Sobre la "Hemoglobinuria de los bovinos".

Complejidad de la flora anaerobia de la lesión hepática

Por A. Sordelli, M. Prado y J. Ferrari

(Cuarta memoria)

(*Con las láminas XXXIX y XL*)

Los estudios de la hemoglobinuria de los bovinos realizados en Chile por el doctor B. Sanz le han conducido a considerar la flora de la lesión hepática como constituída en primer término por *Cl. Welchii* (*B. perfringens*) y por un anaerobio facultativo no clasificado. (Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 36, 1928, pág. 243). Al *B. perfringens* atribuye Sanz el rol de agente etiológico de la enfermedad.

Los autores americanos Vawter y Records [1] [2] identifican la enfermedad del ganado de Chile con la icterohemoglobinuria de los bovinos de Nevada, [3] y citan un número grande de bacterias encontradas en la lesión hepática de los bovinos que sucumben en esa región.

En cuatro casos fué hallado *B. botulinus*, dos veces tipo A y dos veces tipo B asociado con otros organismos. *B. oedematiens* en un caso. El *B. histolitycus* también fué hallado, así como otros anaerobios no clasificados. *B. sporogenes* fué aislado en la mayoría de los casos y lo mismo *B. Welchii* (*B. perfringens*) tipo IV.

Esta última especie fué hallada en animales que presentaban signos de la enfermedad y que fueron sacrificados para el estudio bacteriológico.

---

(1) Records and Vawter. J. A. V. A. 1921-1922, t. 60, p. 159.

(2) Vawter and Records, J. A. V. A. 1926, t. 68, p. 494.

(3) No indican en qué fundamentan esa identificación.

Recibido para publicarse, octubre 1930.

En general todas las investigaciones de estos anaerobios fueron realizadas con animales cuya muerte no databa de más de cuatro horas. Wood (citado en Wawter y Records, 1921) ha hallado casi constantemente *B. perfringens* en las lesiones hepáticas.

En 1926 Vawter y Records describen una especie con el nombre de *Cl. hemolyticus bovis* que reune todos los caracteres y condiciones de agente etiológico, y como tal lo consideran.

Estos autores encuentran en cuatro casos también una especie de cuyas propiedades patógenas hacen mención en carta dirigida a I. Hall, quien reconoce las cepas enviadas para su estudio como *B. Sordellii* (Journal of Infectious Diseases, 1929, t. 45, p. 159-162).

I

Nuestros estudios, reducidos a un escaso material, nos han permitido reconocer la presencia en cuatro casos de un germen que hemos designado como *Bacillus sp.* que tiene grandes analogías con *B. hemolyticus bovis* (Vawter y Records) y además en uno de los casos 2 formas de *B. perfringens.*

La inoculación experimental al bovino, que ha reproducido la enfermedad, ha permitido establecer que hay una cierta predisposición a la invasión por gérmenes. *Diplococus* y *Streptococus* no clasificados, como asimismo un germen filamentoso Gram negativo, anaerobio de difícil cultivo en caldo Tarozzi y que no desarrolla en agar. Las conclusiones que fluyen de nuestra experiencia es que *Bacillus sp.* puede encontrarse sólo en las lesiones del bovino muerto por hemoglobinuria, o asociado a gérmenes que si tienen algún papel en la génesis de la infección no juegan rol alguno en la patogenia o lo tienen muy secundario.

Los gérmenes aislados, excepto el *Bacillus sp.* deben ser considerados por el momento como invasores secundarios.

La gentileza del doctor Sanz nos permitió estudiar además algunos cultivos por él conservados en el museo del Instituto Biológico y que provenían de casos típicos de hemoglobinuria.

1. Cepa 347 B. en caldo con un trozo de hígado (siembra de material del foco necrótico sin aislar).

2. Cepa 151 B. En agar profundo y aparentemente puro.

3. Cepa 319 B. En caldo cubo de huevo, aislado y aparentemente puro.

4. Cepa 339 B. En caldo con un trozo de hígado, entregada por el señor Sanz al Instituto Bacteriológico de Chile y conservada en éste.

Del estudio de estas cepas pudo establecerse que la cepa 347 B. corresponde a *B. perfringens* (1).

Las cepas 151 B., 319 B. y 339 B. corresponden en sus caracteres generales al *Bacillus sp.* anterioremente descripto.

Del estudio de las colonias de las cepas 151 B. y 319 B. se pudo verificar que las había lenticulares, algodonosas y mixtas (ver lámina XL). La forma lenticular corresponde a la de *Bacillus sp.* 10 y *B. sp.* 14.

Las siembras en agar y en agar hígado, repetidas veces dieron la impresión de que las colonias lenticulares y algodonosas (designadas como lente y bola) fueron dos formas de cultivo de una misma especie e interconvertibles y quizás determinadas casualmente por alguna condición del medio de cultivo. Repetidas las tentativas en mejores condiciones y procurando tomar material de colonias de forma pura, conseguimos aislar de cada una de ellas dos cepas designadas como *17 lente* (corresponde a la cepa 151 B.), *18 lente* (corresponde a 319 B.) y *17 bola* y *18 bola* (corresponden a 151 B. y 319 B., respectivamente).

En cuanto a la cepa 339 B. designada (como *Bacillus sp.* 19) dió colonias algodonosas uniformemente iguales que difieren algo de las colonias algodonosas de las cepas 161 y 319 (*17* y *18 bola*).

En el comienzo del estudio esta cepa era semejante a *B. sp.* 10 ó 14, salvo la forma de sus colonias. La pérdida casi total del poder patógeno y la variación de otras características nos ha impedido hasta el momento tener certeza respecto de su naturaleza, y por consiguiente no nos ocuparemos de su estudio en esta ocasión. Sólo consignaremos la dificultad que tiene de crecer en los medios sólidos y la facilidad con que sus cultivos perdían la capacidad de dar subcultivos.

---

(1) La certeza de la ausencia de toda otra especie anaerobia no la tenemos.

151 B., 319 B. y 339 B., corresponden en sus caracteres

Nos ocuparemos en esta nota de los dos gérmenes *17 lente* y *17 bola* aislados en la cepa 151 B. y de los *18 lente* y *18 bola* aislados en la cepa 319 B. (2).

Caracteres de las cepas lente 17 y 18.

MORFOLOGÍA. *Cultivo en caldo Tarozzi de 20 horas.* Gran semejanza con *Bacillus sp.* 10 y 14 de *cultivos de 48 horas* en caldo Tarozzi.

Cultivo en caldo Tarozzi de 48 horas. Poca variación sobre el cultivo de 20 horas. La semejanza con *B. sp.* 10 y 14 se conserva. Aparece un número regularmente grande de esporas libres.

Cultivo en caldo hígado de 20 horas. 17 lente es semejante a *B. sp.* 10 y 14 en el mismo medio. Aparece un mayor número de forma Gram negativas, sin degeneración.

18 lente. El cultivo se parece al de 20 horas en caldo Tarozzi de *B. sp.* 10 y 14, pues se ven formas esporuladas en pequeño número.

Cultivo en caldo hígado a las 48 horas. Morfología igual a *B. sp.* 10 y 14 en el mismo caldo. La diferencia constituída por la esporulación de *lente 18* se conservan.

Esporulación. Más precoz e intensa que *B. sp.* 10 y 14. Posición y forma de la espora igual a *B. sp.* 10 y 14.

Dimensiones. Corresponden tanto las de la forma vegetativa cuanto las de las esporas, a las de *B. sp.* 10 y 14.

Cilias. 17 lente tiene las mismas cilias características de *B. sp.* 10 y 14. En cuanto a la cepa *18 lente* no pudo en ningún caso obtenerse la tinción de las cilias. Tampoco pudieron verse en campo obscuro. Las tentativas numerosas realizadas permiten asegurar la ausencia de cilias en esta cepa.

Forma de colonias.

La forma de colonia (ver dibujo) es lenticular, análoga a *B. sp.* 10 y *B. sp.* 14. En el cultivo original las colonias eran frecuentemente mixtas, y en algunos casos parecían ser trans-

(2) La investigación fué realizada simultáneamente con el estudio de *B. sp.* 10 y *B. sp.* 14, usando de técnicas idénticas cuya descripción omitimos.

formables la colonia lenticular en colonia algodonosa (bola) e inversamente.

Movilidad. Ambas cepas son inmóviles.

Resistencia de las esporas al calor. La cepa 17 lente resiste 10' la ebullición y la 18 lente 40'.

pH. óptimo y límite de desarrollo. El pH. límite de desarrollo es de 5.5 y el óptimo de pH. 6. La cepa *lente 18* tiene una zona más grande de desarrollo intenso que llega a pH. 7. Ambas tienen en la región alcalina una mayor actividad revelada por la producción de gas, que está ausente en *B. sp.* 10 y *B. sp.* 14.

Temperatura de desarrollo. La cepa *17 lente* se comporta de manera análoga a *B. sp.* 10 y 14; *18 lente* no desarrolla a 32°. A 37° recién lo hace entre el 4° y 5° día.

Caracteres culturales y acción sobre los medios de cultivo.

Idénticos o muy semejantes a *B. sp.* 10 y 14; *18 lente* se diferencia por la mayor rapidez de sedimentación que hace que sus cultivos queden claros por completo.

El olor de los cultivos es idéntico al de *B. sp.* 10 y *B. sp.* 14. La producción de compuestos sulfurados es más intensa.

Acción sobre las substancias hidrocarbonadas. En el cuadro siguiente puede apreciarse que *lente 17* y *lente 18* fermentan los mismos cuerpos que *B. sp.* 10 y 14 y que la producción de ácidos es un poco más intensa. (1).

Substancia agregada al medio en proporción del 1 %	Producción de gas		pH. a los 5 días a 37°	
	17 lente	18 lente	17 lente	18 lente
Glucosa	+	+	5.4	5.4
Manosa	+	+	5.8	5.8
Levulosa	+	+	6.2	6.2
Maltosa	+	+	6.4	6.4
Inosita	+	+	6.0	6.0
Glicerina	+	+	6.	7.0

(1) Experiencia hecha simultáneamente con la de *B. sp.* 10 y *B. sp.* 14. El resto de los hidrocarbonados no es fermentado.

Poder patógeno.

Ambas cepas *17 lente* y *18 lente* tienen poder patógeno para la cobaya. Las lesiones y la morfología y distribución de los gérmenes en el animal que sucumbe a la infección son idénticos a los observados en *B. sp.* 10 y 14.

Resumen. Las cepas designadas como *17 lente* y *18 lente* separadas de las que llamaremos *17* y *18 bola* de los cultivos 151 B. y 319 B. pertenecen a la misma especie que *B. sp.* 10 y 14. Las diferencias observadas son de menor cuantía. La designación se hará al referirnos a estas dos nuevas cepas de manera semejante a *B. sp.* 10 y 14, esto es, *B. sp.* 17 y *B. sp.* 18.

Caracteres de la cepa bola 17 y bola 18.

Morfología.

Caldo Tarozzi de 18 horas. Bacilo recto Gram positivo, de extremos redondeados. Solo o apareado. Raras cadenas y algunos filamentos. Poquísimas formas esporuladas.

En medio de Von Hibler y caldo hígado, el germen presenta morfología muy semejante.

Caldo Tarozzi de 48 horas. Igual que el cultivo de 18 horas, salvo una mayor cantidad de bacterias esporuladas. (Ver microfotografía 1).

V. Hibler de 48 horas. Morfología semejante a las anteriores. Muchas formas grunulosas y Gram negativas.

Caldo hígado de 48 horas. Igual que cultivo de Tarozzi de 48 horas. Algunas bacterias recuerdan por su aspecto a *B. histolyticus.*

Esporas. Los esporangios son un poco más anchos que las formas vegetativas. La espora está ubicada subterminalmente. Al comienzo aparece como una elipsoide cuyo eje mayor es perpendicular al eje principal de la bacteria y luego se lo ve esférico. Cuando están libres son elipsoides.

Dimensiones. Las formas vegetativas (tinción con Gram) tienen un largo de 3μ por un ancho de 0.5 a 0.6μ; hay formas cortas de 2μ y largas de 4.5μ.

Los esporangios tienen un ancho de 0.7μ.

Las esporas un largo de 1,2μ y un ancho de 1μ.

Cilias. Cilias peritricas en número grande. Difieren como se puede ver en la morfología de las *B. sp.* 10, 14 y 17. (Ver dibujo 2).

Formas de colonia en agar profundo.

La forma de la colonia de *bola 17* y *bola 18* es algodonosa, relativamente compacta y con filamentos en la superficie. Se asemeja mucho a la forma de las colonias descriptas por Wawter y Records para el *C. hemolyticus bovis.* El dibujo da idea de su forma como también de las colonias mixtas, con *B. sp.* 17 o *B. sp.* 18. (Ver lámina XL).

Las colonias en superficie de agar son de hasta 2 mm. de diámetro, tienen la superficie y bordes muy irregulares. (Ver microfotografía 3).

Movilidad. Movilidad acentuada y fácilmente observable en todo tiempo del desarrollo.

Resistencia de las esporas al calor.

Las esporas de ambas cepas resisten más de 1 hora y media a la ebullición.

pH. óptimo y límite de desarrollo.

En el siguiente cuadro puede apreciarse el comportamiento de estas dos cepas en caldo de pH. diferentes.

Desarrollo a diferentes pH.

	5.5	6	6.40	6.80	7.20	7.80
17 bola	0	1	1	2	3	4
18 bola	0	1	1	1	2	3

El desarrollo es muy escaso en la zona ácida. En cuanto al óptimo, aunque no determinado, se encuentra en la región alcalina.

Temperatura de desarrollo.

A 18° no hay desarrollo alguno ni en 5 días. A 32° el desarrollo aparece a las 24 horas de incubación. A 37° los cultivos son más abundantes que a 32°.

Caracteres culturales y acción sobre los medios de cultivo.

En caldo peptonado común de pH. 7 a 8.4 desarrollan ambas cepas fácilmente.

A las 24 horas en caldo simple, glucosado y con adición de extracto de hígado el desarrollo es abundante, de aspecto grumoso y con tendencia a la sedimentación. En el medio Tarozzi el desarrollo es abundante, grumoso y sedimenta rápidamente.

A las cuarenta y ocho horas todos los medios se han aclarado por sedimentación del cultivo.

Sobre leche no manifiesta acción alguna.

El huevo cocido permanece inalterado.

No altera la carne del medio de Tarozzi.

En gelatina crece rápidamente en forma grumosa. Precipita rápidamente y licúa el medio.

En caldo con sangre hay una pequeña alteración de los glóbulos rojos producida por una escasa hemolisis.

Produce abundante cantidad de compuestos sulfurados.

Reduce nitratos a nitritos.

No produce indol.

No tiene olor pútrido.

En ningún medio hay producción de gas.

Acción sobre las substancias hidrocarbonadas.

Los medios adicionados de substancias hidrocarbonadas no muestran variación de pH. ni producción de gas por el desarrollo de *17 bola* y *18 bola*. Los cuerpos estudiados son: glucosa, manosa, levulosa, maltosa, inosita, glicerina, sorbita, arabita, dulcita, manita, xilosa, arabinosa, ramnosa, galactosa, sacarosa, lactosa, rafinosa, inulina, glucógeno, almidón, salicina y amigdalina.

Poder patógeno.

Los cultivos en caldo simple o en caldo Tarozzi no han manifestado en ningún caso acción patógena alguna, para la cobaya. La inoculación intramuscular no produjo ni la tumefacción que es corriente aún con especies apenas patógenas.

Posición en la sistemática de la especie a que pertenecen las cepas 17 bola y 18 bola.

Las diferencias con las cepas 10, 14, 17 y 18 de *Bacillus sp.* estudiadas en estas memorias son tales que impiden

toda confusión. Conviene sin embargo hacer resaltar algunos hechos que creemos de interés. La forma de la colonia, la disposición de las cilias y la movilidad las aproximan al *Cl. hemolyticus bovis.*

En la separación de las colonias lenticulares de las algodonosas hubo real dificultad, pues las colonias mixtas eran muy abundantes y aun tomando colonias lenticulares aparentemente puras hemos obtenido cultivos mixtos.

Las diferencias entre las cepas que dan colonias lenticulares (*B. sp.* 10, 14, 17 y 18) y las que dan colonias algodonosas (17-18 bola) son tales que deben ser consideradas por el momento como pertenecientes a especies diferentes.

En cuanto a la naturaleza de las cepas 17 y 18 bola sólo diremos que muchos de sus caracteres son semejantes a *B. cochlearius,* (Douglas Fleming and Colebrook).

EXPLICACION DE LAS LAMINAS

LÁMINA XXXIX

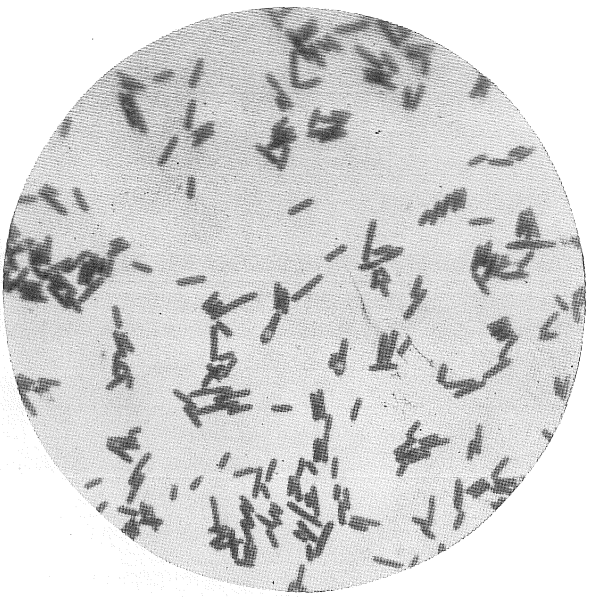
Fig. 1. Fotografía de 17 Bola en caldo de Tarozzi 48 horas. Coloración Gram (1:1400).

„ 2. Dibujo de cilias (cámara clara) 17 Bola, en caldo Tarozzi 14 horas; coloración Zettnow (1:1800).

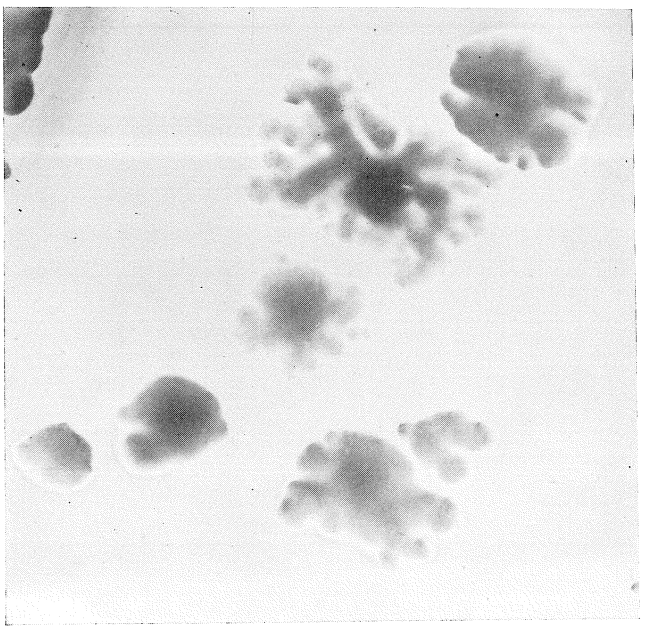
„ 3. Fotografía de colonias de 18 Bola en agar superficie (1:20).

LÁMINA XL

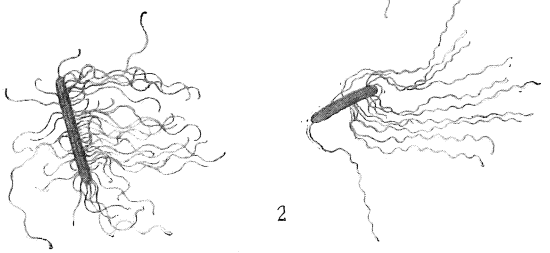
Dibujos de colonias de N° 18. Cultivo en agar glucosado (1:50)



1



3

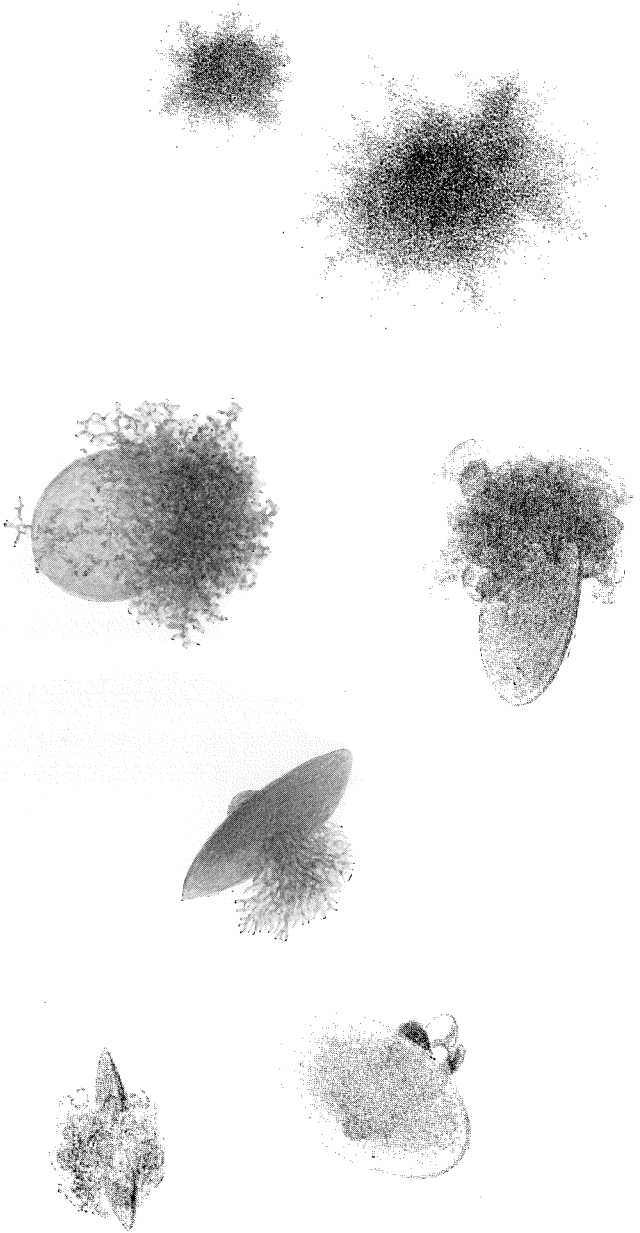


2

DR. KUHN, FOT.

LÁMINA XL

ART.° A. SORDELLI, PRADO Y FERRARI



BASTANIER, DEL.

HEBER, SCP.