

Sobre la "Hemoglobinuria de los bovinos".

Por A. Sordelli, José Ferrari y Mario Prado

(PRIMERA MEMORIA)

(Con las láminas XXIX a XXXVIII)

En Chile, especialmente difundida en la región de Santiago (*), existe una enfermedad de los bovinos conocida con el nombre de "Meada de sangre". Ni la tinción de la orina, que es signo muy llamativo pues sirvió para la designación vulgar de la afección, ni otros signos evidentes parecen haber sido suficientemente claros para el diagnóstico, pues la confusión con el carbunco ha existido hasta el año 1905 en que A. Poupin (citado en Blier) demostrara que se trataba de dos (?) enfermedades distintas.

La "Meada de sangre" es designada en la literatura científica con el nombre de "hemoglobinura bovina" (Jules Blier-L'hémoglobinurie bovine du Chili, maladie à parasites spirochetiformes, C. R. Ac. Sc., tomo 159, pág. 815, 14 diciembre 1914) o "Hemoglobinuria", refiriéndose siempre a enfermedad de los bovinos (B. Sanz, pág. 314 sig. 2º Memoria, año 1922, del Instituto Biológico de la Sociedad Nacional de Agricultura, Sgo. Chile, 1923) o "Hemoglobinuria bovina chilena" (B. Sanz, pág. 35, 3º Memoria, año 1923, ídem Sgo. 1924) o "Hemoglobinuria infecciosa" (B. Sanz, pág. 25 y sig. 7ª Memoria, año 1927, Sgo. 1929).

(*) Recientemente hemos sido informados por el Sr. Hohmann que en San Martín de los Andes, en Neuquén, existe una enfermedad análoga del ganado bovino. La difusión de esta enfermedad es muy grande y adquiere cada vez más importancia.

Con este último nombre designa Sanz no sólo la enfermedad de los bovinos, sino también la producida en las ovejas por el supuesto mismo agente etiológico.

Por otra parte haremos la salvedad de que los nombres de "Meada de sangre" y los de algunos de sus equivalentes en la literatura científica parecen 1º no designar siempre la misma enfermedad. v. g.: Sanz, pág. 26 7ª Memoria dice: "Con ser la más frecuente y casi la única en Chile la Hemoglobinuria ocasionada por la presencia de Cl. Welchii o B. Hemolyticus bovis, existe, especialmente en los animales jóvenes, terneros de lechería principalmente, otra hemoglobinuria de naturaleza no infecciosa, que no convendría confundir bajo el mismo título" y 2º no referirse a un mismo cuadro anatómico, en el supuesto de que pudiera tratarse de enfermedad provocada por un mismo agente, v. gr. las descripciones de las lesiones hepáticas macroscópicamente observadas por Blier (*loc. cit.*) y por Sanz (2ª Memoria, año 1922) que en sus partes pertinentes dicen "el hígado alterado por degeneración amarilla (sic), "piqueté", con pequeños focos hemorrágicos del tamaño de una arveja" (Blier) y "el hígado está algo blando de un color amarilloso más claro que lo normal y presenta *siempre* (subrayado por nosotros) un infarto que varía de tamaño entre ocho y veinticinco centímetros. Generalmente el infarto está ubicado en algunos de los extremos y tanto al exterior como al partirlo se ve de un color oscuro, es duro y tiene un olor picante muy característico" (Sanz).

Esta vaguedad de las designaciones desaparecerá cuando el estudio de las diferentes enfermedades confundidas bajo el mismo nombre haya precisado bien su cuadro clínico y sean conocidas la anatomía y la etiología.

Nuestras investigaciones fueron facilitadas por los estudios previos de B. Sanz, quien en varias publicaciones (*loc. cit.*) se ha ocupado de los distintos aspectos de la enfermedad designada por él mismo con el nombre de "Hemoglobinuria infecciosa", y fueron realizadas con material de casos de bovinos afectados de esta enfermedad y que presentan el signo inconfundible de su lesión hepática característica.

En una primera nota ⁽¹⁾ hemos referido el hallazgo de B.

(1) Presentada a la reunión del mes de mayo de 1930 a la Sociedad de Microbiología e Higiene de Chile. (Véase Rev. del Inst. Bact. T. V, N.º 6, pág. 721, 1930).

perfringens y manifestado la certeza de la existencia de otra especie patógena distinta de *B. perfringens* en la lesión hepática. En esta primera comunicación nos ocuparemos del estudio bacteriológico de aquella especie y de otra cepa de la misma especie, aislada de un foco necrótico de un segundo hígado estudiado.

I

Material de estudio. El material que hemos estudiado, si bien es escaso, pues se trata sólo de dos muestras, estaba constituido por especímenes típicos. Fueron obtenidos por la bondadosa intervención del Dr. Balbino Sanz, a quien agradecemos no sólo este auxilio sino también sus múltiples atenciones.

Al primer material — hígado de un animal muerto espontáneamente — hicimos ya referencia en la comunicación preliminar de páginas anteriores; en cuanto al segundo, provenía de un bovino sacrificado y estaba en condiciones óptimas para su estudio bacteriológico, pues fué investigado apenas extraído del animal.

Examen microscópico (ver microfotografías 1, 2 y 3). Los frotos de la región afectada teñidos con Gram permitieron ver un número grande de bacterios que corresponden a la siguiente descripción: *Formas vegetativas*, cilindros Gram positivos ⁽¹⁾ de extremos redondeados de tamaño variable entre 0,6-0,9 μ de ancho por 2,8-3,5 μ de largo. Muchos están ligeramente curvados. Frecuentemente solos; a veces apareados, en cuyo caso la superficie de separación aparece recta. Muy escaso número de cadenas de 3-6 elementos y menos aun en filamentos cortos (correspondiendo aproximadamente a 25 μ).

Formas esporuladas. En número relativamente grande (1/3 del total aproximadamente). Tamaño mayor en sus dos dimensiones que las formas vegetativas. Espora elipsoide que ocupa una posición subterminal en la mayor parte. Un pequeño número aparece en posición central. Muy escaso número de formas en huso. El esporangio tiene por ancho 0,8-1,6 μ y un largo de 4 a 5,3 μ . La espora un ancho 1 μ por 1,4 μ de largo.

(1) Como con frecuencia ocurre con los bacilos anaerobios, éste no toma fuertemente el Gram. Basta un exceso de lavado con alcohol para ser decolorados. La técnica usada fué la de violeta fenicado, lugol, alcohol.

No se observa cápsula típica. Sin embargo, en muchos puntos del preparado, aparece en torno de los gérmenes una débil zona clara que parece denunciar una cápsula.

En el hígado del primer caso estudiado fué observada una distribución y formas de los gérmenes que conviene señalar. En la zona subcapsular se encuentran gran número de bacterias que tienen los caracteres descritos más arriba. En la periferia de la necrosis, junto al parenquima aparentemente sano, se ve un pequeño número de bacterias y ninguna esporulada. En la parte central el cuadro es semejante, con la diferencia de existir un regular número de formas largas gruesas.

Aislamiento de bacterias anaerobias.

a) *Por siembra directa.* Del segundo caso por siembra directa en profundidad en agar al 2 % glucosado 1 % y adicionado de 25 % de extracto de hígado se aislaron las colonias lenticulares o de lentes imbricados.

El agar común al 2 % de pH 8 no es un medio favorable al desarrollo y no debe ser empleado. (Conviene usar regeneración reciente del agar de pH 7, adición de extracto de hígado, solidificación rápida).

La siembra de material calentado a 70° diez minutos y a 100° durante dos minutos permitió obtener el mismo germen.

En el primer caso ya hemos relatado los fracasos de las tentativas de aislamiento por siembra directa. La contaminación del material y la constitución del agar fueron las causas que determinaron este fracaso.

b) *Por siembra previa en medios líquidos.* El material del segundo caso, constituido por una sola especie, nos permitió probar la facilidad de multiplicación en el medio de Tarozzi con glucosa (a pH 6,5-7) y cubierto con parafina sólida para facilitar la permanencia de la anaerobiosis. Calentado el material 10' a 70° y 2' a 100°, también el desarrollo fué abundante.

El aislamiento por dilución en agar fué simple, pues se trataba en este segundo caso de una especie pura.

La siembra del primer material estudiado en medio de Tarozzi (a 45 y a 100°) y la dilución en agar del cultivo condujo al aislamiento de *B. perfringens* exclusivamente. Sólo la certeza de que existía otra especie, fundada en las características de los cultivos líquidos y la persistencia del poder patógeno de los cultivos neutralizados por el suero anti-*perfringens*,

nos indujo a repetir varias tentativas. Una siembra por dilución en agar hígado, del cultivo en Tarozzi de 10 días calentado 3' a 100° dió oportunidad de separar una colonia, que resultó diferente de *B. perfringens*.

Mencionaremos la posibilidad de aislar el germen por inoculación de cultivo en medio de Tarozzi a la cobaya por vía muscular. La dosis de 0.5 a 1 cm.³ fué suficiente para matarla dentro de las 24 horas. Los gérmenes pululan en el sitio de la inoculación y se hallan en regular número en la superficie de las serosas de la cavidad abdominal.

c) *Por inoculación directa a cobayas.* El material de infarto hepático a pesar de contener un número grande de gérmenes, es incapaz de provocar con una cantidad próxima a 0.05-0.1 gr. más que una pequeña y pasajera tumefacción cuando se lo inocula a la cobaya en la masa muscular de una pata. Este comportamiento diferencia a estos gérmenes anaerobios de sus congéneros agentes de la gangrena (*B. perfringens*, V. séptico, *B. oedematiens*, *B. histolyticus*, *B. Sordellii*) que son patógenos casi sin excepción para la cobaya, cuando se encuentran en número relativamente grande en la lesión muscular de una gangrena.

En resumen, de la lesión hepática del primer caso fueron aislados: 1) *B. perfringens* de colonia lenticular (L). 2) *B. perfringens* de colonia esférica coposa (B). 3) *Bacillus sp.* 10.

Y del segundo caso solamente un germen *Bacillus sp.* 14, que resultó idéntico al designado con *B. sp.* 10.

Aislamiento de bacterias aerobias.

En el primer caso fué aislada en los medios comunes una bacteria Gram negativa móvil, que debía hallarse en muy pequeño número en la lesión, pues en los preparados no fué observada ninguna forma semejante. En el segundo, las siembras aerobias permanecieron estériles.

II

Las dos cepas de *B. sp.* aisladas, y de las que sólo nos ocuparemos en esta memoria, fueron conservadas en agar hígado (agar al 1.5 %), en medio de Tarozzi y medio de v. Hibler.

Las formas vegetativas parecen tan lábiles que los cultivos en agar, al cabo de sólo 30 días no pudieron ser transplanta-

dos, obteniendo fácilmente subcultivos de los medios de Tarozzi y v. Hibler, donde se conservan la vitalidad y la virulencia sin aparente alteración.

Morfología de B. sp. en medios de cultivo líquidos.

Fueron estudiadas las dos cepas (10 y 14) cultivadas en medios Tarozzi ⁽¹⁾, medio de v. Hibler ⁽²⁾ y caldo enriquecido con extracto de hígado ⁽³⁾.

A las 18 horas de incubación, en tubos cubiertos con una capa de vaselina parafina (Hall) se obtienen cultivos abundantes, de los que se hacen preparados (se utiliza el material centrifugado y lavado). A las 48 horas se realiza una nueva observación.

Tinción con Gram. B. sp. 10 y B. sp. 14.

Medio de Tarozzi a las 18 horas: Bacilos Gram positivos. Algunas formas no han tomado el Gram. La casi totalidad está constituida por formas vegetativas. Extremos redondeados, gérmenes solos y dispuestos de a pares. Regular número de formas filamentosas (como hasta de 20 elementos). En pequeño número se observan esporangios esbozados y otros con la espora formada. El tamaño de las formas esporuladas es mayor que el de las vegetativas. (Microfotografías 4 y 5).

Medio de Tarozzi a las 48 horas: Puede decirse que la totalidad de las bacterias se hallan esporuladas. Esporas subterminales casi sin excepción. Se observa un número regularmente grande de formas Gram negativas, débilmente teñidas y granulosas. (Microfotografías 6 y 7).

Medio de v. Hibler, 18 horas: B. sp. 10 y B. sp. 14.

Bacilos Gram positivos en su mayor parte. Se observa un regular número de formas Gram negativas apenas teñidas. Escaso número de esporangios. Pocos filamentos y más cortos

(1) Se emplea caldo alcalino a pH 8 obtenido por adición de 5 % de Cl Na y 2 % de peptona Parke Davis a una maceración de carne en agua (1 parte en dos de agua) al que se agrega 20 a 25 % de carne cocida. Se esteriliza a 120° 30'. El pH del medio es poco inferior a pH 7.

(2) Medio de v. Hibler. 2 partes de agua con 1 % de peptona P. D. y 3 % de Cl Na, pH 7, 1 parte de papilla de cerebro de carnero. Se distribuye en tubos, se calienta a 100° media hora y se esteriliza 120°, 20'.

(3) Al caldo de pH 8 se agrega 25 % de extracto de hígado, obtenido por maceración de 1 parte de hígado en 2 de solución de Cl Na al 5 % durante 2 h. a 45°. Calentado a 80° y luego filtrado por papel y esterilizado por bájia Berkefeld.

que en el medio de Tarozzi. Se ven algunas cadenas de elementos muy anchos y cortos. (Microfotografías 8 y 9).

Medio de v. Hibler, 48 horas.

Muchas formas esporuladas aunque en menor número que en el medio de Tarozzi. Formas vegetativas teñidas por Gram y otras granulosas apenas coloreadas por las fucsina; se ven pocos esporos libres. (Microfotografías 10 y 11).

Medio de caldo hígado. *B. sp.* 10 y *B. sp.* 14.

A las 18 horas.

Sólo formas vegetativas. Se ven formas filamentosas. (Microfotografías 12 y 13).

A las 48 horas.

La mayor parte no ha tomado el Gram y está teñido irregular y débilmente por la fucsina. Las formas teñidas por el Gram aparecen mucho más grandes. (Microfotografías 14 y 15).

Observación con nigrosina.

Los preparados con nigrosina que han servido para la determinación de las dimensiones de la bacteria, permitieron hacer las siguientes observaciones, que juzgamos de interés.

En el medio de Tarozzi, donde la esporulación es muy marcada, se ven los esporangios en la forma curiosa de un comeña, siendo la espora más angosta que el cuerpo bacilar, el que se ensancha desde la espora hacia la extremidad.

Este aspecto puede ser imaginado por las dimensiones del germen (ver pág. 805).

En el medio de caldo hígado se ven, a las 48 horas, la casi totalidad de las bacterias impregnadas por el colorante de tal modo que son apenas visibles. Hay un número muy reducido de gérmenes que tiene su aspecto habitual, esto es que aparecen completamente claros, en el fondo azulado de la nigrosina. Estas formas son equivalentes a las que, respectivamente, no se tiñen y se tiñen por el Gram.

Esporas. La esporulación aunque bien visible por la tinción por Gram fué investigada por el método de Dörner. Los resultados de estas observaciones se consignan a continuación.

Medio Tarozzi, 18 horas. *B. sp.* 10 y *B. sp.* 14.

Número relativamente pequeño de bacterias con espora subterminal. Algunas esporas perfectamente diferenciadas, otras tienen una zona roja alrededor de un núcleo más inten-

samente teñido. La coloración roja se continúa a lo largo del esporangio en forma irregular.

Medio Tarozzi a las 48 horas. B. sp. 10 y B. sp. 14.

Gran número de formas esporuladas típicamente teñidas. No se ven esporas libres. (Microfotografías 16 y 17).

Medio v. Hibler. 18 y 48 horas.

Caracteres semejantes a los que presentan los preparados del medio de Tarozzi. El número de formas esporuladas es mucho menor. No se ven esporas libres.

Caldo hígado. 18 y 48 horas.

No se observan esporas ni formas con tendencia a la esporulación.

La forma del esporangio tiene apariencia de plectridio en los preparados coloreados, y de cometa o de garrote en los teñidos por nigrosina. La forma de la espora es elipsoide.

Dimensiones.

Las dimensiones fueron determinadas en preparados de fondo oscuro con nigrosina.

a) De las formas vegetativas.

- 1) En medio de Tarozzi a las 18 horas. $0,8\mu$ de ancho por $3,5\mu$ de largo. Hay un número relativamente grande de formas de $2,2\mu$ y de 4μ de largo. Excepcionalmente se ven cilindros de 1μ por 9μ .
- 2) En medio de v. Hibler a las 18 horas. $1,2\mu$ de ancho por 2μ de largo. Se ven, en regular número, gérmenes de $2,8-3,5\mu$ de largo. Algunas alcanzan a $5,2\mu$. Excepcionalmente se ven formas muy anchas de $2,1\mu$ por $4,5\mu$ de largo.
- 3) En caldo extracto de hígado a las 18 horas. Ancho de $0,9\mu$ por $3,5\mu$ de largo. Número grande formas de $2,5\mu$ de ancho por $4,5\mu$ de largo. Menos frecuentes formas cortas de $1,7\mu$.

En el mismo medio a las 48 horas, como ya dijimos, se ven muchas formas impregnadas por nigrosina y pocas formas completamente claras. Las dimensiones son, respectivamente: $0,9\mu$ de ancho por 3 a $4,5\mu$ de largo y $0,9\mu$ de ancho por 4,2 a $5,6\mu$ de largo. Hay formas claras de $1,5\mu$ de ancho por 2,8 de largo.

b) *Del esporangio.* Dimensiones determinadas en cultivo de Tarozzi a las 48 horas. El ancho fué medido en el punto de mayor dimensión y corresponde a 1,5-1,7 μ . El largo es de 5,9 a 9 μ .

c) *De la espora.* Ancho 1.2-1.3 μ y largo 1.8 μ .

Cilias.

En los medios de cultivos líquidos es relativamente fácil demostrar la existencia de cilias. La pequeña dificultad que ocasiona la aglutinabilidad y colaje de los gérmenes cuando se les centrifuga para separarlos del medio de cultivo, fué eliminada suspendiéndolos en una solución muy débil de bicarbonato de sodio. La tinción por el método de Casares Gil revela la presencia de cilias peritricas en número relativamente grande. Mejores preparados se obtienen, como sucede siempre con todas las bacterias, con el método de Zettnow. (Microfotografía 18).

Las cilias que prácticamente cubren la superficie del bacilo, tienen el aspecto curioso de raicecillas. La observación en fondo oscuro con condensador bicéntrico de Leitz permitió ver bacilos con una cilia en un extremo y en un caso 3 cilias en tres puntos distintos. Estas cilias tenían un leve movimiento ondulatorio ⁽¹⁾.

Cápsula.

La tinción de la cápsula no fué nunca conseguida, con el método de Huntoon, único ensayado.

Se ve, sin embargo, alrededor de la bacteria, una zona clara no muy ancha que parece indicar la existencia de una cápsula. Recordemos que este carácter fué también observado en los preparados hechos con material de la lesión hepática del bovino.

Las bacterias teñidas con el método de Zettnow aparecen frecuentemente dentro de una aureola coloreada fuertemente de amarillo naranja, por dentro de la que pasan las cilias, que a veces no se pueden distinguir precisamente por ese magma amarillo.

Los preparados de cilias tan nítidos que reproducen las microfotografías fueron obtenidas con bacterias suspendidas en bi-

(1) Esta observación fué facilitada por el señor Nikelsky, a quien agradecemos su atención.

carbonato de sodio y por el uso de un mordiente relativamente débil.

Parece, pues, tratarse de una especie que posee una cápsula, o que por lo menos tiene una secreción mucosa que hace las veces de tal.

Forma de colonia. B.sp. 10 y B.sp. 14.

a) En profundidad.

El desarrollo en agar al 2 % glucosado o enriquecido con extracto de hígado y de un pH próximo a 8 es en general poco abundante.

En los tubos sembrados con mucho material y en el primer día de incubación las colonias son muy pequeñas y aparecen como hilachas de un tejido. Este aspecto cambia en 48-72 horas, y en los tubos con número escaso de colonias, éstas aparecen como lentes de bordes bien nítidos. En general las colonias no son muy opacas y los bordes aparecen translúcidos. La forma lenticular es biconvexa o convexa cóncava. Algunas tienen añadido a la forma lenticular una protuberancia o dos, y otras aparecen como lentes imbricados de igual o distinto tamaño. El diámetro suele alcanzar a 2 milímetros. La observación de las colonias debe hacerse en tubos con poco material, de otra manera la forma no aparece constante. (Ver lámina XXXVIII, fig. 20, cultivos en agar glucosado).

b) En superficie.

Crece en agar o agar hígado con dificultad grande. En 48 horas las colonias aparecen como cabezas de alfiler. Son transparentes y de bordes lisos. (Ver fotografía 19).

Movilidad.

La movilidad fué investigada repetidas veces en medios distintos, desde el comienzo del desarrollo (4 horas + o —) hasta su desarrollo óptimo, sin poder observar nunca ni un movimiento de agitación browniana.

Siempre fué empleado el método del tubo capilar de caras paralelas, bien lleno con el cultivo y con sus extremos cerrados con parafina. Si la inmovilidad se debe a una característica del germen o a la acción de la pequeña cantidad de oxígeno absorbido a las paredes del tubo capilar, no podemos decirlo. Sólo anotamos el dato de la falta de movilidad con la intención de dar un carácter que pueda servir a la identificación o reconocimiento de la especie.

Resistencia de las esporas al calor.

Fué determinado por calentamiento a 100° durante tiempos variables de 5' a 1 h. y 30'. Se empleó un cultivo de 48 horas en caldo Tarozzi en el que *B. sp.* esporula muy intensamente. La siembra del material calentado se hizo en caldo Tarozzi glucosado al 1 % y esterilizado bajo capa de parafina vaselina.

Cepa	CALENTAMIENTO a 100°					
	5'	10'	20'	40'	60'	90'
	DESARROLLO					
<i>B. sp.</i> 10	+ 24 h.	+ 120 h.	neg.	neg.	neg.	neg.
<i>B. sp.</i> 14	+ 24 h.	+ 24 h.	+ 24 h.	+ 120 h.	neg.	neg.

B. sp. 14 resiste 10' a 100° y *B. sp.* 10, 40' a la misma temperatura.

pH óptimo y pH límite de desarrollo.

Se estudia el óptimo de pH para desarrollo en un caldo con 2 % peptona P. Davis esterilizado en tubos con parafina vaselina y sembrados aun calientes a 50° en un cultivo de medio Tarozzi de 24 horas.

En el siguiente cuadro están los resultados observados a las 24 horas de incubación:

Medio a pH...	5.5	6	6.4	6.8	7.2	7.8	5.5	6	6.4	6.8	7.2	7.8
	DESARROLLO						PRODUCCION DE GAS					
<i>B. sp.</i> 10	0	4	3	3	2	2	0	4	0	3	0	0
<i>B. sp.</i> 14	0	4	3	3	2	2	0	4	0	3	0	0

Las cifras indican la intensidad del desarrollo y la producción de gas. (4 corresponden a un desarrollo exuberante). La producción de gas guarda una estrecha relación con el grado de desarrollo.

El óptimo está próximo a pH 6 y el límite interior entre pH 5.5 y el óptimo.

Un comportamiento semejante fué apreciado en caldo adicionado de extracto de hígado. El óptimo pareció desplazado a pH 6.4.

Temperatura de desarrollo.

Se investigó el desarrollo de *B. sp. 10* y *B. sp. 14* a distintas temperaturas en caldo simple y glucosado de pH 6 recién esterilizados bajo vaselina parafina y sembrados a 50° con cultivo de 48 horas en medio de Tarozzi.

Los resultados están en el siguiente cuadro:

Cepa	Caldo	INCUBACION DURANTE											
		24 horas				48 horas				120 horas			
		10°	18°	32°	37°	10°	18°	32°	37°	10°	18°	32°	37°
<i>B. sp. 10</i>	Simple	0	0	2	5 (1)	0	0	15	15	0	0	15	15
	1% glucosa.	0	0	2	15	0	0	20	20	0	0	20	20
<i>B. sp. 14</i>	Simple	0	0	0	15	0	0	15	15	0	0	15	15
	1% glucosa.	0	0	0	15	0	0	20	20	0	0	20	20

(1) Esta y las demás cifras indican el número de mil millones de gérmenes por cm. cúbico, de medio de cultivo determinado por opacidad en comparación con testigos.

Los intervalos de las temperaturas estudiadas son un poco amplios y es difícil precisar la temperatura límite. Sin embargo la escasez de desarrollo a las 24 horas a 32° para el germen *B. sp. 10* y la lentitud extrema con que crece el *B. sp. 14* a 32° hacen verosímil que la temperatura límite no esté muy por debajo de esta cifra.

Se comprobó que los tubos que a 10° y 18° que habían permanecido estériles, desarrollaban colocados a 37°.

Caracteres culturales y acción sobre los medios de cultivo.

En los medios líquidos peptonados comunes desarrollan ambas cepas *B. sp. 10* y *B. sp. 14* a 37° con facilidad, si la anaerobiosis es perfecta. Esto es, si el medio está recién esterilizado, tiene alguna substancia reductora, o se encuentra protegida por un buen cierre (vaselina parafina o cierre de bolita de Hall).

Caldo simple. (Peptonado 2 % con agua de carne fermentada por levadura, pH variable).

Desarrollo abundante a 37° de 24 horas a pH entre 6 y 6.8. Por encima de pH 7, el desarrollo menor. La sedimentación es escasa en los medios ácidos y el caldo permanece turbio aun por centrifugación. Hay diferencias pequeñas entre las dos cepas. A los 13 días hay un sedimento que se incorpora fácilmente al medio por agitación. El caldo queda siempre ligeramente turbio.

Caldo glucosado. Desarrollo muy abundante y formación de gas.

Caldo adicionado de extracto de hígado. El extracto de hígado favorece mucho el desarrollo y su adición simplifica las precauciones de anaerobiosis que son indispensables para obtener desarrollo en los medios simples, al cabo de 13 días el caldo está ligeramente turbio, el sedimento es muy abundante y la consistencia es un poco mucosa.

Este mismo caldo con glucosa muestra aún más desarrollo y mayor producción de gas.

Caldo Tarozzi. Desarrolla fácilmente aunque menos intensamente que en el caldo hígado. Al cabo de 13 días el caldo está ligeramente turbio y hay un sedimento mucoso sobre la carne.

El color de la carne es rojizo (ya a los pocos días de desarrollo), y está digerida.

No puede compararse esta digestión a la provocada por *B. sporogenes* o *B. histolyticus*, aseméjase más a la de *B. Sordelli*.

Medio de v. Hibler. Desarrollo bien apreciable por la turbidez; a los 13 días el medio queda completamente claro, no observándose mayores cambios en la papilla de cerebro.

Gelatina. (Con extracto de hígado). El desarrollo es abundante y tiende a sedimentar rápidamente formando copos. La licuación tiene lugar dentro de las 24 horas. Al cabo de 13 días el medio está apenas turbio y el abundante sedimento es ligeramente mucoso.

Caldo cubo de huevo. (Con y sin extracto de hígado). Desarrollo abundante. Al cabo de 13 días los medios apenas turbios y sedimento ligeramente mucoso.

Las aristas del cubo de huevo están aclaradas; la consistencia muy disminuida permite pulverizarlo con facilidad.

Caldo con sangre de conejo. Desarrollo abundante y hemolisis intensísima. Al cabo de 13 días el medio de color de vino Borgoña, está claro. Hay un sedimento muy abundante.

Acción sobre leche. En leche esterilizada y en buenas condiciones de anaerobiosis el desarrollo no es apreciable ni en los 13 días de permanencia a 37°.

Para estudiar la acción sobre la leche nos vimos precisados a facilitar el desarrollo por adición de carne y de caldo a la leche (en forma análoga a la que A. Rottgardt emplea para la diferenciación de *B. Chauvoei*, de V. Septico) 10 cm.³ de leche, 5 cm.³ de caldo y 1 gramo de carne son esterilizados a 120°, bajo vaselina parafina. En 48 horas hay digestión de la caseína sin coagulación. A los cuatro días el suero sobrenadante está claro y sobre la carne queda un residuo de sustancia aun no digerida.

La acidificación de este medio es intensa llegando a pH 6 para *B. sp.* 14 y a pH 6.3 para *B. sp.* 10.

En agar al 2 % glucosado al 1 %. El desarrollo es escaso y sólo algunos tubos muestran producción de gas.

En agar glucosado con extracto de hígado. El desarrollo es abundante y hay producción de gas.

Producción de H₂ S. En caldo extracto de hígado fué posible revelar la producción de H₂ S.

Reducción de nitratos. Los nitratos son reducidos a nitritos en caldo hígado.

Producción de indol. No produce indol en caldo hígado.

Todos los cultivos tienen desde las primeras horas de desarrollo un olor fétido manifiesto. Recuerda algo al *B. oedematiens* o al *B. Sordelli*. Difiere de todos los que conocemos, siendo, como es natural, difícil precisar los caracteres de la fetidez.

Acción sobre sustancias hidrocarbonadas.

La acción sobre hidratos de carbono y otras sustancias hidrocarbonadas fué estudiada en un medio Tarozzi con agua de carne fermentada por *B. perfringens*, hervida y filtrada, agre-

gado de 2 % de peptona Parke Davis, y carne hervida, lavada repetidas veces y secada luego. El medio esterilizado a 120° tiene después de la esterilización un pH igual a 7.4.

Se regenera el medio antes de sembrar, se enfría; se agrega solución estéril de la substancia a estudiar de tal manera que la concentración final sea de 1 %, se siembra y se cubre con parafina vaselina. Como semilla se emplea un cultivo de 24 horas de caldo Tarozzi común.

A las 24 horas a 37° el desarrollo es abundante en todos los tubos, sin que haya gas en ninguno.

A las 48 horas aparece con el *B. sp.* 10, gas en glucosa, levulosa, manosa y con el *B. sp.* 14 gas en los mismos y además en maltosa.

A las 84 horas ambas cepas han fermentado, glucosa, levulosa, manosa, maltosa e inosita. *B. sp.* 14 ha fermentado además glicerina.

Los cultivos que en general son abundantes, lo parecen mucho más en los medios fermentados. En estos medios la sedimentación es escasa, debido, sin duda, a la mayor acidez.

La única diferencia entre ambas cepas es hasta este momento su comportamiento frente a la glicerina que sólo el *B. sp.* 14 fermenta pero no puede decirse que éste sea debido a una diferencia intrínseca. Sobre esto volveremos en una comunicación próxima.

La formación de gas está acompañada de una producción de ácido acusada por la variación de pH. El medio sin adición de substancia alguna es acidificado de pH 7.4 a pH7, el cuadro siguiente reproduce el protocolo en detalle.

Sustancia agregada al medio en pro- porción del 1 %	PRODUCCION DE GAS Observación a						Variación de pH a las		Desarrollo a las	
	24 horas		48 horas		84 horas		120 horas		120 horas.	
	<i>B. sp.</i> 10	<i>B. sp.</i> 14	<i>B. sp.</i> 10	<i>B. sp.</i> 14	<i>B. sp.</i> 10	<i>B. sp.</i> 14	<i>B. sp.</i> 10	<i>B. sp.</i> 14	<i>B. sp.</i> 14 (1)	<i>B. sp.</i> 10 (1)
Medio sin sembrar ..	—	—	—	—	—	—	7.4	7.4	—	—
Medio sembrado sin adición de sustancia alguna	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	M. A.	M. A.
Glucosa	O	O	+	+	+	+	5.4	5.4	L. T.	L. T.
Manosa	O	O	+	+	+	+	6.2	6.0	L. T.	L. T.
Levulosa	O	O	+	+	+	+	6.4	6.4	L. T.	L. T.
Maltosa	O	O	O	+	+	+	6.6	6.6	L. T.	L. T.
Inosita	O	O	O	O	+	+	6.0	6.0	L. T.	L. T.
Glicerina	O	O	O	O	O	+	7.0	6.0	L. T.	L. T.
Sorbita	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	M. A.	M. A.
Arabita	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	„	„
Dulcita	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	„	„
Manita	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	„	„
Xilosa	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	„	„
Arabinosa	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	„	„
Ramnososa	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	„	„
Galactosa	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	„	„
Sacarosa	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	„	„
Lactosa	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	„	„
Rafinosa	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	„	„
Inulina	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	„	„
Glucogeno	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	„	„
Almidón	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	„	„
Salicina	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	„	„
Amigdalina	O	O	O	O	O	O	7.0	7.0	„	„

(1) Las letras indican: M desarrollo mediano L desarrollo lujuriente, T medio turbio, A medio aclarado o apenas turbio.

En resumen puede decirse que *B. sp.* fermenta con formación de ácido y gas, entre los alcoholes.

- 1) Glicerina (?).
- 2) Inosita.

Entre los monosacáridos sólo las hexosas:

- 1) Glucosa.
- 2) Levulosa.
- 3) Manosa.

No fermenta galactosa, ni las pentosas, xilosa y arabinosa y entre los disacáridos sólo.

- 1) Maltosa.

La serie de los cuerpos estudiados que no son atacados puede verse fácilmente en el cuadro de la página 812.

Resumen de los caracteres principales de B. sp. 10 y B. sp. 14.

Cilindro, anaerobio, ciliado esporulado. Inmóvil. Gram positivo. Licúa gelatina, digiere caseína sin coagular, enrojece y digiere la carne del medio de Tarozzi. No altera el medio de v. Híbler. Hemoliza glóbulos rojos. Produce compuestos sulfurados. Reduce nitritos. No forma indol. Fermenta glucosa, levulosa, manosa, maltosa e inosita y aparentemente glicerina, con formación de gas y ácidos. No fermenta sorbita, arabita, dulcita, manita, xilosa, arabinosa, ramnosa, galactosa, sacarosa, rafinosa, inulina, glucógeno, almidón, salicina, amigdalina.

II

Ubicación en la sistemática.

La morfología, el aspecto cultural y su acción sobre los medios de cultivo permiten diferenciarlo con facilidad de los anaerobios del género *Bacillus* que se encuentran frecuentemente en las lesiones gangrenosas.

Nos parece superfluo puntualizar las diferencias con *B. perfringens*, *Vibrion séptico*, *B. oedematiens*, *B. histolyticus*, *B. sporogenes*, *B. tirosynogenes*, *B. centrosporogenes*, *B. putrificus*, *B. Sordellii*, *B. tertius*, *B. fallax*, *B. egens*, *B. Chauvæi*, *B. aërofoetidus*. Tampoco puede identificarse con gérmenes menos

conocidos o de menor difusión ⁽¹⁾ como *B. anaerobius hemolyzans* ⁽²⁾ (Markoff), *B. œdematogenes* ⁽²⁾ (Ukill), *B. anaerobius* (Vaucher, Boez, Lanzemberg, Kehlstadt) ⁽²⁾.

En cambio, una mención especial merece la especie descrita por L. R. Vawter y Edward Records, en 1926. (Journal of the American Veterinary Association, 1926, pág. 494 y siguientes), al ocuparse de la "Ictero-hemoglobinuria de los bovinos" y designada como *C. hemolyticus bovis*. Analizaremos en esta comunicación sólo el aspecto bacteriológico del problema.

El germen descrito por Vawter y Records tiene en el foco del hígado la siguiente morfología: "bacilo Gram negativo, grande, esporulado". La microfotografía de pág. 495 (Vawter y Records) no permite ver que la forma más común que se observa en la lesión corresponda a la descripción anterior. Más parece tratarse de formas largas e incurvadas y sin esporas.

Las dimensiones de los gérmenes cultivados, suponemos que las formas vegetativas, corresponden aproximadamente a las determinadas por nosotros en *B. sp.*

La posición terminal de los esporos que a veces existen en el *B. hemolyticus bovis* no fué nunca vista en ningún caso de *B. sp. 10* ni *B. sp. 14*.

Otra diferencia la constituye la movilidad observada por Vawter y Records y su ausencia total a pesar de repetir los ensayos innumerables veces en las cepas *B. sp. 10* y *B. sp. 14*.

Las diferencias observadas en la tinción por Gram (tinción negativa de *B. hemolyticus bovis* y positiva en *B. sp. 10* y *B. sp. 14*) no son de tal orden que puedan establecer por sí solas una separación de las dos especies.

Las cilias se encuentran en número de 6 a 14 en *B. hemolyticus bovis* y tienen un aspecto ondulado rígido con 6 espiras. *B. sp. 10* y *B. sp. 14* revelan una disposición poco común de cilias que aparecen muy numerosas y de una sinuosidad caprichosa y sin espiras regularmente formadas.

Los cultivos en caldo revelan algunas diferencias: *B. hemolyticus bovis*: 1º, produce mucho gas; 2º, autoaglutina rápidamente; 3º, no tiene acción proteolítica ni en tres meses.

(1) No podemos tampoco referirnos a estas descripciones como si fueran de especies nuevas, pues la literatura sobre el sujeto es escasa y no tenemos experiencia personal sobre cada una de ellas.

(2) Citados en Weinberg y Ginsbourg "Données recentes sur les microbes anaerobies". Masson. París, 1927.

Se asemejan en la propiedad hemolítica y en el enrojecimiento de las partículas de carne.

La forma de la colonia en agar profundo difiere de manera evidente, mientras *B. sp.* 10 y *B. sp.* 14 dan colonias lenticulares. El *C. hemolyticus bovis* da colonias "que aparecen como masas densas, algodonosas con filamentos periféricos cortos", (página 499).

La fermentación de sustancias hidrocarbonadas también los separa:

	<i>C. hemolyticus bovis</i>	<i>B. sp.</i> 10 y <i>B. sp.</i> 14
Glucosa	Fermenta	Fermenta
Levulosa	Fermenta	Fermenta
Galactosa	Fermenta	No fermenta
Maltosa	No fermenta	Fermenta
Glicerina	Fermenta	Fermenta (<i>B. sp.</i> 14); no fué observada fermentación con <i>B. sp.</i> 10.

El pequeño número de caracteres determinados por Vawter y por Records nos impide juzgar definitivamente de la identidad o diferencia del *C. hemolyticus bovis* y de las cepas *B. sp.* 10 y *B. sp.* 14 estudiadas por nosotros.

Sin embargo (y siempre que no se trate de variantes de una misma especie) ambos gérmenes deben ser considerados por el momento diferentes. Conservaremos, pues, la designación de *Bacillus sp.* en el curso de este trabajo.

SUMARIO

Del foco necrótico del hígado de 2 bovinos, muertos por hemoglobinuria, se aislaron: de ambos una especie designada provisoriamente como *Bacillus sp.* y de uno, dos variedades de *B. perfringens*.

El *Bacillus sp.* puede definirse así: bacterio cilíndrico de extremos redondeados, anaerobio que toma el Gram, con muchas cilias peritricas, con espora subterminal, y raramente central. Inmóvil. Verosímilmente capsulado o segregando una sustancia mucosa. Las formas vegetativas en los medios de cul-

tivo tienen: 0.8μ de ancho por 3.5μ de largo, variando hasta 2.1 y 9μ respectivamente como límites extremos. La espora elipsoide tiene $1.2 - 1.3\mu$ de ancho por 1.8μ de largo, y su esporangio $1.5 - 1.7\mu$ de ancho por 5.6 a 9μ de largo.

La forma de su colonia en agar profundo es lenticular.

Sus esporas resisten de 10 a 40' la ebullición.

Su desarrollo óptimo se obtiene a pH 6 y es limitado por pH 5.5.

El desarrollo se hace con lentitud a 32° ; a 18° no hay desarrollo alguno. A 37° desarrolla rápida y abundantemente.

Crece fácilmente y con mucha intensidad en los medios comunes hasta pH 6.5 - 6.8. El medio queda turbio y la tendencia a sedimentar es escasa.

No esporula en los medios con extracto de hígado. Por el contrario, lo hace fácilmente en el medio de Tarozzi o de v. Hibler.

Licúa gelatina, digiere caseína sin coagularla previamente, enrojece y digiere la carne en el medio de Tarozzi, aclara los bordes del cubo de huevo y lo hace friable. No altera el medio de v. Hibler. Hemoliza con intensidad los glóbulos rojos de vaca y oveja. Produce compuestos sulfurados. Reduce nitratos a nitritos y no produce indol.

Fermenta produciendo gas y ácidos en los siguientes cuerpos: glucosa, levulosa, manosa, maltosa, inosita y glicerina (?). No fermenta sorbita, arabita, dulcita, manita, xilosa, arabinosa, ramnosa, galactosa, sacarosa, lactosa, rafinosa, inulina, glucógeno, almidón, salicina y amigdalina.

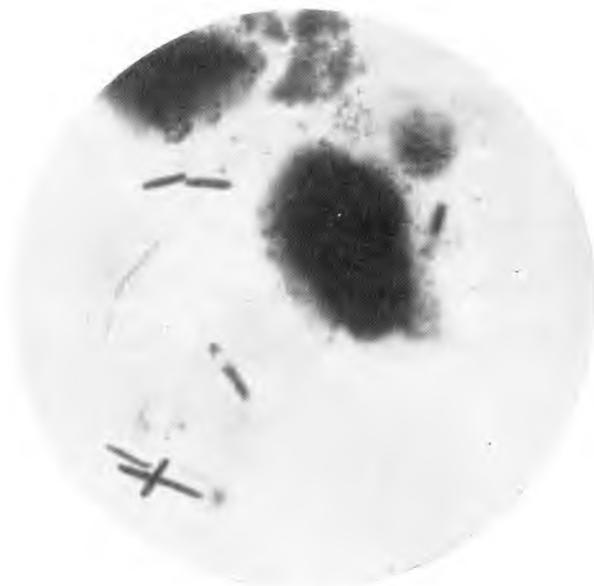
No pudiendo identificar por el momento esta bacteria con la especie designada *C. hemolyticus bovis* ⁽¹⁾ por Vawter y Record conservaremos su designación primera de *Bacillus sp.* (?) en el curso de nuestros trabajos.

EXPLICACION DE LAS LAMINAS

LÁMINA XXIX

- Fig. 1. Frotis de hígado, primer caso (región subcapsular). Tinción con Gram (1:1400).
„ 2. Frotis de hígado, primer caso (centro de la necrosis). Tinción con Gram (1:1400).

(1) Designación inválida por ser trinomial.

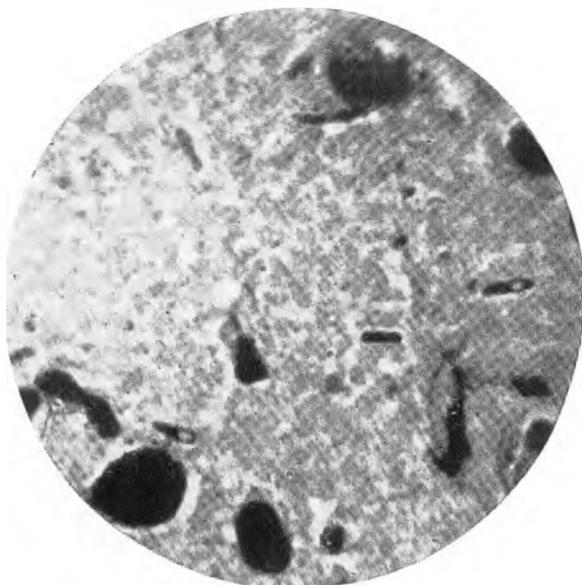


1



2

DR. KUHN, FOT.



3

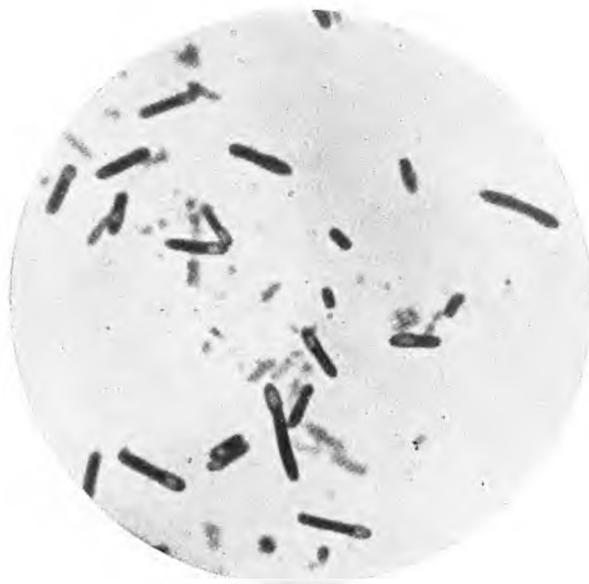


DR. KUHN, FOT.

4



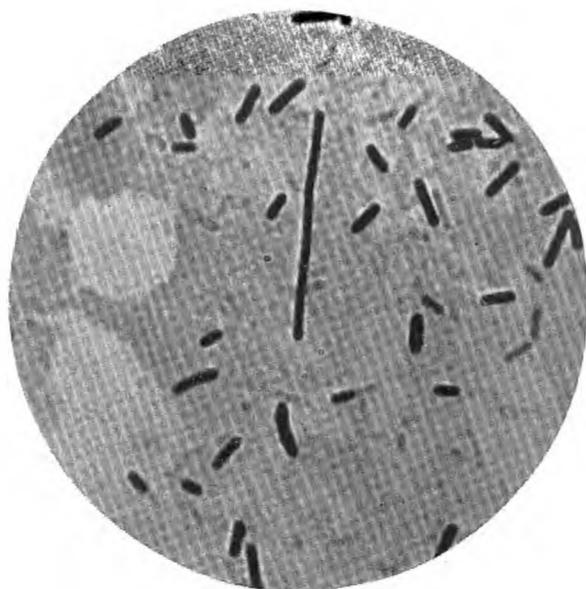
5



6



7



DR. KUHN, FOT.

8

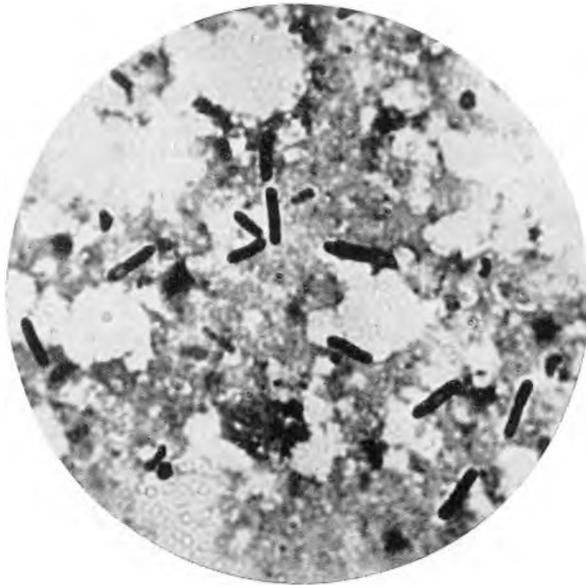


9



DR. KUHN, FOT.

10

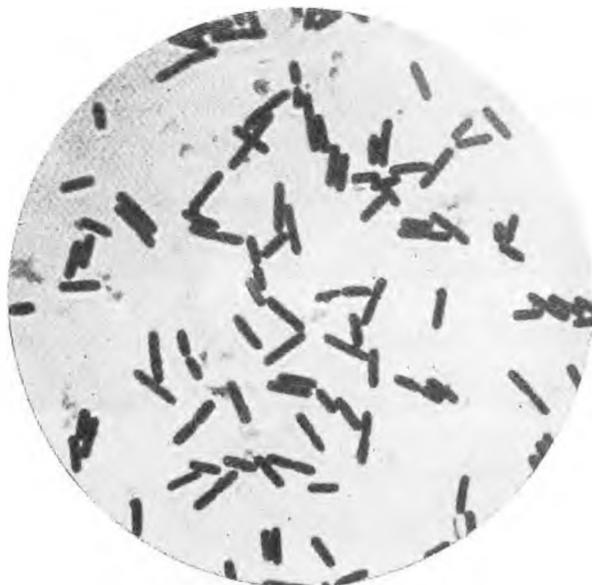


11



DR. KUHN, FOT.

12

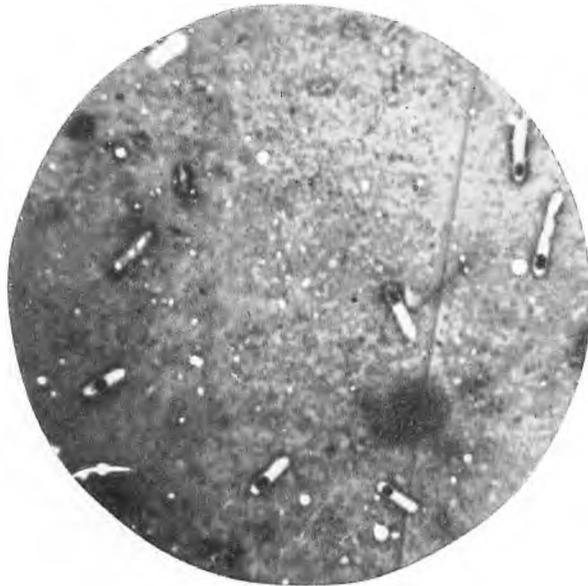


13





15

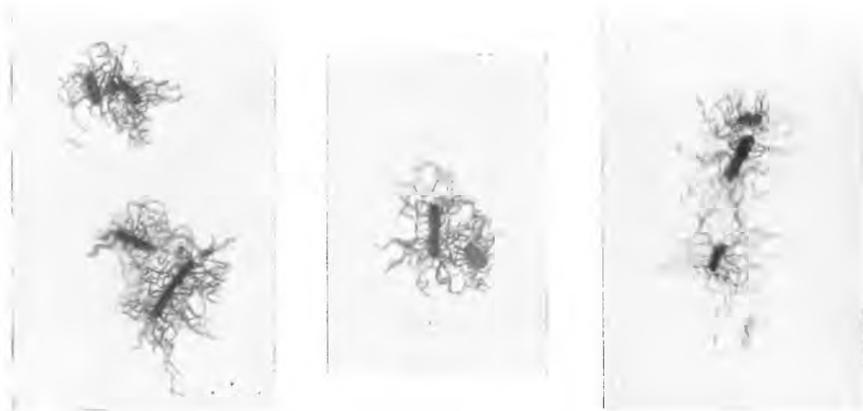


DR. KUHN, FOT.

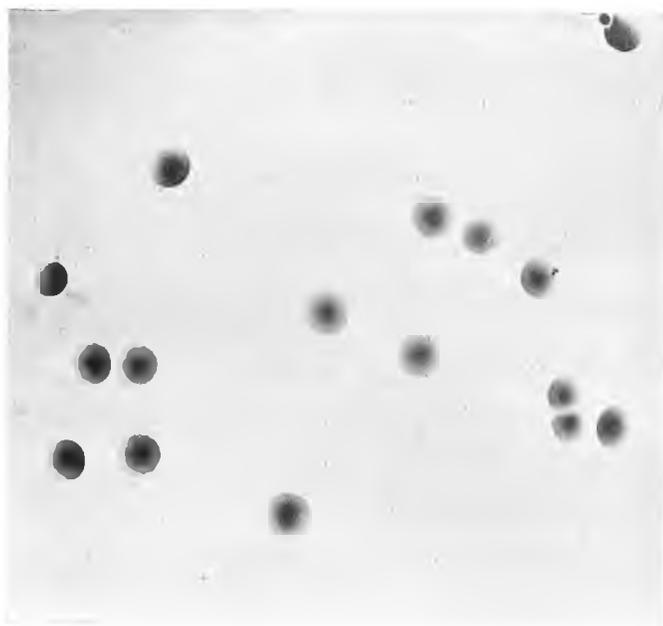
16



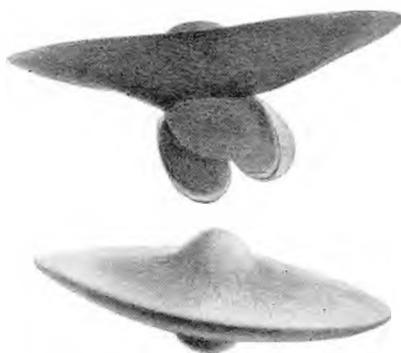
17



18



19



DR. KUHN, FOT.

20

LÁMINA XXX

- Fig. 3. Frotis de hígado, segundo caso (región subcapsular). Tinción con Gram (1:1400).
„ 4. Bacillus sp. 10 cultivo de 18 horas. Medio Tarozzi. Tinción con Gram (1:1400).

LÁMINA XXXI

- Fig. 5. Bacillus sp. 14 cultivo de 18 horas. Medio Tarozzi. Tinción con Gram (1:1400).
„ 6. Bacillus sp. 10 cultivo de 48 horas. Medio Tarozzi. Tinción con Gram (1:1400).

LÁMINA XXXII

- Fig. 7. Bacillus sp. 14 cultivo de 48 horas. Medio Tarozzi. Tinción con Gram (1:1400).
„ 8. Bacillus sp. 10 cultivo de 18 horas. Medio de v. Hibler, con Gram (1:1400).

LÁMINA XXXIII

- Fig. 9. Bacillus sp. 14 cultivo de 18 horas. Medio de v. Hibler, con Gram (1:1400).
„ 10. Bacillus sp. 10 cultivo de 48 horas. Medio de v. Hibler, con Gram (1:1400).

LÁMINA XXXIV

- Fig. 11. Bacillus sp. 14 cultivo de 48 horas. Medio de v. Hibler, con Gram (1:1400).
„ 12. Bacillus sp. 10 cultivo de 18 horas. Caldo hígado. Tinción con Gram (1:1400).

LÁMINA XXXV

- Fig. 13. Bacillus sp. 14 cultivo de 18 horas. Caldo hígado. Tinción con Gram (1:1400).
„ 14. Bacillus sp. 10 cultivo de 48 horas. Caldo hígado. Tinción con Gram (1:1400).

LÁMINA XXXVI

- Fig. 15. Bacillus sp. 14 cultivo de 48 horas. Caldo hígado. Tinción con Gram (1:1400).
„ 16. Bacillus sp. 10 cultivo de 48 horas. Caldo Tarozzi. Tinción por Dörner. Gram (1:1400).

LÁMINA XXXVII

- Fig. 17. Bacillus sp. 14 cultivo de 48 horas. Caldo Tarozzi. Tinción por Dörner. Gram (1:1400).
„ 18. Bacillus sp. 14 cultivo de 9 horas. Caldo Tarozzi. Tinción por Zettnow (1:900).

LÁMINA XXXVIII

- Fig. 19. Fotografía de colonias en superficie de agar 1:20.
„ 20. Dibujo de colonias en profundidad 1:50.

NOTA. — Todas las microfotografías que acompañan este trabajo y las incluídas en la 4ª memoria han sido hechas por el doctor M. Kuhn, por lo que le quedamos agradecidos.