte de la patogenicidad de *C. haemolyticum* es atribuida a la producción de exotoxinas

biológicamente activas. El *Clostridium haemolyticum* produce distintas toxinas siendo la  $\beta$  toxina responsable de su patogenicidad, causando la necrosis de los hepatocitos, lisis de los eritrocitos, y dañando al endotelio capilar que conduce a la hemoglobinuria y fluidos vasculares en tejidos y cavidades serosas. La muerte ocurre generalmente dentro de 24 a 36 horas de la aparición de la enfermedad clínica y se cree que es causada por anoxia, como resultado de la destrucción de los eritrocitos (Smith LD., 1975).

El desarrollo de un trombo organizado en una rama sub - terminal de la vena porta produce un gran infarto isquémico que caracteriza la enfermedad. La mayoría de las bacterias se alojan en este infarto, y en condiciones anaeróbicas liberan sistemáticamente la toxina  $\beta$  necrotóxica y hemolítica, que causa toxemia, lesión vascular generalizada y hemólisis intravascular (Radostits, 2002).

Los animales que pastan pueden encontrarse muertos sin antes haberse observado signos clínicos. A menudo se produce una aparición repentina con cese de la rumia, la lactación, la defecación y anorexia. El dolor abdominal se manifiesta por la reticencia a moverse y por una postura con el dorso curvado. La respiración es superficial y el pulso débil y rápido. En las primeras fases la temperatura es de 40 a 41°C, para luego descender a valores subnormales antes de la muerte. Tras el cese inicial de la defecación, las heces se vuelven profundamente oscuras, con mucho moco y sangre, pero la ictericia nunca es muy marcada debido a que la hemólisis comienza de repente y progresa rápidamente. La anemia es severa. La orina es de color rojo oscuro y espumosa. Las vacas preñadas a menudo abortan. Se observa una severa disnea antes de que se produzca la muerte. La combinación de la anoxia causada por la destrucción de los eritrocitos y toxemia a causa de las exotoxinas clostridiales, eventualmente resultan en la muerte. La mortalidad es del 95% en los animales no tratados (Erwin BG., 1977; Gillespie JH y Timoney JF., 1981; Radostits, 2002).

El rigor mortis se desarrolla rápidamente. La base del periné presenta orina y heces sanguinolentas. El edema gelatinoso subcutáneo, que tiende a volverse crepitante en pocas horas, y las Petequias extensas o hemorragias difusas en el tejido subcutáneo son características en este trastorno. Se observa gran cantidad de líquido, que varía de claro a sanguinolento y turbio en las cavidades pleural, pericárdica y peritoneal. La sangre es líquida y coagula lentamente. Las hemorragias subserosas generalizadas también están presentes, al igual que debajo del endocardio (Jubb KVF y Kennedy PC., 1963; Erwin BG., 1977; Janzen ED y col. 1981; Radostits, 2002).

Lo más característico es la aparición de aérea necrótica en el hígado, de 5 a 20 cm de diámetro, que suele estar rodeada por una zona enrojecida de hemólisis. Presenta una hemólisis extensa con extravasación abundante de sangre hemolizada al tracto intestinal, especialmente al intestino grueso. La hemoglobinuria es obvia y manifiesta. El germen causal está presente en gran



número en el foco necrótico; por lo que la presencia de bacilos grandes Gram positivos, junto al aspecto característico post mortem hacen que el diagnóstico inicial sea bastante fácil. Este se puede confirmar por tinción fluorescente específica o por presencia de lecitinasa específica  $\beta$  en exudados o extracto de hígado (Sterne y Batty, 1978, Radostits, 2002).

### **7.3. Diagnóstico de Hemoglobinuria bacilar:**

Es de suma importancia realizar un correcto diagnóstico de la enfermedad en cuestión de forma de ejecutar una adecuada profilaxis en el resto del rebaño tan pronto sea posible. Para esto es necesario contar con una anamnesis detallada, un examen sistemático del animal, un examen objetivo particular, una descripción concisa de los hechos patológicos más destacados, la selección de muestras apropiadas, adecuadamente protegidas y empaquetadas, plantearse un diagnóstico diferencial y por último la investigación en el laboratorio, de forma que la suma de todos estos resultados nos proporcione el diagnóstico definitivo de la enfermedad.

Las muestras a enviar a laboratorio para realizar el diagnóstico son: porciones de focos necróticos del hígado, cortes de segmentos de las zonas afectadas del intestino delgado, muestras de derrames y de orina, y frotis secados al aire de los focos necróticos del hígado. Las técnicas utilizadas en el laboratorio son: tinción (con los frotis con tinción de Gram y también con antisueros específicos marcados con fluorocromos), también se realiza investigación toxicológica e inmunológica, mediante la presencia de lecitinasa específica  $\beta$  de *Clostridium novyi*; otra herramienta utilizada es la inoculación de animales y la investigación por cultivo (el *C. haemolyticum* es muy difícil de cultivar debido a que es necesario conseguir una anaerobiosis estricta).

Un diagnóstico de Hemoglobinuria bacilar es concluyente si el aspecto post-mortem o el cuadro clínico son los característicos de la enfermedad y aparecen en los frotis de los focos necróticos del hígado, en la sangre, orina o heces de un animal vivo, un gran número de gérmenes se tiñan específicamente con antisuero marcado con fluorocromos; si se detecta la presencia de lecitinasa  $\beta$  (toxina) en las zonas infartadas de hígado, o si se aíslan cepas virulentas de *Clostridium haemolyticum* en las áreas necróticas características del hígado. Debido a que el poder patógeno de las distintas cepas del *Clostridium haemolyticum* es muy variable, no debe hacerse un diagnóstico de Hemoglobinuria bacilar basado en la localización en frotis de hígado teñidos con tinciones específicas o en el aislamiento del germen por cultivo, sino que además es necesario constatar que el animal del cual proceden las muestras efectivamente ha presentado los síntomas y el cuadro post-mortem es característico de Hemoglobinuria bacilar; así como también que los gérmenes aislados son toxigénicos y virulentos para los animales de laboratorio (Sterne y

Batti, 1978)

#### **7.4. Diagnóstico diferencial:**

El diagnóstico de la Hemoglobinuria bacilar consiste en diferenciar este proceso de otras enfermedades en las cuales la hemoglobinuria, la mioglobinuria y la hematuria son los signos principales. En los animales encontrados muertos puede ser necesario diferenciar esta enfermedad de otras causadas por clostridios y del carbunco (Radostits, 2002).

Entre los diferenciales más importantes se destacan: la leptospirosis aguda; la hemoglobinuria posparto; la hematuria enzoótica; la babesiosis y la anaplasmosis; el carbunco bacteridiano; otras clostridiosis como la hepatitis infecciosa necrosante, el botulismo, la mancha y gangrena gaseosa; el meteorismo; la fasciolosis aguda, así como distintas plantas tóxicas que cursen con muerte súbita, las cuales se detallan a continuación:

Leptospirosis: es producida por la bacteria *Leptospira interrogans*, la cual presenta muchas serovariedades distintas, siendo la forma aguda de la enfermedad diferencial de Hemoglobinuria bacilar, produciéndose signos de endotoxemia como hemorragias, hepatitis, nefritis y meningitis, lo que desencadena una muerte súbita en terneros, observándose aborto en animales adultos (Radostits, 2002).

Hemoglobinuria posparto: es una enfermedad que se presenta en vacas durante el puerperio. Se asocia a un desbalance metabólico esporádico que se presenta habitualmente en vacas de producción lechera, manifestándose dentro de las 6 semanas posparto. Se relaciona al rápido incremento de la producción de leche durante el inicio de la lactancia. Caracterizada por una anemia aguda regenerativa por hemólisis intravascular cursando con hemoglobinuria. La Hemoglobinuria bacilar se presenta en cualquier época y no está solo asociada a las primeras semanas post parto (Noro M y Wittwer F., 2011).

Hematuria enzoótica: enfermedad crónica no infecciosa de los bóvidos, caracterizada por el desarrollo de lesiones hemangiomatosas de la pared de la vejiga urinaria, y clínicamente por hematuria intermitente y muerte por anemia. La Hemoglobinuria bacilar cursa con hemoglobinuria a diferencia de la hematuria enzoótica que se presenta con hematuria precisando evidenciar la presencia de hemoglobina o de eritrocitos en orina para su diferencial (Radostits, 2002).

Anaplasmosis y Babesiosis: La babesiosis es causada por el protozoario *Babesia bovis* y *B. bigemina* y la anaplasmosis es producida por la rickettsia *Anaplasma marginale*. Estos agentes son transmitidos por la garrapata *Boophilus microplus*, enfermedad relacionada con dicho vector. Una de las alteraciones más frecuentes observada por dicha afección es la hemoglobinuria, siendo esta diferencial de la Hemoglobinuria bacilar. La babesiosis también posee signos

nerviosos y fiebre de 41 °C. (Mangold A.J. y Mastropaolo M. 2013; Riet-Correa, F. y col., 2007).

Carbunco bacteridiano: ésta enfermedad es producida por el *Bacillus anthracis*, afectando al ganado vacuno, ovino, cerdos y caballos. En bovinos y ovinos se producen dos formas de la enfermedad, la hiperaguda y la aguda. Los animales se suelen encontrar muertos sin signos premonitorios, con un curso de 1 a 2 horas, aunque pueden observarse fiebre, temblores musculares, disnea y congestión de la mucosa. Después de la muerte son frecuentes las secreciones sanguinolentas por orificios nasales, la boca, el ano y la vulva, siendo un importante diferencial de Hemoglobinuria bacilar (Radostits, 2002).

Hepatitis infecciosa necrosante producida por el *Cl. novyi tipo B* es una enfermedad que se presenta generalmente en ovinos, mientras que la Hemoglobinuria bacilar producida por el *Cl. novyi tipo D* es generalmente una enfermedad de los bovinos. Sin embargo, ambas pueden producirse en las dos especies. Las mismas son de curso agudo y sobreagudo, produciéndose la muerte en menos de 24 horas (Uzal, 2013).

Botulismo: el agente etiológico es el *C. botulinum*. Es una toxiinfección exógena caracterizada por parálisis flácida. En bovinos la afección se manifiesta en forma endémica. Las especies más afectadas son bovinos, secundariamente equinos, porcinos y ovinos. Hay marcada incoordinación del tren posterior, parálisis deglutoria y lingual, desencadenándose la muerte. Es una enfermedad de carácter agudo (Robles, 1998).

Mancha y gangrena gaseosa: la mancha es producida por el *C. chauvoei* solamente, mientras que la gangrena gaseosa puede ser producida por uno o más de los siguientes microorganismos: *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. perfingens* y *C. histolyticum*. El curso de ambas enfermedades puede ser agudo o subagudo, durando entre 6 y 24 horas. Cuando el curso es agudo no se llegan a observar signos clínicos, de lo contrario cuando el curso es subagudo hay fiebre, decaimiento, y claudicación si están afectados los miembros. En las zonas con lesiones se observa tumefacción debido al edema subcutáneo y crepitación por la formación de burbujas de gas por los microorganismos actuantes (Uzal, 2010).

Meteorismo: a los animales que se encuentran muertos por meteorismo agudo se observa marcada distensión abdominal y corrimientos serosanguinolentos por todos los orificios corporales, siendo también diferencial del Carbunco bacteridiano. En caso de duda se debe recurrir a exámenes de laboratorio antes de realizar la necropsia del animal. Tan solo por ser una muerte súbita ya es diferencial de Hemoglobinuria bacilar, macroscópicamente se podría evidenciar en el caso de meteorismo, la marca esofágica, isquemia de los miembros posteriores y a la necropsia ausencia infartos en el hígado (Radostits, 2002).

Fasciola hepática: inflamación del hígado y conductos biliares frecuentemente de carácter crónico pero clínicamente puede presentar formas agudas y subagudas relacionadas a la época del año. Afecta principalmente a animales jóvenes, causando hepatitis aguda, aumento del volumen e hiperemia del hígado y pequeñas hemorragias debajo de su cápsula. En casos agudos y subagudos puede llegar a muerte súbita. (Hutyra F. Y col., 1968).

Plantas tóxicas: citamos como ejemplo la intoxicación con mio-mio (*Baccharis coridifolia*) que causa un cuadro agudo, en casos fatales en bovinos y ovinos los signos clínicos se inician entre 5 a 29 horas después de la ingestión de la planta verde y la muerte ocurre entre 3 a 34 horas de iniciados los signos clínicos. Los animales presentan lesiones en aparato digestivo, principalmente en tracto gastrointestinal, con hiperemia, edema y erosiones en la mucosa del rumen y retículo, así como también en abomaso e intestino delgado. El hígado puede estar color amarillento, con una acentuación del patrón lobular. Como las alteraciones de necropsia e histopatológicas encontradas no son específicas, se debe basar el diagnóstico en los signos clínicos y principalmente en los datos epidemiológicos (Riet Correa, F. y col. 1991).

#### **7.5. Situación de la enfermedad a nivel mundial, regional y de Uruguay:**

Es una enfermedad de presentación mundial, de baja ocurrencia, pero cuando se presenta puede producir pérdidas por muerte de entre un 3 y un 25%.

La enfermedad fue reportada por primera vez en California, EEUU en 1916 y luego fue descripta en otras partes del mundo. Es por eso, que podemos decir que esta enfermedad tiene distribución mundial, concentrándose en zonas húmedas y tierras bajas con suelos y aguas predominantemente alcalinos (Shinozuka, Y. y col. 2011).

Fueron descriptos casos en el Oeste de EEUU, Canadá, a lo largo del golfo de México, Sudáfrica, Nueva Zelanda, Australia, India, Gran Bretaña, Japón y Hungría entre otros (Stampfli, H.R., 2014).

En la región su distribución también es amplia, apareciendo casos en Venezuela, Perú, Chile, Argentina y Brasil.

Tan solo en Argentina se han descripto varios casos en la cuenca del "Salado" en donde según la bibliografía comenzó a aparecer con más asiduidad y con algunas características distintas a lo que serían los casos clásicos de Hemoglobinuria bacilar (Cantón, G., Ramos, F., 2009).

En Brasil durante la década del 60 fue relatado un brote en la zona de Rio Grande del Sur, en la región del litoral norte del estado donde ocurrió la muerte de 2500 bovinos por causa de esta enfermedad (Guerreiro y col.1962) y donde siguen apareciendo brotes esporádicos hasta la fecha.

Antecedentes en el Uruguay: como indicamos anteriormente, los primeros aislamientos de *Clostridium haemolyticum* en bovinos fueron realizados por Perdomo-Carreto en el año 1984 (Bermúdez J. y Cattáneo, M.; 2013. Comunicación personal).

Esta enfermedad es una de las clostridiosis más importante en bovinos adultos (> 2 años) en la zona este, existiendo registros en departamentos como Cerro Largo, Rocha, Treinta y tres y Lavalleja. Como ya hemos mencionado anteriormente, el *Clostridium haemolyticum* es una bacteria anaerobia y sus esporas sobreviven hasta 2 años en cadáveres y suelos. Cuando éstas son ingeridas por animales permanecen latentes por meses dentro de las células de Kupffer, por lo que la probabilidad de infección sea más alta en ésta zona. Con el fin de nombrar alguno de los antecedentes de la enfermedad en el país, y que fueron debidamente registrados, utilizamos material del Archivo Veterinario del Este, perteneciente a la División de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

En el año 2009 se registraron dos focos de Hemoglobinuria bacilar en vacas adultas. Uno de los focos ocurrió en un predio ganadero del paraje Olimar chico en la 7ª sección de Treinta y tres, donde la enfermedad ya había sido diagnosticada por laboratorio en diciembre del 2005 y se había podido controlar mediante un plan de vacunación adecuado. En una interrupción de la vacunación, de un lote de 200 vacas Hereford adultas murieron 7 animales sin mostrar previamente sintomatología alguna, en un plazo de 10 a 15 días. La necropsia mostró una patología e histopatología compatible con Hemoglobinuria bacilar. El otro foco ocurrió en un predio forestal del paraje Manguera azul en la 5ta sección de Lavalleja. Murieron 5 de 500 vacas adultas de raza carnífera. Las vacas se encontraban muertas en goteo desde octubre. Tanto las lesiones macroscópicas e histológicas resultaron ser patognomónicas de la patología en cuestión (Dutra, F. 2009).

Un brote de Hemoglobinuria bacilar se diagnosticó en el mes de noviembre del año 2010, en un predio ganadero de la 9ª sección de Lavalleja, en el paraje Retamosa. En un lote de 40 vacas Normando y Hereford de primera cría, de 4 dientes, con ternero al pie, se encontraron en un plazo de 20 días 3 animales muertos, sin signos clínicos previos. Sólo se afectaron las vacas, que no tenían vacunación previa. Se realizó la necropsia a la última vaca muerta y tanto las lesiones macroscópicas como microscópicas eran patognomónicas de Hemoglobinuria bacilar. Según datos publicados en el Archivo Veterinario de Este, ésta enfermedad es muy común en la zona Este, con un patrón geográfico (incluso a nivel de potrero), estacional y animal muy marcado, con un rango de ocurrencia de setiembre a marzo, siendo los meses pico en noviembre y diciembre (Dutra, F. 2011, a).

Otro diagnóstico se realizó en mayo del año 2011, en un novillo de raza Hereford, de 2 a 3 años de edad el cual se encontraba en un lote de 12 animales

provenientes de un predio ganadero de la 9ª sección de Cerro Largo, paraje Pablo Páez, dicha tropa ingresaba para faena en un frigorífico de la zona. Los animales no presentaron particularidades a la inspección ante-mortem pero al otro día uno de ellos presentaba sintomatología clínica de la enfermedad en cuestión, el cual murió por lo que se procedió a realizar la necropsia en faena de emergencia constatándose lesiones macroscópicas como microscópicas patognomónicas de Hemoglobinuria bacilar. Se hizo contacto telefónico con el veterinario y el propietario de los animales los cuales informaron que en dos o tres potreros sucedían muertes esporádicas de causa desconocida, aproximadamente unas 15 reses adultas al año, y la vacuna que se utilizaba no incluía al *Clostridium haemolyticum*.(Dutra, F.2011, b).

Un severo brote de Hemoglobinuria bacilar se diagnosticó en el mes de mayo del año 2012, en un predio ganadero de la 9ª sección de Rocha, paraje Cañada grande. En un potrero de 250 hectáreas ocurrieron 16 muertes desde el comienzo de dicho año, de un total de 160 vacas adultas. El predio presentaba diagnóstico de Hemoglobinuria bacilar desde el año 2003 y desde entonces se han utilizado distintas vacunas de *Clostridium haemolyticum*. A uno de los animales que presentaba sintomatología clínica se le practicó la necropsia, el cual presentaba lesiones patognomónicas tanto a la patología como a la histopatología (Dutra, F. 2012, a).

En un predio ganadero en las serranías de la 6ta sección de Treinta y tres, en el paraje Rincón de Urtubey se diagnosticó un brote de la enfermedad en el mes de noviembre del año 2012. Los animales afectados fueron 2 vacas preñadas a término de un lote de 250 vacas de cría de raza Hereford, adultas. El primero de los animales fue encontrado muerto, y el segundo con sintomatología, el cual murió posteriormente de forma que se le realizó la necropsia, encontrándose lesiones macroscópicas y microscópicas características de Hemoglobinuria bacilar (Dutra, F. 2012, b).

Entre los meses de mayo y julio del año 2013 ocurrieron dos focos de Hemoglobinuria bacilar en Rocha y uno en el departamento de Treinta y tres. En el brote ocurrido en los meses de junio y julio en la 6ª sección de Treinta y tres, paraje Rincón de Urtubey, murieron 6 de 240 vacas adultas, preñadas, de raza Hereford, con muy buen estado corporal. En los 2 últimos años han muerto en el mismo potrero un total de 40 vacas adultas, excepto una vaquillona que murió en el potrero lindero (Dutra, F. 2013).

Los últimos casos registrados sucedieron en los departamentos de Treinta y Tres, Rivera, Cerro Largo y Tacuarembó afectando categorías adultas y jóvenes (Dutra, F. 2014).



Figura 1. Ubicación de los focos de Hemoglobinuria bacilar registrados en la zona este del país. Fuente: [www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Dilave.htm](http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Dilave.htm)

## 8. HIPÓTESIS

La hipótesis que se pretende develar en este estudio sería que la mortandad se debía a una infección por clostridios patógenos, especialmente una Hemoglobinuria bacilar debido al *Clostridium haemolyticum*.

## 9. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este estudio es la identificación de la causa de muerte aguda en bovinos en un establecimiento ubicado en el Departamento de Rocha.

### 9.1. Objetivos particulares

- 1) Descripción de la sintomatología clínica.
- 2) Descripción de la metodología de diagnóstico realizada.
- 3) Descripción de las medidas de control y profilaxis tomadas en este caso y de sus consecuencias.

## 10. ESTUDIO DEL BROTE

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 10.1. Predio en estudio

El estudio del caso se realizó en el establecimiento “Doña Chica”, propiedad del Ing. Agr. Diego Rodríguez, ubicado en el padrón 28391 de la 9ª sec. Policial del Departamento de Rocha.

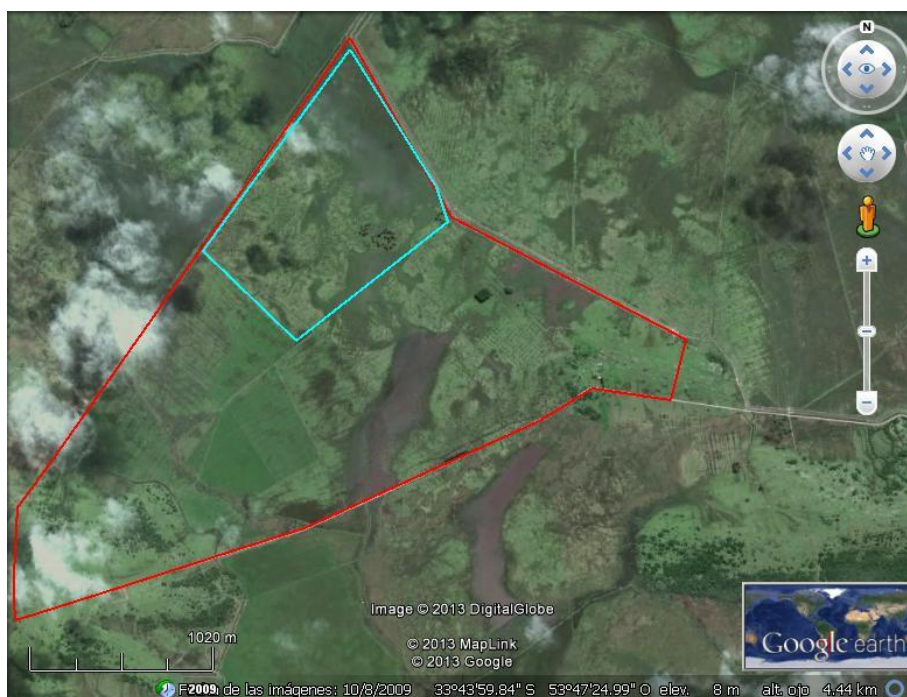


Figura 2. Visualización aérea del establecimiento “Doña Chica”. Fuente: Google earth

#### 10.2. Epidemiología

Los casos se presentan en un potrero de 250 hectáreas con aproximadamente 200 vacas, algunas ovejas y caballos. Con buena pastura para la época, campos de bañado con agua, suelo con poco drenaje.

En su mayor área sus suelos se corresponden con la clasificación 3.31 de suelos CONEAT. Son las llanuras bajas, inundadas varias semanas al año, que bordean las principales vías de drenaje del área. El relieve es plano pero presenta comúnmente un mesorrelieve fuerte. Los suelos son profundos, no diferenciados, pobremente drenados, de texturas variables. Se clasifican como Gleysoles Háplicos Melánicos y Gleysoles Lúvicos Melánicos Típicos, de



texturas limosas y limo arcillosas, (Gley húmicos). Asociados a ellos ocurren Fluvisoles (suelos Aluviales). El material geológico está formado por sedimentos aluviales de texturas variables. La vegetación es de pradera predominantemente estival y comunidades hidrófilas asociados. Este grupo integra las unidades India Muerta, Cebollatí y San Luis en la carta a escala 1:1.000.000

(D.S.F.). Índice de Productividad 53.

### 10.3. Motivo de consulta

Desde el año 2009 se presentan casos de muerte súbita, muriendo vacas de cría, Hereford de 4 a 6 dientes, con buen estado corporal, algunas amamantando no afectando terneros.



Figura 3. Cadáveres bovinos en zona inundable. Fuente: Dr. Aristimuño

#### 10.3.1. Antecedentes del caso

En otoño del año 2009 comenzaron muertes en goteo en el predio, y el veterinario actuante, el Dr. Carlos Aristimuño fue consultado por dicho caso, que en un principio fueron dos vacas adultas en buen estado que habían muerto de forma súbita. En tal oportunidad no se pudo realizar la necropsia de los animales ya que éstos presentaban un avanzado estado de descomposición. A pesar de que se vacunaba regularmente contra clostridiosis, el veterinario aconseja revacunar inmediatamente (vacuna A / B). Posteriormente se detecta en la misma zona,

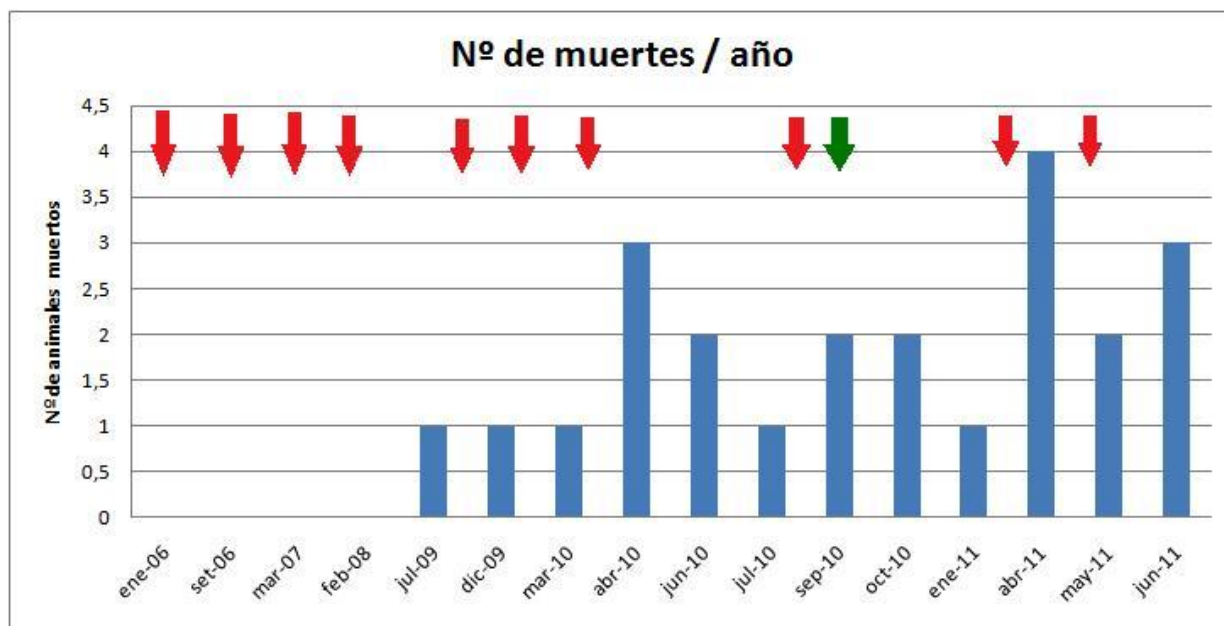
otra vaca muerta, y al concurrir al predio se observa que las muertes se producían en el mismo potrero, afectando animales adultos en buen estado algunas de las cuales se encontraban con ternero al pie, presentando todas los mismos signos postmortem.

Debido a que luego de la revacunación vuelven a ocurrir muertes súbitas, el Dr. Aristimuño aconseja cambiar de marca de vacuna (vacuna C) y volver a revacunar. Las muertes se detienen por algunas semanas, pero nuevamente vuelven a ocurrir, por lo que el profesional actuante plantea la posibilidad de cambiar todo el ganado de potrero ya que en donde estaban los animales era de campo bajo de bañado con agua y abundante "grama", poniendo allí animales jóvenes que no morían. Lamentablemente no se pudo hacer eso y siguieron muriendo vacas de a una o dos por semana, de forma que el veterinario actuante concurrió al predio a realizar la necropsia, enviando muestras anatómicas refrigeradas, incluyendo hígado, al Laboratorio Veterinario del Este "Miguel C. Rubino", para su posterior estudio, donde se realiza un diagnóstico patológico y epidemiológico, confirmando la sospecha de una enfermedad clostridial, la cual se identifica mediante los hallazgos patológicos e histológicos se identifica como Hemoglobinuria bacilar.

Como mostrará la figura 4, en el predio se vacunaba rutinariamente con vacunas policlostridiales comerciales de distintos laboratorios, obteniendo resultados erráticos. El Dr. Julián Bermúdez quién formaba parte del equipo de extensión técnica del laboratorio Santa Elena-Virbac se pone a disposición para el estudio y posible resolución del problema. Él es quién como docente de la Facultad de Veterinaria nos hace participar del caso.

En el año 2011 comienzan los estudios de laboratorio que se detallan a continuación en materiales y métodos, y se llega al diagnóstico definitivo de Hemoglobinuria bacilar y el aislamiento obtenido de *Clostridium novyi* confirmado por inmunofluorescencia mediante la interpretación de los resultados obtenidos.

Figura 4. Número de muertes por año y descripción de vacunas clostridiales polivalentes comerciales utilizadas.



➡ : vacunación con vacuna A / B

➡ : vacunación con vacuna C

#### 10.4. Descripción de la sintomatología clínica:

Debido a la evolución aguda a sobreaguda de dicha enfermedad es muy difícil observar la sintomatología clínica, y más aún en condiciones de campo. Lo que se llegó a visualizar cuando se arribó al establecimiento, fue que los animales presentaban diarrea sanguinolenta, orina coloreada, vientre retraído y marcha tambaleante. Uno de los animales que presentaba sintomatología clínica cayó y se observó pedaleo, opistótonos, nistagmos, espuma sanguinolenta por nariz y vocalizaciones. La temperatura rectal estaba dentro de los parámetros normales. La mucosa bucal, ocular y vulvar presentaba una coloración anémica con un tinte icterico. Luego de la observación de dichos síntomas se procedió a la petición del encargado del establecimiento que realizara el sacrificio del animal para su posterior necropsia.

## **10.5. Metodología de diagnóstico realizada:**

Como se describió antes, al llegar al establecimiento se realizó la necropsia de una vaca, la cual presentaba sintomatología clínica.

### **10.5.1. En el campo:**

#### Necropsia

Para realizar este paso tan importante en el diagnóstico nos basamos en lo descrito por Sterne M. y Batti I. en el libro Clostridios patógenos (1978), el cual utilizamos como guía para dicho procedimiento.

Antes de comenzar la necropsia es necesario realizar una historia clínica en la cual conste la especie animal, la raza, la edad, el sexo y el número de animales afectados así como también la duración del brote; si existieren antecedentes de un caso similar en las proximidades se debe adjuntar; la historia inmunológica del rebaño (número de veces que los animales han sido inmunizados, nombre del fabricante de cada uno de los profilácticos utilizados).

En la necropsia debe ser extendido un informe indicando si la misma fue realizada de forma completa o parcial (llámese completa a aquella en la cual se analizaron todos los órganos y sistemas, aunque solo se mencionen en el informe los hechos patológicos; mientras que la necropsia de tipo parcial indica que solo se estudiaron los órganos que hacen referencia en el informe).

Es recomendable que antes de iniciar dicho procedimiento se realice una extensión de sangre tomada del morro o de la oreja y se coloree con tinciones tales como Giemsa ó Wrigth e invéstigúese microscópicamente la presencia de Carbunco bacteridiano. En caso negativo se debe continuar con la necropsia. Este paso de realizar la búsqueda a campo no siempre es práctico, pero nunca se debe omitir su análisis en el laboratorio.

Es de importancia evaluar en primer lugar la posición en la cual se encuentra el cadáver, el cual en nuestro caso estaba en decúbito costal izquierdo. Por las aberturas naturales se observó espuma sanguinolenta por nariz y sangre no coagulada por ano y vulva. A la inspección de la piel no había lesión provocada por ectoparásitos (garrapata), ni lesiones de otro tipo. Se pudo evidenciar un marcado aumento del diámetro abdominal. Luego de la inspección pertinente se procedió a la apertura de la cavidad abdominal, la cual se realizó con el animal situado sobre su flanco derecho, realizándose una incisión desde el borde la pelvis hasta el cartílago xifoides, y una segunda incisión posterior y paralela a la última costilla, pudiéndose evidenciar un olor rancio, colección de gas en las vísceras, abundante cantidad de líquido hemorrágico, así como hemorragias en pared abdominal, peritoneo y epiplón. Fue necesario separar los ligamentos del rumen e intestino para poder extraer éstos de la cavidad abdominal, junto con el bazo. Posteriormente se extrajo el hígado, los riñones y las glándulas

suprarrenales. Se realizó la apertura y el examen de la totalidad del tracto intestinal luego de liberarlo del mesenterio, evaluando color consistencia y cantidad del contenido así como el aspecto de la membrana mucosa. Se evidenciaron hemorragias tanto en el intestino delgado como en el intestino grueso y pre estómagos. Tanto el rumen como librillo presentaban abundante contenido de pasto. En el bazo se destacó la presenta de sus bordes redondeados y una evidente esplenomegalia. La vesícula biliar estaba con contenido, hígado y riñones friables y oscuros. En el hígado se evidenciaron áreas de aspecto necrótico. A la inspección de la vejiga se vió orina de coloración rojiza, lo cual indica la presencia de sangre o hemoglobina en la misma.

La cavidad torácica puede separarse hacia la parte dorsal lo que permite poner dicha cavidad al descubierto. Se observaron hemorragias en pleura parietal, en pulmones y corazón, así como también líquido hemorrágico en cavidad torácica.

Se evaluó el revestimiento pericárdico, realizando la apertura de ambos ventrículos mediante cortes sagitales a los largo del surco mayor y se continúa la incisión por las válvulas tricúspides hacia las aurículas y a través de las válvulas aorticas y pulmonares hacia las arterias. Se examinó la superficie de los pulmones, así como la palpación de los mismos buscando anormalidades. Se continuó con la exploración de la tráquea y los bronquios. También fue posible constatar que el animal estaba preñado de aproximadamente 3 meses de gestación.

En los cuadros producidos por clostridios suele obtenerse un mayor resultado el estudio de la piel, el tejido muscular, el tracto intestinal, la vejiga, los órganos parenquimatosos y la cavidad torácica, incluyendo el corazón y sus membranas, no así el examen de la cabeza, cráneo y cuello, ya que no suele generalmente dar grandes resultados (Sterne M. y Batti I. 1978).



Figura 5



Figura 6



Figura 7

Figura 5. Cadáver con distensión abdominal. Figura 6. Espuma sanguinolenta por la nariz. Figura 7. Sangre no coagulada por ano y vulva. Fuente: Dr. Aristimuño





Figura 8. Cadáver en decúbito costal, con aumento del diámetro abdominal y materia fecal con sangre.



Figura 9. Hemorragias en pared abdominal. Figura 10. Hemorragias en peritoneo y epiplón. Figura 11. Hemorragias en intestino delgado, intestino grueso y pre estómagos. Fuente: Dr. Aristimuño.



Figura 12. Cavity torácica con hemorragias en pleura parietal, en pulmones y corazón. Fuente: Dr. Aristimuño.

Cuando se van a transportar muestras para exámenes microbiológicos es necesario inhibir la multiplicación bacteriana y evitar la destrucción de la flora existente, mientras que para el caso de investigación de tipo inmunológico, lo que se busca es evitar la multiplicación, de forma que las toxinas y los antígenos no sean alterados. A su vez cuando se envían las muestras al laboratorio es necesario que éstas estén correctamente empaquetadas e identificadas siendo deseable que el examen de la muestra se haga lo más rápido que sea posible. Previo a su análisis toda la información que se tenga disponible (historia, informe de necropsia, entre otras) debe ser reconsiderada por una persona especializada, ya que esto puede poner en manifiesto algún detalle que no haya sido considerado por el remitente y que pueda resultar muy significativo (Sterne y Batti, 1978).

En este caso el material remitido al laboratorio Santa Elena-Virbac, fue hígado, riñones y líquido serosanguinolento correspondiente a cavity torácica y abdominal.

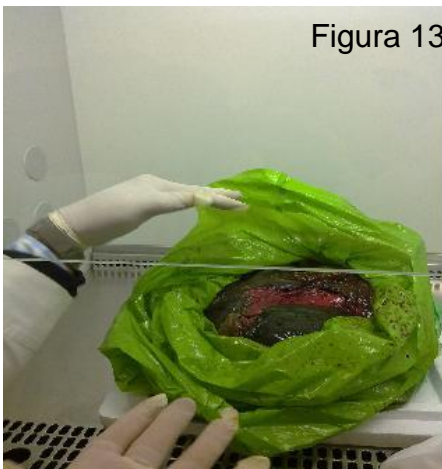


Figura 13

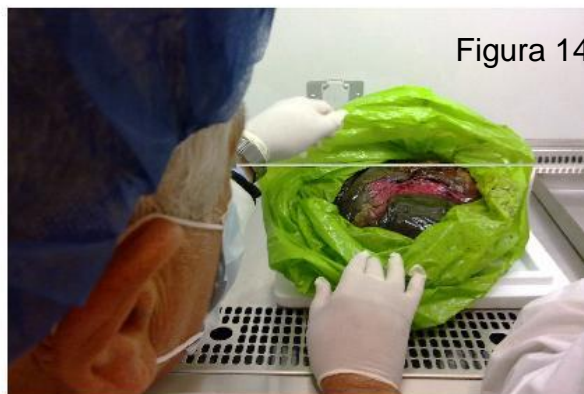


Figura 14

Figuras 13 y 14. Muestras de hígado remitidas al laboratorio Santa Elena-Virbac.

Las muestras se analizaron para el diagnóstico de Carbunco bacteridiano, Mancha, Gangrena gaseosa, Hepatitis necrótica y Hemoglobinuria bacilar.

### **10.5.2. En el Laboratorio:**

#### **Procesamiento en el laboratorio Santa Elena-Virbac:**

El diagnóstico exige una gama de medios que aseguren el crecimiento satisfactorio y la producción de toxinas en cantidad suficiente para poder hacer las tipificaciones que sean necesarias (Sterne y Batti, 1978).

Tanto con las muestras de parénquima de hígado y riñón de 2 x 2 cm., como con el líquido serosanguinolento se realizaron improntas para la tinción de Gram, se hizo inmunofluorescencia directa, se sembraron en medios de cultivo especiales, y se inocularon animales de laboratorio.



Figura 15. Hígado remitido con una coloración ocre al corte.

#### **Tinciones:**

Del material remitido y de los medios de cultivo se realizaron tinción de Gram e inmunofluorescencia directa.

#### **Siembra:**

El material se sembró en el medio Cooked meat a 37° C, por 24 a 48 horas para detectar toxinas y mantenimiento de la cepa. También se realizó la siembra en placas de agar sangre en forma aeróbica y anaeróbica, a 37° C, por 24 a 48 horas.



### Inoculación de animales:

Con el hígado y el riñón se realizaron macerados con suero fisiológico estéril y se inocularon cobayos, en volumen de 1 mL en forma intramuscular y se observaron por 72 horas.

El líquido serosanguinolento se inoculó en lauchas en un volumen de 0,5 mL en forma subcutánea y se observaron durante 72 horas.

Del crecimiento obtenido en los medios de cultivo sembrado se inocularon cobayos y lauchas de la forma anteriormente redactada.

La utilización de animales para actividades experimentales e investigación científica se establecen en el marco regulatorio nacional en la ley 18.611 del 2 de Octubre del 2009, la cual se denomina Ley de Experimentación Animal. En el capítulo IV de dicha ley, en los artículos del 12 al 17 se especifican las condiciones de cría y uso de animales para enseñanza e investigación científica, quienes quedan autorizadas para tal uso son las instituciones registradas ante la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA), estando el Laboratorio Santa Elena- Virbac autorizada por dicha entidad (Casaux G y col. 2013).

### Necropsia de cobayos:

A los cobayos inoculados que presentaron signos clínicos se procedió a retirar muestras de sangre por punción intracardíaca para aislamiento. Luego se realizó el sacrificio del animal y la necropsia retirando muestras de hígado, riñón y líquido serosanguinolento para aislamiento. Con lo anterior se realizaron improntas para tinción de Gram e inmunofluorescencia directa; siembra en medio Cooked meat y siembra en placas de agar sangre. Con el crecimiento de las placas de agar sangre y el medio Cooked meat se realizaron improntas para la tinción de Gram e inmunofluorescencia directa. De las siembras que dieron bacilos Gram positivos con espora subterminal e inmunofluorescencia directa positiva compatibles con el *Clostridiuml novyi* y se resembraron en Cooked meat para su conservación.

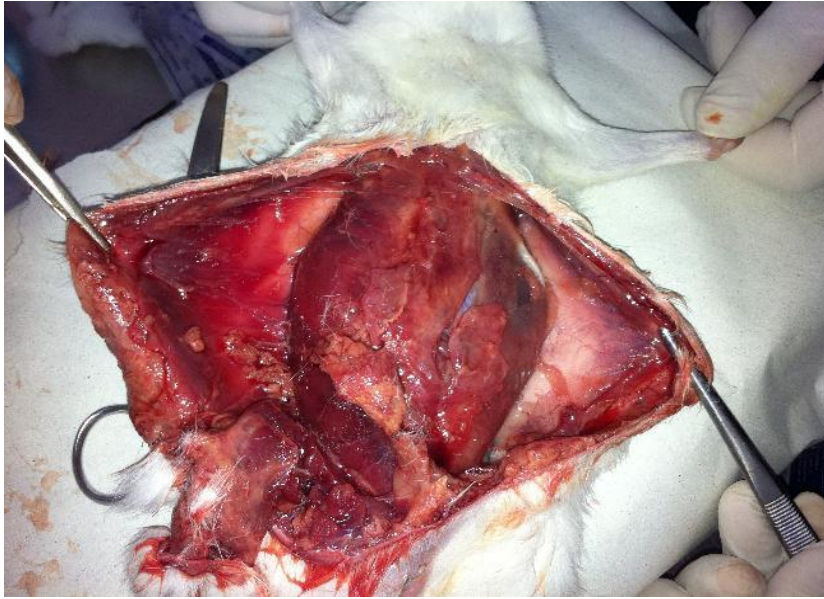


Figura 16. Cobayo con hemorragias y líquido sanguinolento en subcutáneo.

#### **10.6. Descripción de las medidas de control, producción y uso de una vacuna monovalente**

Frente a todo lo anteriormente nombrado y ante la situación en la cual no se producía una protección esperada con las vacunas polivalentes utilizadas, con las cuales continuaba un nivel de mortandad, se consideró la producción de una vacuna monovalente producida con cepas de *Clostridium haemolyticum*, con las cuales se produjo una bacterina con un adyuvante acuoso (hidróxido de aluminio) que luego de las pruebas de inocuidad e inactivación se inocularon a los animales con el siguiente plan de vacunación: primovacunación y booster en setiembre – octubre, y otra dosis en enero – febrero únicamente a los animales mayores de 2 años y revacunación cada 4 meses.

### **11. RESULTADOS**

A través de antecedentes de Archivos Veterinarios del Este, existe información que hace suponer que ésta es una enfermedad prevalente en la zona, y que el uso de vacunas comerciales no presentaba el efecto deseado para las mismas, ya que no se observó reducción en el nivel de muertes. La prevalencia mundial de ésta enfermedad es mayor en zonas inundables, poco drenables coincidiendo con el predio en cuestión.

Clínicamente quedó demostrado que los animales presentaban sintomatología compatible con la descrita anteriormente de Hemoglobinuria bacilar.

En la necropsia se pudo determinar que las lesiones eran orientativas de Hemoglobinuria bacilar. De las cuales citamos la presencia de espuma sanguinolenta por nariz y sangre no coagulada por ano y vulva. Posterior a la apertura del cadáver se observó abundante cantidad de líquido hemorrágico, y hemorragias en pared abdominal, peritoneo y epiplón, así como también en el intestino delgado como en el intestino grueso y pre estómagos. En el bazo se destacó la presenta de sus bordes redondeados y una evidente esplenomegalia. El hígado y los riñones estaban friables y oscuros. A su vez en el hígado se evidenciaron áreas de aspecto necrótico. A la inspección de la vejiga se observó orina de coloración rojiza, lo cual indica la presencia de sangre o hemoglobina en la misma. Por último se observaron hemorragias en pleura parietal, en pulmones y corazón, así como también líquido hemorrágico en cavidad torácica.

En el laboratorio, luego de los pertinentes ensayos y estudios se llegaron a los siguientes resultados: de las tinciones de Gram realizadas de los frotis directos de las muestras remitidas, del crecimiento obtenido en el medio Cooked meat y de las colonias obtenidas en las placas de agar sangre y del cobayo inoculado, mostraron la presencia de bacilos Gram positivos, con esporas subterminales. La inmunofluorescencia directa demostró reacción positiva para *Clostridium novyi* y negativa para *Clostridium sordellii* y *Clostridium septiucum*.

De la siembra en medios de cultivo se obtuvo un aislamiento puro a partir de la sangre obtenida por punción intracardiaca de cobayo. Las colonias aisladas son de 2 a 4 mm de diámetro, presentan un color blanco-grisácea, traslúcidas con elevación central, borde irregular y finamente dentado y de superficie rugosa. Las colonias están rodeadas por un halo de hemólisis parcial. Las demás muestras resultaron contaminadas.

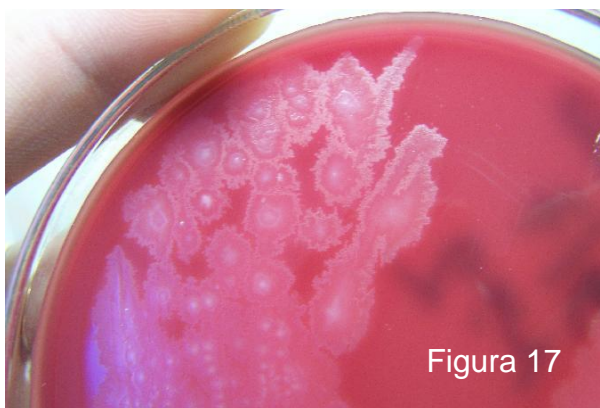


Figura 17. Colonias compatibles con *Clostridium novyi* en medio de agar sangre.  
Figura 18. Medio de cultivo Cooked meat.

Los cobayos inoculados presentaron sintomatología local en el punto de inoculación a las 12 a 24 horas post-inoculación. A la necropsia se observaron hemorragias y líquido sanguinolento en subcutáneo, esplenomegalia y hepatomegalia. Riñón e hígado friable, vejiga con estrías de sangre. No se presentaron lesiones necróticas en el músculo estriado.

Como resultado se llegó a que los datos obtenidos por Inmunofluorescencia directa nos indican que el agente aislado se trataría de un *Clostridium novyi*.

Se pudo obtener un cultivo puro a partir de la sangre cardíaca, la cual a la inmunofluorescencia directa nos confirmaría que se trata de un *Clostridium novyi*.

Luego de la aplicación de dicha bacterina en el año 2013 las muertes cesaron, y según nos comunicó el veterinario tratante Dr. Carlos Aristimuño, si pasan más de 5 meses sin vacunar a los animales que se encuentran en ese potrero específicamente comienzan las muertes en goteo.

## **12. CONCLUSIONES – RECOMENDACIONES**

Los datos clínicos, epidemiológicos, patológicos, de laboratorio y la respuesta a la vacuna monovalente inclinarían el diagnóstico a *Clostridium haemolyticum* (*Clostridium novyi* tipo D), agente responsable de la Hemoglobinuria bacilar, quedando pendiente para la confirmación en el laboratorio las pruebas de PCR y seroneutralización.

En relación a la eficacia de la vacuna monovalente utilizada para este caso atribuimos su buena respuesta a que en su formulación contenía antígenos bacterianos en mayor proporción en relación a la vacuna polivalente, y que el efecto del adyuvante provocó mayor estímulo al sistema inmune siendo que en las vacunas polivalentes el mismo tiene que responder a una mayor cantidad de antígenos, por lo que convendría realizar estudios que pudieran determinar la importancia de los antígenos del *Clostridium haemolyticum* en la inmunidad, que dieran una respuesta eficaz frente a la aparición de esta enfermedad en la zona.

Además de afectarse animales adultos también existe la posibilidad de que enfermen terneros y animales de sobreaño si existieren las condiciones para que la patología se desarrolle. Esto se verifica en casos registrados donde efectivamente se vieron afectados animales de esta categoría, por lo tanto es recomendable confirmar el diagnóstico e iniciar la vacunación en la misma cuando se presente sintomatología y patología compatible con Hemoglobinuria bacilar.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Cantón G., Ramos, F. (2009). Impacto de la hemoglobinuria bacilar en el sudeste bonaerense. Disponible en: <http://www.todoagro.com.ar/noticias/nota.asp?nid=10773> Fecha de consulta: 14/5/2015.
2. Carloni, G. (2007). Clostridium. En: Stanchi, N.O. Microbiología Veterinaria. Buenos Aires. Intermédica. p. 347-355.
3. Casaux G., Formento P., Fiorito M. (2013). Marco legal del Bienestar Animal en el Uruguay. 3a ed Montevideo. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. 55 p.
4. De Freitas, A. (1987). Enfermedades producidas por el género Clostridium. En: Bonino Morlán, J., Durán del Campo, A., Mari, J.J. Enfermedades de los lanares. Montevideo, Hemisferio Sur, V. 2 p. 11- 54.
5. Dutra, F. (2009). Archivo Veterinario del Este. Laboratorio Regional del Este, Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) "Miguel C. Rubino". Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). Treinta y tres, Uruguay. 4to trimestre, p 6-7. Disponible en: [http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Laboratorios/Archivo%20Veterinario%20del%20Este%20-%204T\\_2009.pdf](http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Laboratorios/Archivo%20Veterinario%20del%20Este%20-%204T_2009.pdf) Fecha de consulta: 10/03/2015.
6. Dutra, F. (2011, a). Archivo Veterinario del Este. Laboratorio Regional del Este, Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE)"Miguel C. Rubino". Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). Treinta y tres, Uruguay. Boletín Nro, 7, p 5-6. Disponible en: [http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Laboratorios/Archivo%20Veterinario%20del%20Este%20-%204T\\_2010.pdf](http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Laboratorios/Archivo%20Veterinario%20del%20Este%20-%204T_2010.pdf) Fecha de consulta: 10/03/2015.
7. Dutra, F. (2011, b). Archivo Veterinario del Este. Laboratorio Regional del Este, Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) "Miguel C. Rubino". Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). Treinta y tres, Uruguay. Boletín Nro, 9, p 4-5. Disponible en: [http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Laboratorios/Archivo%20Veterinario%20del%20Este%20-%202T\\_2011.pdf](http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Laboratorios/Archivo%20Veterinario%20del%20Este%20-%202T_2011.pdf) Fecha de consulta: 10/03/2015.
8. Dutra, F. (2012, a). Archivo Veterinario del Este. Laboratorio Regional del Este, Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) "Miguel C. Rubino". Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). Treinta y tres, Uruguay. Boletín Nro, 12-13, p 7-8. Disponible en: [http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Laboratorios/Archivo%20Veterinario%20del%20Este%20-%201y2T\\_2012.pdf](http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Laboratorios/Archivo%20Veterinario%20del%20Este%20-%201y2T_2012.pdf) Fecha de consulta: 10/03/2015.
9. Dutra, F. (2012, b). Archivo Veterinario del Este. Laboratorio Regional del Este, Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) "Miguel C. Rubino". Ministerio

de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). Treinta y tres, Uruguay. Boletín Nro, 14-15, p 7-8. Disponible en: [http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Laboratorios/Archivo%20Veterinario%20del%20Este%20-%203y4T\\_2012.pdf](http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Laboratorios/Archivo%20Veterinario%20del%20Este%20-%203y4T_2012.pdf) Fecha de consulta: 10/03/2015.

10. Dutra, F. (2013). Archivo Veterinario del Este. Laboratorio Regional del Este, Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) "Miguel C. Rubino". Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). Treinta y tres, Uruguay. Boletín Nro, 116-17-18-19, p 7-8. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Laboratorios/Archivo%20Veterinario%20del%20Este%20-%20A%C3%B1o%202013.pdf> Fecha de consulta: 10/03/2015.

11. Dutra, F. (2014). Archivo Veterinario del Este. Laboratorio Regional del Este, Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) "Miguel C. Rubino". Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). Treinta y tres, Uruguay. Boletín Nro, 20-21, p 5-6. Disponible en: [http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Laboratorios/Archivo%20Veterinario%20del%20Este%20-%20N%C2%BA20y21\\_2014.pdf](http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Laboratorios/Archivo%20Veterinario%20del%20Este%20-%20N%C2%BA20y21_2014.pdf) Fecha de consulta: 10/03/2015.

12. Erwin BG. (1977). Experimental introduction of bacillary hemoglobinuria in cattle. Am J Vet Res 38:1625-1627.

13. García-Cano, E. (2003). Diagnóstico de infecciones por anaerobios. 2a ed. México, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. 62 p.

14. Gillespie JH; Timoney JF (1981). Hagan's Infectious Diseases of Domestic Animals, 7a. ed. Ithaca, Cornell University Press. p. 212-214.

15. Guerreiro, M., Texeira, M., Nunes, C.A. (1962). A hemoglobinúria bacilar dos bovinos no Rio Grande do Sul. Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária, 5: 287-300.

16. Holt, J.; Krieg, N.; Sneath, P.; Staley, J.; Williams, S. (2000). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9a ed. Philadelphia. Williams y Wilkins. p.559-560.

17. Hreczco, I. (1959). Infectious necrotic hepatitis in sheep in south Australia, possibly associated with *Cysticercus tenuicollis*. Aust Vet J 35:462-463.

18. Hutyra, F.; Marek, J.; Manninger. R. (1968). Patología y terapéutica especiales de los animales domesticos. 2a ed. Barcelona. Labor, 2 V.

19. Janzen ED, Orr JO, Osborne AD. (1981). Bacillary hemoglobinuria associated with hepatic necrobacillosis in a yearling feedlot heifer. Can Vet J 22: 393-394.



20. Jasmin AM. (1947). Insolation of *Clostridium haemolyticum* from bones. Am J Vet Res 8: 341-342.
21. Jubb KVF, Kennedy PC. (1963). Pathology of Domestic Animals, 2a ed. Nueva York. Academic Press. 238 p.
22. Mangold, A.J., Mastropaolo, M. (2013). Epidemiología y control de hemoparásitos (Babesia y Anaplasma) en Argentina. En: Fiel, C., Nari, A. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en Rumiantes. Buenos Aires. Hemisferio Sur, p. 639-656.
23. Martínez, E. (2011). Estudio e identificación de antígenos vacunales de *Clostridium chauvoei*. Tesis de maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. México. 85 p. Disponible en: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8899/Tesis%20Mart%C3%ADnez%20G%C3%B3mez%20Elian%20Mireille.pdf?sequence=1>  
Fecha de consulta: 4/12/2014.
24. Noro M., Wittwer F., (2011). Hemoglobinuria posparto en vacas de tres rebaños lecheros de la región del Bío-Bío, Chile. Rev. MVZ Córdoba 16 (3): 2785-2792.
25. Olander HJ, Hughes JP, Biberstein EL. (1966). Bacillary hemoglobinuria: Induction by liver biopsy in naturally and experimentally infected animals. Pathol Vet 3:421-450.
26. Popoff, M; Bouvet, P. (2009). Clostridial toxins. Future Microbiology. 4:1021-1064.
27. Prescott, LM; Harley, JP; Klein, DA. (2000). Microbiología. 4a ed. Madrid Mc Graw-Hill interamericana, p. 191-208.
28. Quinn, P; Carter, M; Carter, G. (1994). Clinical Veterinary Microbiology, Elsevier, p. 191-208.
29. Radostits, O.; Gay, C.; Blood, D.; Hinchcliff, K. (2002). Medicina Veterinaria. 9a ed. Madrid. Interamericana. V. 1.
30. Riet Correa, F.; Méndez, M.; Schild, A. (1991). Intoxicações por plantas e micotoxinoses em animais domésticos. Pelotas. Agropecuaria hemisferio sur V.1.
31. Riet-Correa, F.; Schild, A.; Lemos, R.; Borges, J.R. (2007). Doenças de Rumiantes e Equídeos. 3a ed. UFPEL. Pelotas. V. 1.
32. Robles, C. (1998). Enfermedades clostridiales del ganado. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA. Bariloche. p. 4-16.
33. Rodríguez-Cavallini, E; Vargas, P.; Rodríguez, C; Quesada-Gómez, C; Gamboa-Coronado, M. (2011). Phenotypic identification of over 1000 isolates of

anaerobic bacteria recovered between 1999 and 2008 in a major Costa Rican hospital. Clin Microbiol. Infect 17:1043-1047.

34. Shinozuka, Y., Yamato, O., Hossain, M.A., Higaki, T., Shikawa, I., Seiji Ichiba, S., Takagi, M. (2011). Bacillary Hemoglobinuria in Japanese Black Cattle in Hiroshima, Japan: A Case Study. J Vet. Med Sci 73 (2): 255-258.

35. Smith, LDS. (1957) Clostridial diseases of animals. . Adv Vet Sci 3: 465-524.

36. Smith, LDS. *Clostridium haemolyticum*. (1975) En: Ballows, A. (ed.) The Pathogenic Anaerobic Bacteria. Springfield. Thomas, C. p. 271-280.

37. Stampfli, H.R. (2014). Bacillary hemoglobinuria. Disponible en: [http://www.merckvetmanual.com/mvm/generalized\\_conditions/clostridial\\_diseases/bacillary\\_hemoglobinuria.html](http://www.merckvetmanual.com/mvm/generalized_conditions/clostridial_diseases/bacillary_hemoglobinuria.html) Fecha de consulta; 14/5/2015.

38. Sterne, M.; Batty, I. (1978). Clostridios patógenos. Zaragoza. Acribia. 159 p.

39. Uruguay. Guía V 2014: Vademécum de especialidades Veterinarias. Montevideo. 512 p.

40. Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Servicios Ganaderos. Resolución N° 118/012, Disponible en: [http://www.mgap.gub.uy/DGSG/Resoluciones/RES%20N%C2%B0%20118%2031\\_07%20CAMPOS%20DE%20RECR%C3%8DA%20Registro%20en%20Divisi%C3%B3n%20Sanidad%20Animal.pdf](http://www.mgap.gub.uy/DGSG/Resoluciones/RES%20N%C2%B0%20118%2031_07%20CAMPOS%20DE%20RECR%C3%8DA%20Registro%20en%20Divisi%C3%B3n%20Sanidad%20Animal.pdf) Fecha de consulta: 12/03/2015.

41. Uzal, F. (2008). Enfermedades clostridiales de los rumiantes. Disponible en: [http://www.santaelena.com.uy/uc\\_48\\_1.html](http://www.santaelena.com.uy/uc_48_1.html). Fecha de consulta: 10/02/2015

42. Uzal, F. (2010). Enfermedades Clostridiales de los Animales Domésticos. Disponible en: [http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Documentos/EnfermedadesInfecciosas/2010/Enfermedades%20Clostridiales-%20Francisco\\_UZAL.pdf](http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Documentos/EnfermedadesInfecciosas/2010/Enfermedades%20Clostridiales-%20Francisco_UZAL.pdf) Fecha de consulta: 03/03/2015.

43. Uzal, F. (2013) Enfermedades clostridiales de los rumiantes, con especial énfasis en bovinos. Parte 2: Enfermedades histotóxicas y neurotóxicas. XLI Jornadas de Buiatría del Uruguay; Paysandú, Uruguay p. 68.

44. Van Kampen KR, Kennedy PC. (1968). Experimental bacillary hemoglobinuria: I. Intrahepatic detection of spores of *Clostridium haemolyticum* by immunofluorescence in the rabbit. Am J Vet Res 29: 2173 – 217.