



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIDAD ACADÉMICA LABORATORIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA SUB UNIDAD BIOANÁLISIS

**Puesta a punto de pruebas de PCR para la detección de
Clostridium chauvoei, agente causal de miositis necrotizante
("mancha") en bovinos**

Monografía final de grado de la Licenciatura en Laboratorio Clínico

Autora: Yisell Perdomo

Tutores: Federico Giannitti - María Laura Casaux

Montevideo, Abril 2025

PÁGINA DE APROBACIÓN

FACULTAD DE MEDICINA

El tribunal docente integrado por los abajo firmantes aprueba la Monografía:

Título: Puesta a punto de pruebas de PCR para la detección de *Clostridium chauvoei*, agente causal de miositis necrotizante ("mancha") en bovinos

.....

Autora: Yisell Perdomo

.....

Tutor/es: Federico Giannitti – María Laura Casaux

.....

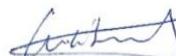
Carrera: Licenciatura en Laboratorio Clínico

.....

Puntaje:

.....

Tribunal:



Profesor/a....Cecilia Sorhouet.....(Nombre y firma).



Profesor/a....Gabriela Recoba.....(Nombre y firma).

Profesor/a.....(Nombre y firma).

Fecha: ...2 de abril de 2025.....

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Federico Giannitti y Laura Casaux, por emplear parte de su valioso tiempo a ayudarme y guiarme para lograr este trabajo. ¡Muchas gracias a ambos!

A la Platafoma de Salud Animal de INIA La Estanzuela, por permitirme desarrollar este trabajo, así como a mis compañeros por la colaboración y enseñanzas.

A los doctores Francisco Uzal y Mauricio Navarro de la Universidad de California, Davis, por compartir generosamente los protocolos de PCR.

A los compañeros de la Escuela Universitaria de Tecnología Médica, por los buenos momentos compartidos en este camino desafiante pero gratificante del aprendizaje.

A mi hermana Patricia, por estar siempre presente, apoyándome y motivándome a seguir adelante. ¡Gracias, Patito querida!

A mi compañero de vida y a mis hijos, por su paciencia, comprensión y apoyo durante todo el tiempo que duró la carrera. Gracias por entender mis largas jornadas y mis llegadas tardías; este logro también es de ustedes.

Gracias a todos.

ÍNDICE

RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. La “mancha”, miositis causada por <i>C. chauvoei</i>	8
1.1.1. Agente etiológico	9
1.1.2. Epidemiología	10
1.1.3. Patogenia	11
1.1.4. Signos clínicos	12
1.1.5. Hallazgos de necropsia	12
1.1.6. Diagnóstico	12
1.1.7. Prevención y tratamiento	13
1.2. Generalidades de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo general	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. ESTRATEGIA	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1. SECCIÓN I: Revisión de los registros de diagnósticos de la PSA	16
4.2. SECCIÓN II: Descripción de las características bioquímicas y metabólicas de los aislados	17
4.3. SECCIÓN III: Puesta a punto de pruebas de PCR para la detección de ADN de <i>C. chauvoei</i>	17
4.3.1. Inoculación de muestras de músculo bovino sano con aislados de <i>C. chauvoei</i> y <i>C. perfringens</i>	17
4.3.2. Protocolo 1. Puesta a punto de PCR de tiempo final para la detección de <i>C. chauvoei</i> en músculo congelado	18
4.3.2.1. Extracción de ADN de músculo congelado	18
4.3.2.2. Control interno de extracción, gen bovino codificante para beta-actina	18
4.3.2.3. PCR para la detección de <i>C. chauvoei</i> en músculo congelado	18
4.3.3. Protocolo 2. Puesta a punto de PCR de tiempo final para la detección de <i>C. chauvoei</i> en músculo formolado-parafinado	19
4.3.3.1. Procesamiento histológico	19
4.3.3.2. Extracción de ADN	19
4.3.3.3. PCR para la detección de <i>C. chauvoei</i> en músculo formolado-parafinado	19
4.4. SECCIÓN IV: Implementación de las técnicas de PCR para la detección de <i>C. chauvoei</i> en muestras clínicas	20
5. RESULTADOS	20
5.1. SECCIÓN I: Descripción de aspectos clínicos, epidemiológicos y patológicos en casos de mancha ocurridos naturalmente en bovinos y diagnosticados en la PSA de INIA La Estanzuela	20

5.2. SECCIÓN II: Caracterización bioquímica de los aislamientos de <i>C. chauvoei</i> obtenidos de los casos de mancha en bovinos.....	24
5.3. SECCIÓN III: Puesta a punto de protocolos de PCR en tiempo final para la detección de ADN de <i>C. chauvoei</i> a partir de aislados y músculos bovinos inoculados <i>in vitro</i>, congelados (protocolo 1) y formolados-parafinados (protocolo 2).....	25
5.3.1. PCR Protocolo 1.....	25
5.3.2. PCR Protocolo 2.....	26
5.4. SECCIÓN IV: PCR para la detección de <i>C. chauvoei</i> aplicada a muestras clínicas.....	26
5.4.1 Implementación de Protocolo 1.....	26
5.4.2 Implementación de protocolo 2.....	26
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	28
7. BIBLIOGRAFÍA	32

LISTA DE FIGURAS Y TABLA

Figura 1. Microfotografía (1000×) de una tinción de Gram de <i>C. chauvoei</i> . Bacilos Gram positivos de tamaño variable, solos o de a pares, algunos de los cuales presentan esporas. Foto: Yisell Perdomo. INIA La Estanzuela.-----	9
Figura 2. Colonias de <i>C. chauvoei</i> en agar Columbia (OXOID®) suplementado con sangre ovina al 5%. Se aprecian colonias grandes, semitransparentes, brillosas con presencia de beta-hemólisis. Foto: Yisell Perdomo. INIA La Estanzuela. -----	10
Figura 3. Modelo clásico de la patogénesis de la mancha. 1) Las esporas presentes en el suelo son ingeridas a través de los alimentos/agua. 2) Atraviesan la mucosa intestinal y pasan a la circulación sanguínea. 3) El torrente sanguíneo las disemina a múltiples tejidos donde se alojan 4) principalmente en músculo esquelético y miocardio, permaneciendo latentes hasta que un evento de hipoxia/anoxia determine su germinación, multiplicación, y producción de toxinas que causan daño local, toxemia 5) y, en consecuencia, muerte. Figura adaptada de Abreu et al. ⁽¹⁴⁾ -----	11
Tabla 1. Información clínica, epidemiológica y patológica en 5 casos de mancha en bovinos lecheros de Colonia diagnosticados en la PSA de INIA La Estanzuela en 2019-2023. -----	21
Figura 4. Hallazgos de necropsia en un torito Holstein, caso nº 2. Se aprecia extensivo edema, hemorragia, tumefacción de los músculos esqueléticos del miembro anterior incluyendo la región de la paleta y brazo (izquierda). Al corte los músculos afectados presentan color rojo oscuro y aspecto seco con pequeñas áreas enfisematosas (derecha). Miositis necrotizante por <i>C. chauvoei</i> .-----	22
Figura 5. Microfotografía de músculo estriado, caso nº 5. Los miocitos presentan coagulación y fragmentación del sarcoplasma (necrosis), y hay extravasación de eritrocitos (hemorragia) y líquido proteínico (edema) en el intersticio adyacente. Coloración de hematoxilina y eosina, magnificación original 130×. -----	22

Figura 6. Microfotografía de músculo estriado, caso nº 5. Los miocitos presentan coagulación y fragmentación del sarcoplasma (necrosis), y hay infiltración intersticial e intracelular de neutrófilos, junto con extravasación de fibrina y eritrocitos (hemorragia). Coloración de hematoxilina y eosina, magnificación original 210×. -23

Figura 7. Microfotografía de músculo estriado, caso nº 5. Detección de antígeno de *C. chauvoei* en el músculo lesionado, los bacilos se identifican a partir de la deposición granular de cromógeno rojizo-cobrizo. Inmunohistoquímica para *C. chauvoei*, contra-coloración de hematoxilina. Foto cortesía del Dr. Francisco Uzal, CAHFS, UC Davis. ----- 23

Figura 8. A) *Clostridium chauvoei* en medio agar triple azúcar hierro (TSI). B) Crecimiento del microorganismo en caldo tioglicolato evidenciado por la turbidez en el medio. C) *Clostridium chauvoei* en medio sulfuro indol motilidad (SIM), evidenciado por la turbidez en el medio y la producción H₂S. Fotos: Yisell Perdomo. INIA La Estanzuela.----- 24

Figura 9. *Clostridium chauvoei* en medio hidrólisis de la gelatina demostrado por la zona clara alrededor de la línea de siembra. Foto: Yisell Perdomo. INIA La Estanzuela.----- 25

Figura 10. PCR para la detección de *C. chauvoei*. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. M: marcador de tamaño molecular. Pocillo 1: ADN de tejido inoculado con *C. perfringens*. Pocillo 2: ADN de tejido inoculado con *C. chauvoei*. Pocillo 3: ADN de tejido sin inocular. Pocillo 4: Control positivo de *C. chauvoei*. Pocillo 5: blanco.---- 25

Figura 11. PCR para la detección de *C. chauvoei*. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. M: marcador de tamaño molecular. Pocillo 1: ADN de muestra de músculo congelado del caso clínico nº 5. Pocillo 2: Control positivo de *C. chauvoei*. Pocillo 3: blanco.----- 26

Figura 12. PCR para la detección de *C. chauvoei*, dilución 1/5. Gel de agarosa al 2%. M: marcador de tamaño molecular. Pocillos 1 al 5: muestras diagnósticas. Pocillo 6: control negativo (*C. perfringens*). Pocillo 7: control positivo (*C. chauvoei*). Pocillo 8: blanco.----- 27

Figura 13. PCR para la detección de *C. chauvoei*, dilución 1/10. Gel de agarosa al 2%. M: marcador de tamaño molecular. Pocillos 1 al 5: muestras diagnósticas. Pocillo 6: control negativo (*C. perfringens*). Pocillo 7: control positivo (*C. chauvoei*). Pocillo 8: blanco. ----- 27

RESUMEN

La “mancha” es una enfermedad infecciosa bacteriana causada por el patógeno anaerobio *Clostridium chauvoei* que afecta principalmente al ganado bovino. Se caracteriza por ocasionar miositis necrotizante aguda con desenlace fatal por toxemia, generalmente en ganado joven (terneros), afectando la economía de los sistemas ganaderos. A nivel laboratorial, es de difícil diagnóstico etiológico por métodos bacteriológicos tradicionales (cultivo anaerobio), debido a que el agente causal es anaerobio estricto y pierde rápidamente su viabilidad en muestras tomadas a campo de animales muertos, si estas no son mantenidas en condiciones de anaerobiosis y remitidas rápidamente al laboratorio veterinario. Dada esta dificultad, la probabilidad de éxito en el diagnóstico etiológico aumenta en laboratorios que disponen de pruebas que permitan la detección del patógeno en muestras bovinas, incluso cuando este no está viable, como las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El presente trabajo describe una serie de casos de “mancha” en bovinos de Uruguay y se centra en poner a punto dos pruebas de PCR en tiempo final (protocolos 1 y 2) para la detección de ADN específico de *C. chauvoei*, una sobre muestras congeladas para la que se utilizaron cebadores para detectar el gen de la flagelina (*flagellin gen*) de 535 pb (protocolo 1) y otra a partir de tejido muscular formolado-parafinado usando cebadores de 131 pb para detectar el gen de la toxina A (CctA) de este agente (protocolo 2). Para esto se dispuso de 3 aislados de *C. chauvoei* obtenidos en el laboratorio de la PSA de INIA La Estanzuela, los que fueron re-cultivados, permitiendo el análisis y la caracterización de su perfil bioquímico. Uno de los tres aislados fue empleado para elaborar controles positivos de ambas matrices (tejido muscular congelado y tejido muscular formolado-parafinado) para poner a punto los dos protocolos de PCR, utilizando ambas matrices sin inocular como controles negativos. Un aislado de *Clostridium perfringens* fue utilizado para evaluar reacciones cruzadas de ambos protocolos frente a este agente en ambas matrices.

Los dos protocolos de PCR fueron efectivos y mostraron buen desempeño en la detección de *C. chauvoei*. Los mismos fueron probados en el análisis de muestras clínicas de casos reales de mancha, usando un caso de gangrena gaseosa (miositis por *C. perfringens*) como control negativo. En particular del protocolo para tejidos formolados/parafinados, donde se emplearon diluciones del ADN extraído, se pudo inferir que una dilución adecuada puede mejorar la eficiencia de amplificación. Ninguno de los protocolos detectó *C. perfringens*, lo que contribuye a su especificidad.

Se concluye que ambos protocolos son confiables y aplicables para la detección de *C. chauvoei* sobre muestras clínicas, por lo que pueden incorporarse a la rutina diagnóstica ante casos con sospecha de “mancha” en bovinos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La “mancha”, miositis causada por *C. chauvoei*

La “mancha” es una enfermedad infecciosa bacteriana del ganado, causada por el patógeno anaerobio formador de esporas *Clostridium chauvoei*, que se caracteriza por producir miositis necrotizante, más comúnmente en bovinos jóvenes. ^(1, 2) La morbi-mortalidad de esta enfermedad suele variar de 5 a 25% y la letalidad suele llegar al 100%. ⁽³⁾

La vía de entrada de esta bacteria al organismo aún no está del todo clara, aunque se piensa que los animales contraen la infección mediante la ingesta de alimentos y/o agua contaminados con esporas de *C. chauvoei* presentes en el ambiente y suelo. ^(4, 5)

El curso clínico de la enfermedad suele ser hiperagudo o agudo, y el desenlace es casi siempre fatal. Las toxinas producidas por *C. chauvoei* son rápidamente diseminadas al torrente sanguíneo generando una toxemia que lleva a la muerte del animal en pocas horas, muchas veces antes de llegarse a apreciar signos clínicos. ⁽⁶⁾

La mancha presenta una distribución mundial y ha sido reportada en la gran mayoría de los lugares donde se cría ganado vacuno, siendo la causa de importantes pérdidas económicas en los sistemas ganaderos. Aunque existen vacunas para su prevención, aún siguen ocurriendo brotes importantes en ganado no vacunado o con vacunación incompleta. ^(1, 4) Por otro lado, es una enfermedad endémica con brotes registrados con relativa frecuencia tanto en ganado de leche como de carne.

En Uruguay, se obtuvieron los primeros aislamientos de este patógeno en los años 1961 y 1964, realizados por los Dres. Olascoaga y Leaniz, respectivamente. ⁽⁷⁾ En este país, los brotes de mancha se diagnostican con mayor frecuencia en el otoño (marzo-abril) en ganado lechero, mientras que en ganado de carne se diagnostica más frecuentemente en el invierno e inicio de la primavera, aunque pueden presentarse casos en cualquier mes del año. ⁽⁸⁾

Por lo general, para el diagnóstico confirmatorio de la mancha se emplea el cultivo microbiológico para el aislamiento bacteriano, aunque no siempre se tiene éxito dado que *C. chauvoei* es muy sensible al oxígeno, característica que compromete su aislamiento ya que el cultivo es dependiente de que la bacteria se encuentre viable en la muestra. Además, la contaminación postmortem de microorganismos de rápido crecimiento puede llevar a diagnósticos erróneos identificando principalmente a *Clostridium septicum* que es relativamente aerotolerante y posee similitudes morfológicas y bioquímicas con *C. chauvoei*. Por este motivo se han implementado otras pruebas para su identificación y diferenciación como son las técnicas inmunohistoquímicas, inmunofluorescencia, y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ⁽⁹⁾ cuya ventaja principal por sobre el cultivo radica en que no requieren necesariamente que el agente esté viable en la muestra para permitir su detección y el consiguiente diagnóstico.

1.1.1. Agente etiológico

Clostridium chauvoei se conoce desde el año 1887, siendo descrita por el científico francés J.B.A Chauveau. Esta bacteria pertenece al *Phylum Bacillota*, Clase *Clostridia*, Orden *Clostridiales*, de la familia *Clostridiaceae*, género *Clostridium*. Es un bacilo Gram positivo, histotóxico, anaerobio, formador de esporas, de tamaño variable ($0,5 - 1,7 \times 1,6 - 10,0 \mu\text{m}$), pudiéndose encontrar solo o de a pares, como se aprecia en la Figura 1. Posee movilidad a través de flagelos peritricos y en cultivos viejos puede presentarse como Gram variable. Es de fácil esporulación y sus esporas son ovoides y tienen ubicación central o subterminal. ^(1, 10)

El cultivo de muestras para el aislamiento de *C. chauvoei* debe hacerse en condiciones de estricta anaerobiosis, suministrándole una atmósfera con 2 a 10% de CO₂, utilizando medios de cultivo sólidos suplementados con sangre e incubados durante 48 h a 37°C. Las colonias se caracterizan por ser brillantes y semitransparentes, de 2 a 4 mm de diámetro, rodeadas de beta-hemólisis (Figura 2). La ocurrencia de hemólisis dependerá de la cepa bacteriana y de la especie animal de origen de los eritrocitos presentes en el medio de cultivo. Los eritrocitos de bovino, ovino, porcino, conejo y perro son susceptibles de hemólisis por *C. chauvoei*, mientras que los de humano, equino, cobayo y pollo resisten la lisis por parte de este agente. Para su crecimiento este microorganismo fermenta varios carbohidratos; sin embargo, en ausencia de estos puede obtener energía desde aminoácidos fermentables. ^(1, 11, 12)

En pruebas bioquímicas tales como oxidasa, catalasa, lecitinasa, lipasa, digestión de la caseína e indol, presenta un perfil negativo. Por otra parte, es positivo a la prueba de hidrólisis de la gelatina. ⁽¹²⁾

En cuanto a la resistencia antibiótica, *C. chauvoei* es sensible a los antimicrobianos cefalotina, clindamicina, enrofloxacina, eritromicina, penicilina, cloranfenicol, tetraciclina, sulfadimidina y gentamicina. ⁽¹³⁾



Figura 1. Microfotografía (1000×) de una tinción de Gram de *C. chauvoei*. Bacilos Gram positivos de tamaño variable, solos o de a pares, algunos de los cuales presentan esporas. Foto: Yisell Perdomo. INIA La Estanzuela.



Figura 2. Colonias de *C. chauvoei* en agar Columbia (OXOID®) suplementado con sangre ovina al 5%. Se aprecian colonias grandes, semitransparentes, brillosas con presencia de beta-hemólisis. Foto: Yisell Perdomo. INIA La Estanzuela.

La patogenicidad de *C. chauvoei* se debe a varios factores de virulencia. Destacando los más relevantes, produce dos importantes toxinas, la toxina A (CctA) y la chauveolisina. Ambas son formadoras de grandes poros en las membranas celulares, lo que altera la permeabilidad y provoca la lisis celular. La CctA es una hemolisina proteica de 32 kDa, es el principal factor de virulencia de este microorganismo. Es hemolítica, citotóxica y su actividad es estable al oxígeno. La chauveolisina dependiente del colesterol en la superficie celular, es otra hemolisina producida por este microorganismo y provoca poros de 40–50 nm en las membranas celulares, aún más grandes que los provocados por la CctA. Otros factores de virulencia de esta bacteria son las toxinas ADNasa (toxina beta), hialuronidasas (toxina gamma) y neuraminidasas (sialidasa). La enzima ADNasa escinde ADN, destruyendo las uniones fosfodiéster. Las enzimas hialuronidasas y neuraminidasas ejercen su actividad destruyendo la matriz extracelular alterando las uniones intercelulares en los tejidos, facilitando la propagación del microorganismo. Los flagelos cumplen un importante rol en la virulencia al conferirle movilidad a la bacteria, favoreciendo su propagación hacia los tejidos diana y contribuyendo al proceso infeccioso. Los antígenos flagelares al igual que la toxina CctA antes mencionada, han sido estudiados para la confección de vacunas contra la mancha. (13 - 15)

1.1.2. Epidemiología

Los bovinos en edades entre 6 meses a 2 años en buen estado nutricional son los más susceptibles a la infección, adquiriendo las esporas del ambiente. Estas esporas presentes en las heces de animales infectados o animales muertos por esta enfermedad en estado de descomposición, constituyen la principal fuente de contaminación de los suelos. Hasta el momento no se ha demostrado que *C. chauvoei* pueda crecer en el suelo, pero se sabe que sus esporas pueden sobrevivir por años en el mismo bajo ciertas condiciones ambientales de temperatura y humedad que favorecen su sobrevivencia. (2, 4)

En algunas regiones esta enfermedad se produce en gran medida en las estaciones húmedas y lluviosas del año, lo que supone que la lluvia es un vehículo para la

diseminación de las esporas y la saturación de los suelos por parte del agua genera un ambiente de anaerobiosis favorable para *C. chauvoei* ⁽¹⁾

1.1.3. Patogenia

La patogénesis de la mancha no ha sido completamente elucidada. Varios autores sostienen al clásico modelo de ingestión de esporas como el inicio de la secuencia de acontecimientos que desencadenan esta enfermedad.

Luego de arribar al intestino, las esporas ingeridas cruzan la barrera intestinal y son distribuidas a través del torrente sanguíneo a los tejidos diana, alojándose principalmente en el músculo esquelético y el miocardio. Una vez en los músculos, son fagocitadas por los macrófagos de la zona donde permanecen latentes sin provocar daños al hospedador. Eventos que provoquen la disminución de la tensión de oxígeno en zonas donde se encuentran las esporas (por ejemplo, traumatismos musculares o alteraciones de la perfusión), predisponen a la germinación y multiplicación de la forma vegetativa de *C. chauvoei* con producción de exotoxinas (antes mencionadas) que son las responsables de los signos clínicos de la enfermedad. Se cree que el estrés por ejercicio excesivo que ocurre por el movimiento de los animales genera episodios de hipoxia transitoria, creyéndose que esto podría ser uno de los factores predisponentes para la activación de las esporas y desencadenamiento de la enfermedad.

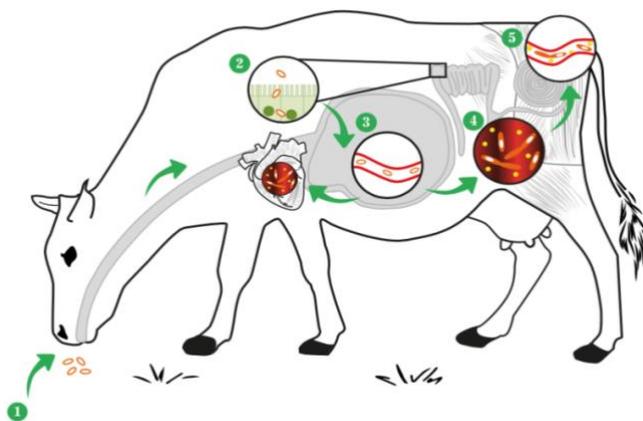


Figura 3. Modelo clásico de la patogénesis de la mancha. 1) Las esporas presentes en el suelo son ingeridas a través de los alimentos/agua. 2) Atraviesan la mucosa intestinal y pasan a la circulación sanguínea. 3) El torrente sanguíneo las disemina a múltiples tejidos donde se alojan 4) principalmente en músculo esquelético y miocardio, permaneciendo latentes hasta que un evento de hipoxia/anoxia determine su germinación, multiplicación, y producción de toxinas que causan daño local, toxemia 5) y, en consecuencia, muerte. Figura adaptada de Abreu et al. ⁽¹⁴⁾

Por otro lado, se postula que la enfermedad se podría iniciar en el intestino a consecuencia de una bacteriemia cuando los animales han sido expuestos a nuevas pasturas con grandes cargas de *C. chauvoei*. Debido a que esta patogénesis no se relaciona con heridas de piel o mucosas, la mancha es considerada una infección “endógena” y debe diferenciarse de la patogénesis “exógena” de la “gangrena gaseosa” donde las esporas de otras especies de *Clostridium* ingresan por heridas o mucosas siendo varias las especies de clostridios involucrados, incluso *C. chauvoei*, pero como contaminante externo. Aunque no hay suficiente evidencia científica al respecto, el modelo clásico mencionado es el más aceptado, como se resume en la Figura 3. ^(1, 4, 5)

1.1.4. Signos clínicos

En condiciones de campo los signos clínicos generalmente no son vistos debido al curso rápido. Una vez iniciada la enfermedad, los animales no sobreviven más de 36 horas. Cuando se logran ver animales cursando la enfermedad, los signos clínicos apreciables incluyen depresión, letargo, anorexia, cojera y renuencia a moverse.

Los músculos más frecuentemente afectados son los de los miembros traseros, donde se puede observar edema y crepitación. Cuando el corazón está afectado se pueden observar signos de insuficiencia cardíaca congestiva como distensión de la vena yugular y edema de pecho, pero el curso suele ser fulminante y culminar rápidamente en la muerte. ^(1, 2) Es frecuente encontrar animales muertos por mancha sin que estos hayan manifestado signos clínicos notables (muerte súbita).

1.1.5. Hallazgos de necropsia

Los animales muertos de mancha generalmente exhiben buena condición nutricional. En el examen externo, los músculos superficiales afectados muestran tumefacción, edema y la piel que los recubre se encuentra estirada y oscura. Mediante la palpación se puede sentir crepitación en las áreas de tejido subcutáneo que se expande por líquido serosanguinolento. Los cortes obtenidos de los músculos superficiales afectados dejan ver una coloración roja oscura a negra con edema en la periferia. En el centro la lesión es friable, seca y presenta cavidades asociadas a burbujas de gas debido al metabolismo fermentativo de *C. chauvoei*. En el corazón el daño es similar al del músculo esquelético y las lesiones se pueden ver en el miocardio de cualquiera de las regiones cardíacas. La inflamación del pericardio es frecuente, en estos casos puede verse difusamente hemorrágico y estar cubierto por una capa de fibrina y líquido serosanguinolento. Ocasionalmente puede haber endocarditis fibrinosa asociada a lesiones del miocardio subyacente. Los pulmones suelen presentar edema y pueden mostrar hemorragia multifocal como consecuencia de la toxemia terminal. ⁽¹⁾

1.1.6. Diagnóstico

Se puede obtener un diagnóstico presuntivo aceptable de mancha a partir de los hallazgos epidemiológicos (por ejemplo, categoría afectada, historia de vacunación, tasa de mortalidad y letalidad), signos clínicos (cuando están presentes), y fundamentalmente las lesiones macroscópicas (necropsia) y microscópicas

(histopatología) de animales que hayan muerto de mancha. No obstante, el diagnóstico confirmatorio de mancha debe fundamentarse en la detección del agente causal en los tejidos lesionados, ya sean frescos/congelados o los tejidos formolados/parafinados usados para el diagnóstico histopatológico. Así, para la detección de *C. chauvoei* pueden emplearse el cultivo anaerobio, la inmunodetección con anticuerpos fluorescentes (fluorescencia directa), la inmunohistoquímica y/o la PCR.

Las muestras para cultivo deben ser obtenidas rápidamente tras la muerte del animal debido a que la invasión postmortem de otros anaerobios desde el intestino como *C. septicum* pueden interferir en el reconocimiento. La histopatología del músculo afectado, si bien no hace al diagnóstico confirmatorio, es útil para reafirmar el presuntivo en tanto se identifiquen lesiones de miositis necrotizante aguda típicas de mancha. Además, con las muestras procesadas para histopatología (fijadas en formol y embebidas en parafina) se puede realizar inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos anti *C. chauvoei*, que en caso de positividad intralesional proporciona un diagnóstico confirmatorio. La inmunomarcación con anticuerpos fluorescentes e inmunohistoquímica son técnicas con especificidad y sensibilidad similares y son de mucha utilidad en los casos en los que no se dispone de tejido fresco para cultivo. La PCR es muy útil para la identificación de *C. chauvoei* y se puede realizar sobre matrices como cultivo puro (para confirmar la identidad a partir de colonias aisladas), tejidos frescos/congelados, o en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina. ^(1, 6, 16)

1.1.7. Prevención y tratamiento

En la actualidad la vacunación es el procedimiento más importante y eficaz para la prevención de la mancha. Se sugiere una vacunación inicial a los 2 meses de edad, seguida de revacunación 1 mes luego, y refuerzos cada 6 meses hasta los 2 años de vida como medida preventiva sujeta a la incidencia de la enfermedad en la zona.

En su gran mayoría las vacunas contra *C. chauvoei* son logradas a partir de cultivos de cepas virulentas del agente y generalmente de formulación polivalente junto con otros clostridios patógenos en modalidad de bacterinas inactivadas. ^(1, 8)

1.2. Generalidades de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), reacción en cadena de la polimerasa, fue creada por el investigador Kary Mullis en 1985 en California. Se ha consolidado como una herramienta de gran utilidad por su sensibilidad, especificidad y rapidez en el estudio de los ácidos nucleicos. Se aplica en áreas como la biología, la medicina humana y veterinaria, y la criminalística, entre otras. Además, en ensayos relacionados, la PCR desempeña un papel central en la tipificación genética, la caracterización molecular de organismos o individuos. ^(17, 18)

Esta técnica es aplicada en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, endémicas, emergentes, reemergentes en el ámbito animal y humano. Constituye una herramienta valiosa para la detección de patógenos microbianos que generan un impacto negativo considerable en la agricultura, las economías y a nivel global.

Gracias a su alta sensibilidad y especificidad esta técnica ha superado limitaciones en la detección de microorganismos, en casos donde la muestra es recibida en cantidades insuficientes o en ocasiones donde las técnicas convencionales no han logrado identificar bacterias de forma precisa. ⁽¹⁸⁾

Existen múltiples técnicas de PCR, entre ellas se destacan la PCR de tiempo final (convencional) y la PCR en tiempo real (qPCR) y sus variantes. ⁽¹⁹⁾ Estas presentan diferencias claves en sus objetivos y aplicaciones. La PCR de tiempo final o convencional proporciona un resultado cualitativo, indicando la presencia o ausencia del ADN objetivo en la muestra. El análisis final se realiza mediante la visualización de los productos de amplificación mediante electroforesis en un gel de agarosa, donde la banda correspondiente confirma la amplificación. Por otro lado, la qPCR permite no solo detectar, sino también cuantificar el ADN amplificado en tiempo real, mediante el uso de fluoróforos y es particularmente útil para estudios que requieren análisis cuantitativos precisos del ADN. A pesar de las diferencias, la PCR de tiempo final sigue siendo ampliamente utilizada debido a su simplicidad y menor costo en comparación con la qPCR, lo que la convierte en una técnica accesible y efectiva para varias áreas, entre ellas, investigación y diagnóstico. ^(17, 18)

El método consiste en una reacción enzimática *in vitro* donde el fundamento básico es sintetizar o amplificar millones de veces una secuencia específica de ADN. Para la reacción de síntesis, el catalizador más usado por su capacidad de trabajar a temperaturas elevadas, es la enzima taq ADN polimerasa, que proviene de la bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, de ahí su nombre comercial conocido como “taq polimerasa”. ^(17, 20)

Al realizar una reacción de PCR, se imita el proceso natural de síntesis de ADN que ocurre en una célula. En el tubo de ensayo, se combinan todos los componentes necesarios para llevar a cabo esta reacción: la enzima polimerasa, la muestra de ácido nucleico en la que se busca detectar nuestro objetivo, dos cebadores (oligonucleótidos) necesarios para que inicie la hibridación, uno llamado *forward* o sentido y otro *reverse* o antisentido. Ambos cebadores están diseñados para que hibriden con la secuencia blanco y así las nuevas cadenas de ADN puedan ser extendidas en dirección 5'- 3' por la taq polimerasa. También son necesarios desoxiribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) y, además, componentes y condiciones para que la enzima se desempeñe de forma óptima como el pH, magnesio, *buffer*, H₂O y en ciertos casos sales y reactivos específicos necesarios de cada polimerasa. ⁽²⁰⁾

La amplificación se realiza dentro de un equipo llamado termociclador que trabaja por ciclos de calentamiento y enfriamiento a determinadas condiciones de temperatura y tiempo (estos parámetros cambian dependiendo de cada protocolo de PCR) donde los componentes antes mencionados interactúan en tres principales etapas. ⁽²⁰⁾

La primera etapa es de desnaturalización, donde las dos cadenas complementarias del ADN blanco se separan o desnaturalizan mediante un aumento de la temperatura de la reacción a un rango de 92-98°C, durante un intervalo de 30 a 90 segundos. La segunda etapa es de hibridación en la cual los cebadores se aparean de manera específica con las cadenas simples del ADN desnaturalizado. Para lograrlo, la

temperatura de la reacción se reduce a un rango de 50-60°C, con una duración de 30 a 60 segundos. Por último, se realiza una tercera etapa de extensión: donde la enzima amplía los fragmentos iniciadores que previamente se unieron al ADN blanco. Durante este proceso se generan nuevas cadenas complementarias a las originales desnaturalizadas presentes al inicio de la reacción. Para ello, la temperatura se incrementa en un rango de 70-74°C, con una duración promedio de 30 a 90 segundos. ⁽¹⁷⁾

Estas tres etapas se realizan sucesivamente en lo que se denomina y constituye un ciclo. Generalmente la cantidad de ciclos varía entre 20 a 35 (esto depende de la puesta a punto de la técnica), dando lugar a una amplificación exponencial, generando millones de copias del fragmento de ADN objetivo. Completados todos los ciclos de la PCR, mediante geles de agarosa se confirma si hubo amplificación de la secuencia del ADN de interés. ⁽¹⁷⁾

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Describir aspectos clínicos, epidemiológicos y patológicos de casos de “mancha” en bovinos registrados en la Plataforma de Investigación en Salud Animal (PSA) del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) La Estanzuela, Colonia y poner a punto pruebas de PCR para detección de *C. chauvoei* para el diagnóstico laboratorial de esta enfermedad.

2.2. Objetivos específicos

1. Describir aspectos clínicos, epidemiológicos y patológicos de casos de “mancha” ocurridos naturalmente en bovinos, diagnosticados en la PSA de INIA La Estanzuela.
2. Caracterizar bioquímicamente aislamientos de *C. chauvoei* obtenidos de casos de mancha en bovinos.
3. Poner a punto dos protocolos de PCR en tiempo final para la detección de ADN de *C. chauvoei* a partir de aislados de este patógeno y de muestras de músculos bovinos frescos/congelados y formolados/parafinados.
4. Aplicar las pruebas de PCR puestas a puntos en el objetivo 3 para la detección de *C. chauvoei* en muestras obtenidas postmortem de los casos naturales de mancha descritos en el objetivo 1.

3. ESTRATEGIA

Se llevó a cabo una revisión de los registros de diagnósticos de la PSA de INIA La Estanzuela, seleccionando aquellos casos fatales en bovinos con diagnóstico confirmado de mancha, lo que permitió abordar el primer objetivo específico (SECCIÓN I).

Luego se utilizaron aislados de *C. chauvoei* y *C. perfringens* obtenidos a partir de cultivos anaeróbicos de muestras bovinas recolectadas en necropsias realizadas por veterinarios de la PSA de INIA La Estanzuela, que fueron cultivadas en el laboratorio de bacteriología de la misma institución e identificados a nivel de especie por pruebas bioquímicas y moleculares. Estos aislados fueron re-cultivados, y la caracterización bioquímica de *C. chauvoei* permitió abordar el segundo objetivo específico (SECCIÓN II).

Asimismo, los aislados de ambos agentes (*C. chauvoei* y *C. perfringens*) permitieron abordar el tercer objetivo específico (SECCIÓN III), utilizándose como controles para poner a punto pruebas de PCR sobre muestras congeladas (protocolo 1) y formoladas/parafinadas (protocolo 2) para la identificación de *C. chauvoei*, usándose *C. perfringens* con el fin de evaluar reacción cruzada. Ambos aislados se usaron para inocular *in vitro* trozos de carne bovina (tejido muscular) adquiridas comercialmente en una carnicería. Las muestras de carne inoculadas con cada uno de los agentes y muestras de carne sin inocular se congelaron a -20°C y se procesaron mediante la prueba de PCR correspondiente al protocolo 1, usando como control negativo muestras de carne congelada no inoculada con estos patógenos. Asimismo, muestras de carne inoculadas y no inoculadas con estos patógenos fueron fijadas en formalina tamponada por 48 horas, procesadas rutinariamente en el laboratorio de histología para producir bloques parafinados conteniendo músculos fijados-parafinados que luego fueron empleados para aplicar la prueba de PCR correspondiente al protocolo 2.

Por último, para abordar el cuarto objetivo específico (SECCIÓN IV), las pruebas de PCR puestas a punto fueron aplicadas sobre muestras de músculos lesionados de 5 bovinos que murieron naturalmente de mancha en rodeos bovinos de Colonia, diagnosticados por patólogos veterinarios en la PSA de INIA La Estanzuela mediante necropsia, histopatología e inmunohistoquímica. En todos los casos se procesaron muestras de músculo formolado-parafinado con lesiones, y cuando estaban disponibles (un caso) también muestras congeladas de músculo afectado.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. SECCIÓN I: Revisión de los registros de diagnósticos de la PSA

Se revisaron los registros de casos de diagnóstico de la PSA de INIA La Estanzuela, y se seleccionaron casos fatales en bovinos con diagnóstico confirmado de mancha. Se revisaron los registros individuales en cada caso, para recopilar información epidemiológica, hallazgos patológicos (necropsia, histopatología), y pruebas diagnósticas usadas para confirmar la infección por *C. chauvoei* en cada caso.

4.2. SECCIÓN II: Descripción de las características bioquímicas y metabólicas de los aislados

Los aislados de *C. chauvoei* originalmente obtenidos de los casos 2, 4 y 5 y almacenados en la PSA, fueron re-cultivados en agar Columbia (OXOID®) suplementado con sangre ovina al 5%. Se realizó una incubación en estufa de cultivo a 37°C durante 48 horas en jarra de anaerobiosis, utilizando los sobres comerciales Anaerogen de la marca OXOID®. Luego de la incubación, a las colonias bacterianas obtenidas se les realizó la tinción de Gram para evaluar la morfología bacteriana. A continuación, se realizaron las pruebas bioquímicas primarias como catalasa y oxidasa y luego para confirmación de género se utilizaron pruebas bioquímicas convencionales disponibles en el laboratorio de bacteriología, a saber: agar triple azúcar hierro (TSI), sulfuro indol motilidad (SIM), caldo tioglicolato, hidrólisis de la gelatina, lecitinasa y digestión de caseína, en una atmósfera anaeróbica a 37°C durante 48 horas en estufa de cultivo. Las muestras fueron procesadas según lo descrito por Markey et al. ⁽¹²⁾

4.3. SECCIÓN III: Puesta a punto de pruebas de PCR para la detección de ADN de *C. chauvoei*

4.3.1. Inoculación de muestras de músculo bovino sano con aislados de *C. chauvoei* y *C. perfringens*

El procedimiento se realizó bajo condiciones de bioseguridad nivel 2 en cámara de flujo laminar. A partir de cultivos frescos de *C. chauvoei* y *C. perfringens* (ver SECCIÓN II) se realizaron suspensiones bacterianas de forma independiente en tubos *ependorf* que contenían 1 ml de solución fisiológica estéril. Cada suspensión bacteriana fue ajustada hasta lograr una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). ⁽²¹⁾ Como muestras de músculo bovino sano se utilizó carne adquirida comercialmente en una carnicería. Para la inoculación de los fragmentos de carne se utilizaron agujas y jeringas estériles, con las que se tomaron separadamente 0,5 ml de cada suspensión bacteriana mencionada anteriormente. En un fragmento de músculo de 1 cm de espesor se inoculó la suspensión de *C. chauvoei*, mientras que otro fragmento de la misma medida fue inoculado con la suspensión de *C. perfringens*. La inoculación con cada agente se realizó por duplicado en diferentes trozos de carne. A continuación, los fragmentos de músculo inoculado y sin inocular se colocaron de forma individual en una placa para cultivo y se incubaron en estufa de cultivo por 24 horas a 37°C en atmósfera anaeróbica. Cumplido el tiempo de incubación, una de las copias de cada preparado más una muestra de carne sin inocular se congelaron a -20°C durante una semana, mientras que la otra copia, mas una muestra de carne sin inocular se colocaron separadamente en cassettes plásticos (histosettes) correctamente identificados que fueron sometidos a fijación en formalina tamponada por 48 horas y luego a procesamiento histológico de rutina (ver abajo).

4.3.2. Protocolo 1. Puesta a punto de PCR de tiempo final para la detección de *C. chauvoei* en músculo congelado

4.3.2.1. Extracción de ADN de músculo congelado

La extracción de ADN de músculo congelado se realizó utilizando el kit comercial Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado en el equipo Qubit (Thermo Fisher Scientific, USA). A continuación, se realizó un control interno de extracción (ver detalle en el siguiente punto, 4.3.2.2). Luego fue conservado en congelación a -20°C hasta su utilización.

4.3.2.2. Control interno de extracción, gen bovino codificante para beta-actina

Como control para verificar la correcta extracción de ADN se amplificó el gen de la beta actina bovina (95 pb) mediante PCR en tiempo real (qPCR) según Wernike et al. ⁽²²⁾ Los cebadores utilizados fueron *Forward* (5' - AGCGCAAGTACTCCGTGTG - 3') y *Reverse* (5' - CGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3'), y se usó 0,25 µl de sonda (HEX-TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT-BHQ1). La mezcla para las reacciones tuvo un volumen final de 20 µl, compuesta por 0,5 µl de cada cebador a una concentración de 0,2 µM, 10 µl de 2X SensiFAST probe No-ROX Kit (Bioline), 2 µl de ADN y 6,75 µl de agua ultrapura. Se utilizó el termociclador Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR System y el protocolo de ciclado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido una desnaturalización de 40 ciclos a 95°C por 15 seg, hibridación y extensión a 60°C por 30 seg. La interpretación de los resultados se realizó a través del software QuantStudio™ Design and Analysis. Las muestras consideradas adecuadas para el posterior análisis por PCR para detección de *C. chauvoei* fueron las que obtuvieron un valor ct (*Cycle Threshold*) de beta actina menor a 35.

4.3.2.3. PCR para la detección de *C. chauvoei* en músculo congelado

Para la amplificación a tiempo final del gen de la flagelina (*flagellin gen*) de *C. chauvoei* se utilizaron los cebadores *Forward* (5' - AGAATAAACAGAGCTGGAGATG - 3') y *Reverse* (5' - TACTAGCAGCATCAAATGTACC - 3'). Para la mezcla de reacción (25 µl) se utilizaron 0,5 µl de cada cebador con una concentración de 0,2 µM, 12,5 µl de mix Platinum Hot start 2x (Invitrogen), 2,5 µl de ADN de las muestras y 9 µl de agua pura. El programa de ciclado fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 55°C por 1 min, extensión 72°C por 1,5 min y extensión final a 72°C durante 7 min. Este protocolo fue gentilmente cedido por los Dres. Francisco Uzal y Mauricio Navarro de la Universidad de California, Davis.

La amplificación se realizó en un termociclador ProFlex PCR System, Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania (Thermo Fisher Scientific). El producto de PCR se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con el agregado de Good View™ y visualizado en el equipo Transiluminador UV para gel - LTB HE (Loccus). Se utilizó el marcador de peso molecular de 200 a 10037 pb (Bioline, UK) para comparar y determinar el tamaño de fragmento esperado (535 pb).

4.3.3. Protocolo 2. Puesta a punto de PCR de tiempo final para la detección de *C. chauvoei* en músculo formolado-parafinado

4.3.3.1. Procesamiento histológico

Los fragmentos de músculo inoculado y sin inocular destinadas a controles fueron procesados igual que habían sido procesadas originalmente las muestras de los 5 casos clínicos al momento de realizar los diagnósticos. El procesamiento consistió en una fijación durante 48 horas en una solución de formalina al 10% tamponada a pH 7 con fosfato de sodio dibásico y fosfato de sodio monobásico a concentraciones finales de 6,5 g/L y 4 g/L, respectivamente. Una vez fijadas las secciones de tejidos fueron deshidratadas mediante 5 pasajes por etanol al 95% durante 40 minutos cada uno, 1 pasaje de etanol al 100% durante 60 minutos, 3 pasajes por xilol de 45 minutos cada uno y 4 pasajes por parafina de 60 minutos cada uno a una temperatura de 60°C en un procesador automático de tejidos por infiltración al vacío (Tissue-Tek VIP Jr., Sakura). Paso seguido, se confeccionaron los bloques de parafina en una consola de inclusión de tejidos (Tissue-Tek TEC 5, Sakura). Los bloques de parafina se preservaron a temperatura ambiente hasta su utilización. El procedimiento antes mencionado se realizó siguiendo la metodología descrita en Carson y Cappellano, ⁽²³⁾ y representa el procesamiento histológico rutinariamente empleado en el laboratorio de histología de INIA La Estanzuela.

4.3.3.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de los músculos incluidos en los bloques parafinados se utilizó el kit comercial QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen). Previo a la extracción de ADN los bloques parafinados fueron seccionados en un microtomo rotatorio manual, las secciones resultantes se depositaron en tubos *ependorf* y se conservaron a temperatura ambiente hasta su utilización. El ADN purificado se cuantificó en el equipo Qubit (Thermo Fisher Scientific, USA). Luego, se realizó el control interno de extracción empleando el gen bovino codificante para la beta-actina siguiendo el mismo procedimiento descrito en el punto 4.3.2.2. Posteriormente, se conservó a -20°C hasta su utilización.

4.3.3.3. PCR para la detección de *C. chauvoei* en músculo formolado-parafinado

Los cebadores utilizados para la detección del gen para la toxina A (CctA) de *C. chauvoei* en tejidos formolados-parafinados fueron *Forward* (5'-AAGAAGGCCCTAAAGCAGGG-3') y *Reverse* (5'-AGCAACTTCCCAAGATGCAC-3'). En la mezcla para las reacciones (25 µL) se emplearon 0,5 µl de cada cebador a una concentración de 0,2 µM, 12,5 µl de mix *Platinum Hot* start 2x (Invitrogen), 5 µl de ADN de las muestras y 6,5 µl de agua ultrapura. La amplificación se realizó en un termociclador ProFlex PCR System, Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania (Thermo Fisher Scientific). Las condiciones del ciclado estuvieron comprendidas por una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 45 seg, hibridación a 60°C por 45 seg, extensión a 72°C por 45 seg y la extensión final a 72°C durante 5 min. Este protocolo también fue gentilmente cedido por los Dres. Francisco Uzal y Mauricio Navarro de la Universidad de California, Davis.

Para comprobar la presencia y el tamaño del fragmento esperado (131 pb), el producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% conteniendo el colorante comercial GoodView™ y se utilizó un marcador de peso molecular de 50 a 2000 pb (Bioline, UK). Los productos se visualizaron mediante el equipo Gel Doc™ EZ Gel BIO-RAD y para el registro digital se utilizó el programa Imagen™ Lab BIO-RAD.

4.4. SECCIÓN IV: Implementación de las técnicas de PCR para la detección de *C. chauvoei* en muestras clínicas

Se aplicaron las técnicas de PCR puestas a punto previamente en Sección III para tejido congelado (protocolo 1) y formolado-parafinado (protocolo 2) sobre muestras de músculos lesionados provenientes de 5 bovinos que fallecieron de forma natural a causa de mancha en rodeos bovinos de Colonia. En todos los casos, se trabajó con muestras de músculo formolado-parafinado que presentaban lesiones, y en un caso particular (caso n°5), también se procesaron muestras congeladas del músculo afectado.

5. RESULTADOS

5.1. SECCIÓN I: Descripción de aspectos clínicos, epidemiológicos y patológicos en casos de mancha ocurridos naturalmente en bovinos y diagnosticados en la PSA de INIA La Estanzuela

La revisión de la base de datos permitió identificar 5 casos de mancha en bovinos. Estos casos fueron diagnosticados entre 2019 y 2023, y ocurrieron en su totalidad en predios lecheros (tambos) del departamento de Colonia. Estos 5 casos ocurrieron en 3 predios diferentes que no estaban relacionados entre sí. La información clínica, epidemiológica y patológica se detalla en la Tabla 1.

En todos los casos los diagnósticos se realizaron a través de examen patológico macro y microscópico. Las lesiones macroscópicas se resumen en la Tabla 1 y se ejemplifican en la Figura 4. Histológicamente en todos los casos, las lesiones microscópicas en los músculos afectados incluyeron miositis necrotizante severa con coagulación y fragmentación del sarcoplasma de los miocitos, edema, hemorragia, extravasación de fibrina, y ocasional infiltración de neutrófilos (Figuras 5-6). En todos los casos con involucramiento de músculo estriado esquelético se apreció además inflamación, edema, hemorragia y enfisema del tejido subcutáneo sobreyacente a los músculos afectados, mientras que en el único caso con afectación cardíaca se observó además de miocarditis necrotizante, pericarditis y epicarditis fibrinosa. En los 5 casos los diagnósticos etiológicos de miositis necrotizante por *C. chauvoei* se realizaron a través de la identificación intralesional del patógeno mediante la prueba de inmunohistoquímica (Figura 7), realizada sobre muestras de músculo formoladas-parafinadas en CAHFS UC Davis, utilizando un procedimiento previamente descrito.⁽¹⁶⁾ Además, en 3 de los casos (casos 2, 4 y 5) se logró aislar *C. chauvoei* en cultivos anaeróbicos realizados a partir de músculos lesionados en el laboratorio de bacteriología de INIA La Estanzuela.

Tabla 1. Información clínica, epidemiológica y patológica en 5 casos de mancha en bovinos lecheros de Colonia diagnosticados en la PSA de INIA La Estanzuela en 2019-2023.

Nro. caso	Categoría y raza	Ubicación	Predio* ^c	Fecha	Signos clínicos observados	Lesiones macroscópicas	Cantidad de animales en el grupo afectado	Cantidad de animales afectados/muertos (% mortalidad)
1	Vaquillona Holstein (<1 año)	Colonia, paraje Artilleros	1	25/03/2019	Hipertermia, muerte en menos de 24 h	Pericarditis/epicarditis fibrinosa, miocarditis	10	5 (50%)
2	Torito Holstein (<1 año)			28/03/2019	Renguera, decúbito esternal, muerte en menos de 24 h	Miositis necrotizante con edema y enfisema en regiones de la paleta, espalda y brazo (bilateral), incluyendo el subcutáneo		
3	Ternero/novillito 4-5 meses Holstein	Colonia, paraje San Pedro	2	12/03/2020	Dificultad para caminar, decaimiento, disminución del apetito, muerte en menos de 24 h	Miositis necrotizante con edema y enfisema afectando miembro posterior, región lumbar, flanco, región esternal (bilateral)	10	3 (30%)
4	Vaquillona de sobreño Holstein	Colonia, Tarariras	3	24/04/2023	Muerte súbita (muerte sin apreciarse signos previos)	Miositis necrotizante región cervical dorsal, con edema, hemorragia y enfisema subcutáneo extendiéndose dorsalmente en las regiones cervical y torácica	100	7 (7%)
5	Vaquillona de sobreño Holstein				Muerte súbita (muerte sin apreciarse signos previos)	Miositis necrotizante región abdominal línea media ventral y región escapular, con edema, hemorragia y enfisema subcutáneo		

*Los 3 predios donde se diagnosticaron casos no estaban relacionados entre sí.



Figura 4. Hallazgos de necropsia en un torito Holstein, caso n° 2. Se aprecia extensivo edema, hemorragia, tumefacción de los músculos esqueléticos del miembro anterior incluyendo la región de la paleta y brazo (izquierda). Al corte los músculos afectados presentan color rojo oscuro y aspecto seco con pequeñas áreas enfisematosas (derecha). Miositis necrotizante por *C. chauvoei*.

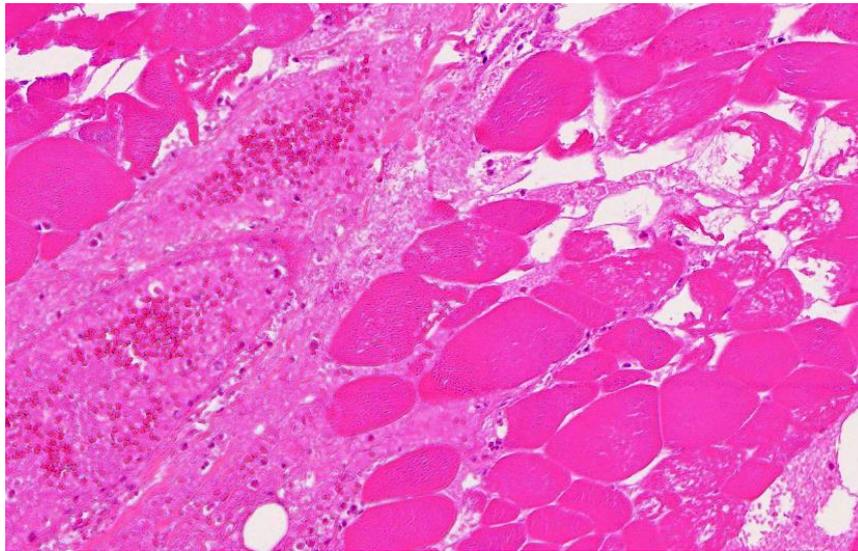


Figura 5. Microfotografía de músculo estriado, caso n° 5. Los miocitos presentan coagulación y fragmentación del sarcoplasma (necrosis), y hay extravasación de eritrocitos (hemorragia) y líquido proteínico (edema) en el intersticio adyacente. Coloración de hematoxilina y eosina, magnificación original 130x.

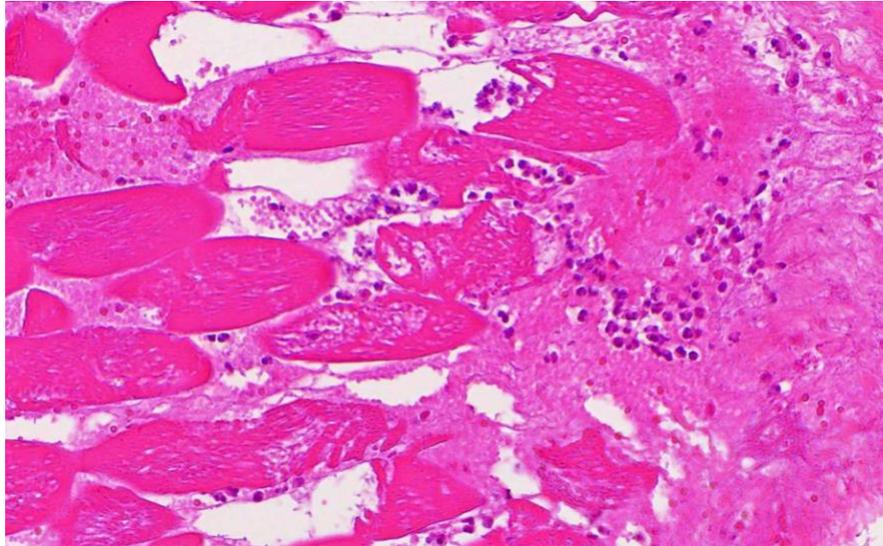


Figura 6. Microfotografía de músculo estriado, caso n° 5. Los miocitos presentan coagulación y fragmentación del sarcoplasma (necrosis), y hay infiltración intersticial e intracelular de neutrófilos, junto con extravasación de fibrina y eritrocitos (hemorragia). Coloración de hematoxilina y eosina, magnificación original 210×.

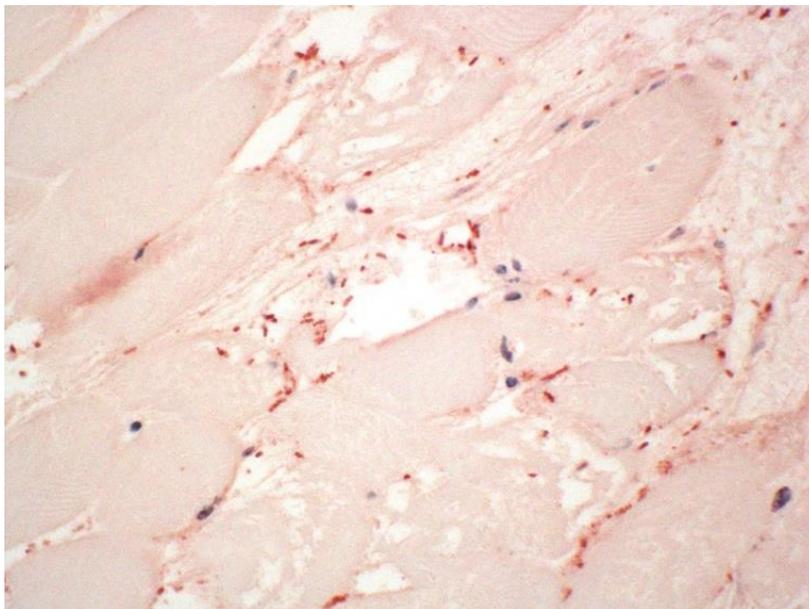


Figura 7. Microfotografía de músculo estriado, caso n° 5. Detección de antígeno de *C. chauvoei* en el músculo lesionado, los bacilos se identifican a partir de la deposición granular de cromógeno rojizo-cobrizo. Inmunohistoquímica para *C. chauvoei*, contra-coloración de hematoxilina. Foto cortesía del Dr. Francisco Uzal, CAHFS, UC Davis.

5.2. SECCIÓN II: Caracterización bioquímica de los aislamientos de *C. chauvoei* obtenidos de los casos de mancha en bovinos

Los aislados recultivados, cuyas identidades ya se conocían, mostraron una morfología bacilar y fueron positivos a la coloración de Gram. Los tres aislamientos exhibieron el perfil bioquímico esperado para el género *Clostridium*, siendo fermentativos, y catalasa y oxidasa negativos. Se observaron resultados positivos en caldo tioglicolato, hidrólisis de la gelatina y sulfuro indol movilidad (Figuras 8-9), mientras que las pruebas de lecitinasa, digestión de la caseína e indol resultaron negativas.

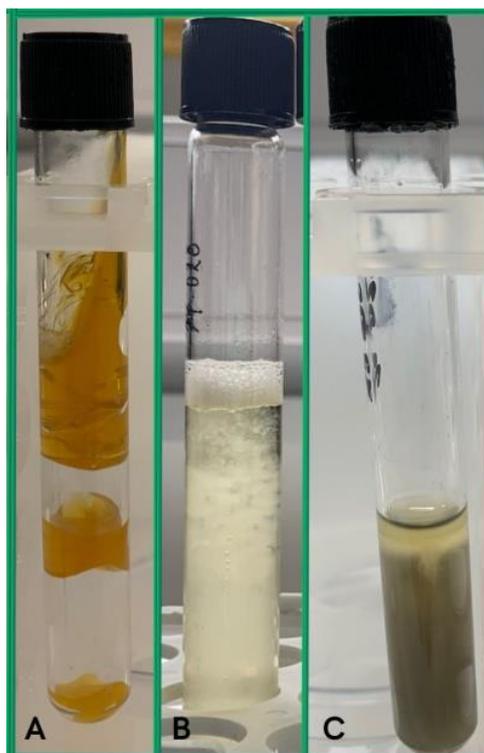


Figura 8. A) *Clostridium chauvoei* en medio agar triple azúcar hierro (TSI). B) Crecimiento del microorganismo en caldo tioglicolato evidenciado por la turbidez en el medio. C) *Clostridium chauvoei* en medio sulfuro indol motilidad (SIM), evidenciado por la turbidez en el medio y la producción H₂S. Fotos: Yisell Perdomo. INIA La Estanzuela.

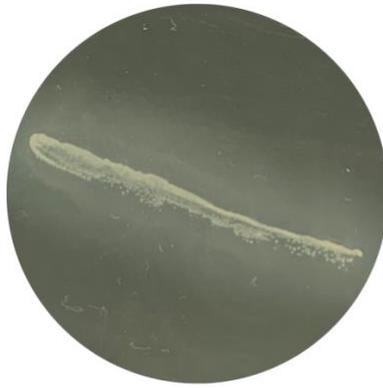


Figura 9. *Clostridium chauvoei* en medio hidrólisis de la gelatina demostrado por la zona clara alrededor de la línea de siembra. Foto: Yisell Perdomo. INIA La Estanzuela.

5.3. SECCIÓN III: Puesta a punto de protocolos de PCR en tiempo final para la detección de ADN de *C. chauvoei* a partir de aislados y músculos bovinos inoculados *in vitro*, congelados (protocolo 1) y formolados-parafinados (protocolo 2)

5.3.1. PCR Protocolo 1

La puesta a punto de esta PCR, realizada mediante el análisis de los ADN extraídos de los tejidos previamente inoculados con los agentes mencionados y que luego fueron congelados, más tejido congelado sin inocular, fue satisfactoria. Se evidenció la amplificación del ADN de *C. chauvoei* con la visualización de una banda correspondiente a 535 pb mediante electroforesis. Además, el ADN extraído del tejido sin inocular no mostró amplificación, lo que valida la corrida y confirma la ausencia de contaminación. Por otro lado, el ADN del fragmento inoculado con *C. perfringens* no presentó amplificación con esta PCR, indicando la ausencia de reacción cruzada entre los dos organismos evaluados para este protocolo (Figura 10).

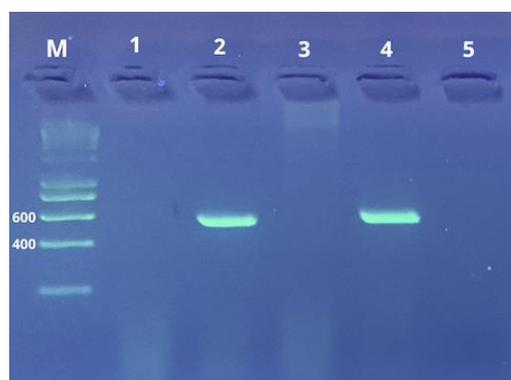


Figura 10. PCR para la detección de *C. chauvoei*. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. M: marcador de tamaño molecular. Pocillo 1: ADN de tejido inoculado con *C. perfringens*. Pocillo 2: ADN de tejido inoculado con *C. chauvoei*. Pocillo 3: ADN de tejido sin inocular. Pocillo 4: Control positivo de *C. chauvoei*. Pocillo 5: blanco.

5.3.2. PCR Protocolo 2

Los resultados obtenidos para esta PCR (tejido formolado-parafinado) fueron los esperados. Se logró amplificar el gen de *C. chauvoei* correspondiente a los 131 pb (CctA), a partir de la muestra inoculada con dicho agente, mientras que el ADN de la muestra inoculada con *C. perfringens* no presentó amplificación (ausencia de reacción cruzada). El ADN obtenido de músculo sin inocular tampoco mostró amplificación, por lo que se confirma la ausencia de contaminación. Los resultados de la amplificación y el buen desempeño de los controles se muestran en las figuras 12 y 13 de la SECCIÓN IV.

5.4. SECCIÓN IV: PCR para la detección de *C. chauvoei* aplicada a muestras clínicas

5.4.1 Implementación de Protocolo 1

Mediante el protocolo 1 de PCR, se realizó el análisis de una muestra de músculo lesionado congelado del caso clínico nº 5, aprovechando que contábamos con esta muestra en congelación desde la fecha de realización de la necropsia (Tabla 1). De esta corrida se generó un resultado positivo en la detección de *C. chauvoei* (Figura 11).

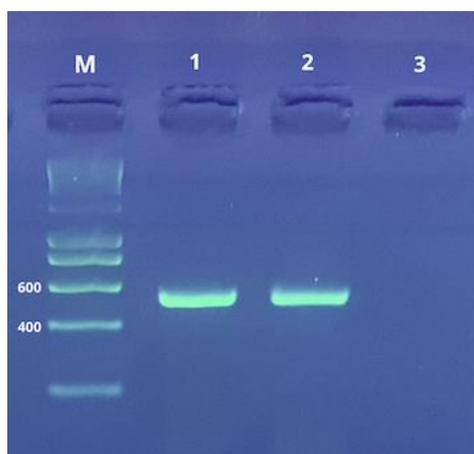


Figura 11. PCR para la detección de *C. chauvoei*. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. M: marcador de tamaño molecular. Pocillo 1: ADN de muestra de músculo congelado del caso clínico nº 5. Pocillo 2: Control positivo de *C. chauvoei*. Pocillo 3: blanco.

5.4.2 Implementación de protocolo 2

Mediante el protocolo 2 de PCR se procesaron muestras de tejidos musculares lesionados (músculo estriado esquelético, corazón) formolados-parafinados de los 5 casos clínicos (Tabla 1). Al analizar los productos de PCR de los 5 casos para diagnóstico mediante electroforesis, se observó que en la primera reacción en las que se usaron los ADN a la concentración inicial, hubo amplificación de una banda del tamaño esperado en las muestras de todos los casos, excepto la correspondiente al caso nº 5. Posteriormente, se realizó una segunda reacción, en la que se emplearon diluciones de todos los ADN a factores de 1/5 y 1/10 (Figuras 12-13), habiendo en esta ocasión amplificación en todas las muestras, incluyendo la muestra

del caso n° 5 que había sido negativa al ser analizada inicialmente en la corrida sin dilución. En particular, esta muestra mostró una banda difusa en la dilución de 1/5, mientras que en la dilución de 1/10 todas las bandas fueron bien definidas, indicando una amplificación más eficiente.

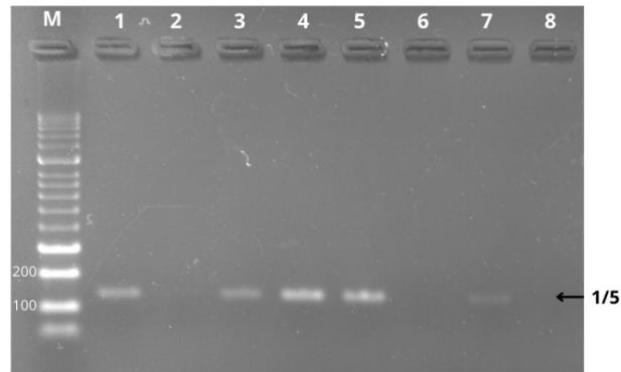


Figura 12. PCR para la detección de *C. chauvoei*, dilución 1/5. Gel de agarosa al 2%. M: marcador de tamaño molecular. Pocillos 1 al 5: muestras diagnósticas. Pocillo 6: control negativo (*C. perfringens*). Pocillo 7: control positivo (*C. chauvoei*). Pocillo 8: blanco.

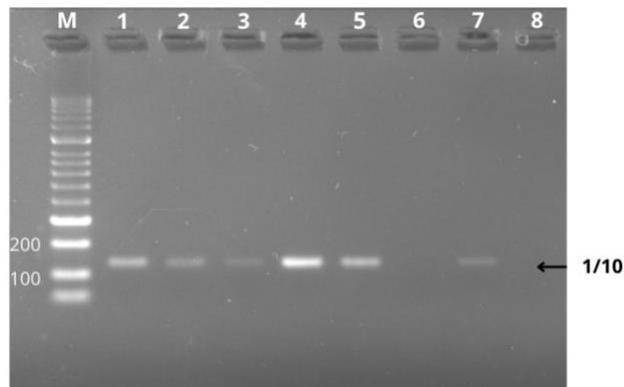


Figura 13. PCR para la detección de *C. chauvoei*, dilución 1/10. Gel de agarosa al 2%. M: marcador de tamaño molecular. Pocillos 1 al 5: muestras diagnósticas. Pocillo 6: control negativo (*C. perfringens*). Pocillo 7: control positivo (*C. chauvoei*). Pocillo 8: blanco.

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En este estudio se describieron y analizaron 5 casos de miositis necrotizante (mancha) en bovinos, todos ellos originarios de 3 predios lecheros no relacionados entre sí del departamento de Colonia. Esto sugiere que la fuente de infección ya sea ambiental o de manejo es diferente y además es atribuible a factores endémicos presentes en cada predio. En los 5 casos las edades de los animales no superaron los 2 años, todo esto coincide con lo descrito por otros autores para esta enfermedad. (1, 4, 16, 24)

En la observación macroscópica, las lesiones incluyeron inflamación (tumefacción), edema y enfisema en el tejido subcutáneo sobre los músculos afectados, siendo estos hallazgos iguales a los detallados anteriormente para esta enfermedad. (6, 4, 14) Histológicamente, las características comunes incluyeron miositis necrotizante severa observándose coagulación y fragmentación del sarcoplasma de los miocitos, acompañado de edema, hemorragia y en algunos casos, infiltración de neutrófilos. (6, 4) En uno de los casos, también se identificó afectación cardíaca, caracterizada por miocarditis necrotizante junto con pericarditis y epicarditis fibrinosa, como fue descrito por otros autores. (1, 16) Estos hallazgos indican que los bovinos de predios de Colonia tienen riesgo de padecer las dos formas más relevantes de esta enfermedad, la musculoesquelética y la cardíaca.

Por otra parte, los resultados bioquímicos y metabólicos obtenidos de los aislados no difieren de los ya conocidos, pero confirman la identidad como *C. chauvoei*. El perfil fermentativo, sumado a las pruebas negativas para catalasa y oxidasa destacan la condición del patógeno de ser anaerobio estricto, lo que está relacionado y permite comprender su capacidad para sobrevivir y proliferar en los tejidos afectados donde es escaso el oxígeno. (1, 11)

La positividad en la prueba de la hidrólisis de la gelatina reafirma la capacidad de *C. chauvoei* para producir enzimas proteolíticas (toxinas), y se relaciona con la actividad patogénica que ejerce este agente para hidrolizar las estructuras celulares del huésped generando daño tisular. A su vez, la turbidez en el medio SIM confirma la capacidad de desplazamiento del agente, que como ya se ha mencionado posee flagelos que, si bien no están estrechamente relacionados a la virulencia del microorganismo, facilitan su diseminación y llegada a los tejidos por los que tiene tropismo, donde actúan las toxinas generando lesión tisular y provocando la muerte del animal. (11, 13)

Como ya se ha mencionado, aunque *C. chauvoei* y *C. septicum* son difíciles de distinguir basándose en sus características fenotípicas, el resultado de la prueba de digestión de la caseína permite diferenciarlos. En nuestra práctica, la reacción a esta prueba fue negativa, característica de *C. chauvoei*, mientras que *C. septicum* resulta positivo en esta prueba. Además, *C. septicum* no fermenta la sacarosa, lo cual se evidenció en la prueba TSI, donde se observó la fermentación de todos los azúcares, un comportamiento atribuible a *C. chauvoei*. Estos resultados indican que el microorganismo aislado de estos casos es efectivamente *C. chauvoei*. (1, 12) Aunque no es un resultado que forma parte de este trabajo, uno de los aislados de *C. chauvoei* obtenido de estos casos fue sometido a secuenciación del genoma completo, siendo su identidad inequívoca (datos no mostrados). Los resultados

expuestos son consistentes con la literatura reportada, validando los procesos de identificación y caracterización de los aislados.

Las pruebas de laboratorio resultan indispensables para confirmar el diagnóstico de mancha, el cual debe fundamentarse en la identificación del agente etiológico en las muestras de tejido afectado. ⁽²⁵⁾ Las técnicas microbiológicas de cultivo son procedimientos que requieren de mucho tiempo, además de ser costosas y con la limitante de detectar solo microorganismos vivos. Por lo que no siempre es posible la obtención de buenos resultados cuando se trata de bacterias fastidiosas o lábiles. Tal es el caso de *C. chauvoei*, como se ha mencionado anteriormente, por su condición de ser anaerobio estricto, si la muestra para su diagnóstico no es obtenida de forma inmediata y remitida al laboratorio en condiciones apropiadas (anaerobiosis), la posibilidad de aislarlo es mínima. Por otra parte, las técnicas de inmunofluorescencia son reconocidas y valiosas para el diagnóstico de mancha. ⁽¹⁶⁾ No obstante, la obtención comercial de estos anticuerpos es complicada, y pueden presentar reacciones cruzadas entre clostridios relacionados, tal es el caso de *C. chauvoei* y *C. septicum*. La PCR supera la mayoría de las limitaciones de los métodos antes mencionados y se ha empleado recientemente para identificar distintos clostridios en muestras clínicas. ⁽²⁶⁾

El presente trabajo responde a la necesidad de contar con técnicas para el diagnóstico de *C. chauvoei* sin las limitantes antes expuestas. Así, hemos realizado la puesta a punto de la técnica de PCR desde matrices como tejido muscular congelado y formolados/parafinados, que son relativamente fáciles de colectar durante la necropsia en animales que mueren con sospecha de mancha, y no tienen la limitante de tener que ser enviados inmediatamente ni en condiciones anaeróbicas al laboratorio de diagnóstico, y permiten la detección del agente incluso si este se encuentra inviable en la muestra.

Los resultados obtenidos mediante la implementación de los protocolos 1 y 2 de PCR desde las matrices mencionadas, han mostrado un buen desempeño para detección de ADN de *C. chauvoei*, sin dar reacciones cruzadas con *C. perfringens* (especificidad).

En el protocolo 1, aplicado al músculo congelado, la puesta a punto de la PCR resultó exitosa, evidenciada por la clara amplificación del ADN de *C. chauvoei* con la visualización de una banda de 535 pb correspondiente a un componente estructural de la bacteria (*flagellin gen*), confirmando la presencia de este microorganismo en la muestra inoculada. La ausencia de amplificación de ADN de *C. chauvoei* de tejido sin inocular en presencia de amplificación del gen bovino usado como control de extracción de ADN refuerza la confiabilidad del proceso, al igual que la ausencia de amplificación de ADN de la bacteria en el blanco utilizado, demostrando la inexistencia de contaminación. Asimismo, la falta de amplificación de ADN de *C. chauvoei* a partir de las muestras inoculadas con *C. perfringens* subraya la ausencia de reacción cruzada. En este estudio, este protocolo también fue aplicado sobre colonias bacterianas aisladas, lo que permitiría su uso para identificar cultivos de *C. chauvoei* a nivel de especie en forma rápida sin la necesidad de realizar pruebas bioquímicas, algunas de las cuales son tediosas y llevan tiempo.

El análisis adicional de la muestra clínica de músculo lesionado congelado (caso n° 5) proporcionó un resultado positivo para la detección de *C. chauvoei* lo que demuestra la aplicabilidad del protocolo de PCR en muestras clínicas reales, que probablemente tienen una carga bacteriana menor a las generadas en el laboratorio por inoculación del agente. Un estudio realizado por Vargas et al.,⁽²⁷⁾ concluyó que las muestras ideales son aquellas que se congelan de inmediato tras su recolección. No obstante, nosotros no evaluamos el eventual efecto que puede tener el tiempo transcurrido entre la recolección y la congelación sobre la capacidad de detección de estos protocolos de PCR.

Asimismo, los resultados obtenidos refuerzan la utilidad de la técnica no solo en muestras controladas de laboratorio, sino también en el área clínica, lo que significa un valor diagnóstico significativo para facilitar la detección de agentes patógenos en el contexto clínico y de investigación.

Respecto al protocolo 2, dirigido al análisis de músculo formolado-parafinado, los resultados fueron los esperados. Se logró amplificar el gen correspondiente a la toxina A (CctA) de *C. chauvoei* (131 pb). Similar a lo observado para el protocolo 1, no se observó amplificación en el ADN de tejido sin inocular, al igual que en el blanco incluido en la corrida, descartando la posibilidad de contaminación. La ausencia de amplificación en las muestras inoculadas con *C. perfringens* afirma que no hubo reacciones cruzadas entre los microorganismos, consolidando la especificidad del método.

Además, el análisis del ADN de los músculos formolados-parafinados lesionados en los 5 casos clínicos para diagnóstico permitió evaluar el protocolo en diferentes diluciones. Inicialmente, solo una de las muestras de ADN (caso n° 5) no amplificó a la concentración inicial, lo que puede deberse a factores técnicos, a la concentración de ADN, así como a posibles inhibidores de la polimerasa presentes en la muestra. Sin embargo, y similar al procedimiento realizado en el estudio de Vargas et al.,⁽²⁷⁾ al realizar diluciones 1/5 y 1/10 en este trabajo, hubo amplificación en todas las muestras de casos clínicos confirmados. En particular, el caso n° 5 presentó bandas definidas en la dilución 1/10, lo que sugiere que las diluciones permiten una amplificación más eficiente, ya que permitió superar las interferencias existentes en la concentración original del ADN. Es importante tener esto en cuenta ya que podría ser necesario diluir algunas muestras que resulten negativas, de modo de aumentar la confiabilidad del procedimiento.

Este protocolo ha demostrado, al igual que el protocolo 1, ser efectivo en el diagnóstico de muestras clínicas de casos reales. Además, cobra valor para los laboratorios de diagnóstico que no cuentan con instalaciones para realizar cultivo e incluso, es aplicable para realizar estudios retrospectivos, permitiendo la identificación de *C. chauvoei* en muestras de archivos de tejidos formolados-parafinados, como se muestra en un trabajo realizado por Uzal et al.⁽²⁶⁾ A diferencia del tiempo de almacenamiento en dicho estudio (1 año), las muestras utilizadas en nuestro trabajo habían sido conservadas durante un máximo de 4 años antes de ser analizadas por PCR.

Concluimos que los protocolos de PCR que se han puesto a punto en este trabajo tienen aplicabilidad práctica para la detección de *C. chauvoei*, mejorando la

disponibilidad de herramientas para el diagnóstico etiológico de este agente en casos de mancha en bovinos en Uruguay, representando un complemento a los estudios patológicos y bacteriológicos actualmente disponibles para el diagnóstico de esta enfermedad en el país.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abreu C, Uzal FA. Blackleg. Editor: Uzal, FA; Songer JG, Prescott JF, Popoff MR. Clostridial Diseases of Animals. Ames IA: Wiley Blackwell; 2016, pp 231-241.
2. Cooper BJ, Valentine BA. Muscle and Tendon. Ed M. Grant Maxie. Jubb Kennedy and Palmer's. Pathology of Domestic Animals. 6th.ed, Canada: Elsevier, 2016; pp 164-249.
3. Cattaneo M, Bermudez J. CARBUNCO SINTOMÁTICO O MANCHA. Laboratorio Santa Elena, Uruguay. 2007 [Internet]. [consultado el 28 de setiembre de 2024]. Disponible en: [\[Link\]](#)
4. Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W. Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats, 11th ed. USA: ELSEVIER, 2017. pp 1371-1538.
5. Pires PS, Santos RL, da Paixão TA, de Oliveira Bernardes LC, de Macêdo AA, Gonçalves LA, et al. Intracellular survival of *Clostridium chauvoei* in bovine macrophages. Vet Microbiol [Internet]. 2017 [consultado el 29 de setiembre de 2024] 199:1–7. Disponible en: [\[Link\]](#)
6. Uzal FA. Enfermedades clostridiales de los rumiantes, con especial énfasis en bovinos. Parte 2: Enfermedades histotóxicas y neurotóxicas. XLI Jornadas de Buiatría del Uruguay. [Internet]. 2013 [consultado el 15 de mayo de 2024]. p68. Disponible en: [\[Link\]](#)
7. Bermúdez Torres J, França Ferreira S, Dutra da Silveira C. Respuesta de anticuerpos en bovinos vacunados contra *Clostridium chauvoei*, usando una vacuna comercial. [Tesis de grado en Internet] Montevideo: Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria. 2013. [consultado el 12 de setiembre de 2024] 41 h. Disponible en: [\[Link\]](#)
8. Giannitti F, da Silva Silveira C, Morais R, Caffarena RD, Perdomo Y, Casaux ML, et al. ÉPOCA RECOMENDADA PARA VACUNAR CONTRA LA “MANCHA” (miositis por *Clostridium chauvoei*) EN RODEOS DE BOVINOS LECHEROS Y DE CRÍA DE URUGUAY. Revista de INIA [Internet]. 2024 [consultado el 14 de noviembre de 2024] Disponible en: [\[Link\]](#).
9. Ziech RE, Gressler LT, Frey J, Vargas AC. Blackleg in cattle: current understanding and future research needs. Cienc Rural [Internet]. 2018 [consultado el 27 de abril de 2024]; 48 (5). Disponible en: [\[Link\]](#)
10. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Taxonomy browser: *Clostridium chauvoei*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); [Internet]. 2025. [consultado el 25 de enero de 2025] Disponible en: [\[Link\]](#)
11. Carloni G. *Clostridium*. Ed: Stanchi N.O. Microbiología Veterinaria. Bs As, Argentina. Editorial Inter Médica. 2010. pp. 347-9.

12. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Clinical Veterinary Microbiology. Second edition. ELSEVIER. 2013. pp 215-237.
13. Frey J, Falquet L. Patho-genetics of *Clostridium chauvoei*. Res Microbiol [Internet]. 2015 [consultado el 27 de abril de 2024]; 166(4): 384-92. Disponible en: [\[Link\]](#)
14. Abreu CC, Edwards EE, Edwards JF, Gibbons PM, Leal de Araújo J, Rech RR, et al. Blackleg in cattle: A case report of fetal infection and a literature review. J Vet Diagn Invest [Internet]. 2017 [consultado el 27 de abril de 2024]; 29(5): 612-21. Disponible en: [\[Link\]](#)
15. Frey J, Johansson A, Bürki S, Vilei EM, Redhead K. Cytotoxin CctA, a major virulence factor of *Clostridium chauvoei* conferring protective immunity against myonecrosis. Vaccine [Internet]. 2012 [Consultado el 5 de febrero de 2025] 30(37), 5500-5505. [\[Link\]](#)
16. Morrell EL, Odriozola E, Dorsch MA, Fiorentino MA, Rivera ME, Poppenga R, et al. A review of cardiac blackleg in cattle, and report of 2 cases without skeletal muscle involvement in Argentina. J Vet Diagn Invest [Internet]. 2022 [consultado el 8 de diciembre de 2023]; (6):929-36. Disponible en: [\[Link\]](#)
17. Pedrosa Amado A. Reacción en cadena de la polimerasa. AMC [Internet].1999. [consultado el 8 de enero de 2025]; 3(2): pp 0-0. Disponible en: [\[Link\]](#)
18. Pestana E, Belak S, Diallo A, Crowther JR, Viljoen GJ. Early, Rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics-real time PCR applications. New York. Springer Science & Business Media; 2010.
19. Singh J, Birbian N, Sinha S, Goswami A. A critical review on PCR, its types and applications. Int J Adv Res Biol Sci [Internet]. 2014 [Consultado el 29 de enero de 2025]; 1(7): 65-80. Disponible en: [\[Link\]](#)
20. Asuar LE. Guía práctica sobre la técnica de PCR. Ecología Molecular. [Internet] INECC. México, LE Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre (Eds); 2007. [consultado el 8 de enero de 2025], 517-552. Disponible en: [\[Link\]](#)
21. Cavalieri SJ, et al. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana; 2005. Marie B. Coyle, editora coordinadora.
22. Wernike K, Hoffmann B, Kalthoff D, König P, Beer M. Development and validation of a triplex real-time PCR assay for the rapid detection and differentiation of wild-type and glycoprotein E-deleted vaccine strains of Bovine herpesvirus type 1. J Virol Methods [Internet]. 2011 [consultado el 27 de abril de 2024]; 174(1-2):77-84. Disponible en: [\[Link\]](#)
23. Carson FL, Cappellano CH. Histotechnology. A Self-Instructional Text. 4th Ed. Chicago. Ed ASCP Press; 2015
24. Freire P, Belveder M, Rodríguez V, López Y, Schanzembach M, Giannechini E, Matto Romero C. Descripción de un foco de mancha (Miositis clostridial) en bovinos

en el Litoral Noroeste del Uruguay. XLIX Jornadas Uruguayas de Buiatría; [Internet] 2022, [Consultado el 11 de noviembre de 2024]; pp 154-156. Disponible en: [\[Link\]](#)

25. Junior CAO, Silva ROS, Lobato FCF, Navarro MA, Uzal FA. Gas gangrene in mammals: a review. J Vet Diagn Invest [Internet]. 2020 [consultado el 27 de abril de 2024]; 32(2):175-183. Disponible en: [\[Link\]](#)
26. Uzal FA, Hugenholtz P, Blackall LL, Petray S, Moss S, Assis RA, Fernández Miyakawa M, Carloni G. PCR detection of *Clostridium chauvoei* in pure cultures and in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Vet Microbiol, [Internet] 2003; [consultado el 27 de abril de 2024]; 91(2-3), 239-248. Disponible en: [\[Link\]](#)
27. Vargas OF, Rugéles CIG. Amplificación por PCR de tejidos de archivo: efecto de los fijadores. Revista Salud Uis [Internet]. 2004 [Consultado el 11 de noviembre de 2024]; 36(2), 56-64. Disponible en: [\[Link\]](#)