

Contribución al estudio de la flora de la gangrena gaseosa humana

Un nuevo bacilo anaerobio

Por A. SORDELLI y S. SORIANO

En el mes de Diciembre de 1929 llegó casualmente a nuestras manos un material de gangrena gaseosa humana, del que se pudo aislar *B. perfringens* y otra bacteria anaerobia muy semejante a *B. sporogenes* METCH. El poder patógeno para el cobayo y la toxicidad acentuada de sus cultivos nos indujeron a realizar un estudio más detenido, que nos permitió establecer la naturaleza de la bacteria. Las propiedades y caracteres fueron determinados en los dos meses subsiguientes al aislamiento y confirmadas por el estudio de la cepa conservada seca en vacío, cuatro años más tarde. La presente comunicación trata de la descripción de la bacteria y de sus posición sistemática, siendo además una contribución al conocimiento del grupo de bacterias que se asemejan al *B. sporogenes*.

Morfología. — Bacilo móvil capsulado, de extremos redondeados: relativamente corto y muy ancho. Esporula con facilidad en medios comunes alcalinos. La esporula elipsoide ocupa porciones variables de central a subterminal. Los esporangios no están muy aumentados de tamaño. Existe sin embargo, un ligero ensanchamiento que no coincide siempre con la posición de la spora. Por lo tanto el clostridio está apenas esbozado. Las esporas se ponen en libertad en cultivos viejos.

Dimensiones. — De la forma vegetativa: $1.3 - 1.5 \mu \times 3 - 5 \mu$. De los esporangios: $1.3 - 1.8 \mu \times 4 - 6 \mu$. De las esporas: $1 - 1.3 \mu \times 1.5 - 2.2 \mu$.

Cilias. — Peritricas.

Movilidad. — Aparece en cultivos de muy pocas horas; piérdese luego.

Tinción. — En cultivos ácidos tinción irregular y débil. En cultivos alcalinos tinción muy intensa. Gram positivo.

Cultivo. — Cultiva en medios comunes con estricta anaerobiosis. La glucosa favorece el desarrollo. También lo hace el extracto de hígado. Escasa tendencia a sedimentar. En cultivos de varios días el sedimento es regularmente abundante y débilmente mucoso.

Colonias en agar profundo. — En general se observan colonias lenticulares a veces imbricadas, de superficie lisa o con escasa tendencia a la emisión de filamentos. Debe considerarse a la forma lenticular lisa como la forma habitual. La forma de las colonias en superficie no ofrece rasgos de importancia.

Acción bioquímica. — Germen de acción proteolítica intensa. Licúa rápidamente la gelatina. Digiere la carne. El color de la carne en medios con glucosa es rojizo. En medio alcalinos es negruzco. La leche es coagulada en 24 horas. Luego la caseína se digiere casi completamente en 6 días. Da reacción ácida. Produce gas. Digiere albúmina de huevo coagulada y también suero coagulado, sin cambio de color. En el medio de V. HIBLER se produce en la superficie un débil ennegrecimiento tardío. Produce apreciable cantidad de productos sulfurados. Produce indol. No reduce nitratos. Fermenta con producción de ácido y gas: glucosa, levulosa y maltosa. No ataca galactosa, xilosa, arabinosa, glicerina, manita, sacarosa y lactosa.

Poder patógeno. — La inyección por vía muscular de un cultivo en caldo Tarozzi de 24 horas al cobayo, produce alteraciones locales y generales muy variables según la dosis y el estado del cultivo. La reacción local se inicia rápidamente por un cambio de color de la superficie plantar que se torna violácea. La tumefacción, la pérdida del pelo y la exudación de un líquido, se suceden en corto tiempo. Olor pútrido se percibe a veces a través de la piel. El edema se hace evidente y puede ocupar en 8 a 10 horas parte del tejido celular subcutáneo del abdomen. En 24 horas la pata inyectada está prácticamente unida solo por la piel y como desarticulada. Este cuadro se puede terminar con la muerte en poco tiempo por intoxicación, o reduciéndose los signos puede desprenderse la pata o momificarse desecándose. En los animales que mueren se observa un edema extenso de color vinoso sucio con puntillado hemorrágico. El peritoneo contiene escasa cantidad de líquido incoloro. Ansas intestinales próximas a la pared ventral presentan subfusiones color grosella. Suprarenales rojas. Los músculos de la parte inoculada son friables, de color pálido o gris sucio. En algunas partes llega al esfacelo. Por vía peritoneal los animales mueren rápidamente por acción de una toxina. Superficie peritoneal del tubo gastroentérico congestiva con manchas hemorrágicas extensas, en el colon y ciego especialmente. Pulmones erguidos de color violáceo o salmón con zonas hemorrágicas.

Toxicidad de los cultivos. — La inyección de caldo de un cultivo centrifugado o filtrado por las vías venosa o peritoneal al cobayo puede provocar la muerte en corto tiempo. Bastan a veces segundos para que el cobayo sucumba presa de convulsiones muy intensas. Los signos son otras veces diferentes, predominando los fenómenos de sopor. La toxicidad aguda puede manifestarse

también por vía muscular cuando la dosis inyectada es muy grande. En condiciones de cultivo favorables la dosis mortal para el cobayo de 250 grs inyectada por vía venosa es de 0,05 cm³. El caldo conveniente para la producción de esta sustancia tóxica está preparado por una mezcla de caldo peptonado con extracto de hígado filtrado por bujía con la adición de glucosa. La inyección por vía venosa o de grandes dosis por vía muscular o peritoneal, de modo que la muerte se produzca muy rápidamente, determina como único signo notable en la autopsia el enfisema y edema pulmonar marcadísimos. Varía la cantidad de sangre de uno a otro experimento de modo que la víscera puede aparecer muy pálida o teñida de rosado o rojo; a veces hay hemorragias zonales o de puntos. Otras veces el signo más aparente lo constituye la congestión hemorrágica de los intestinos. El estudio más detenido de esta toxicidad tan elevada nos condujo a resultados muy curiosos. Un cultivo en medio glucosado que tiene toxicidad por vía venosa la conserva después de hervido, siendo las lesiones producidas (enfisema pulmonar) muy semejantes a las determinadas por el cultivo sin hervir. Este experimento nos hizo suponer que la toxicidad de nuestros cultivos se debía a un tóxico termoestable y no a una toxina en el sentido estricto. Este problema fué dilucidado de la manera siguiente: Un cultivo filtrado por bujía, tóxico por vía venosa y peritoneal, pierde después de hervido su toxicidad por vía peritoneal conservando en cambio con poca disminución la toxicidad venosa. De un cultivo tóxico, filtrado por bujía, el sulfato de amonio precipita a saturación una sustancia tóxica por las vías venosa y peritoneal. Esta toxina es termolábil y corresponde por esta propiedad a una toxina verdadera. Un filtrado tóxico tratado por alcohol (10 volúmenes) da un precipitado muy poco o nada tóxico. El líquido no precipitado contiene un tóxico termoestable activo solo por vía venosa. La diálisis de un cultivo filtrado permite obtener en el líquido dializado una sustancia tóxica solo por vía venosa que es termoestable y dentro del dializador queda un tóxico activo por vía venosa y peritoneal que es termolábil. Si de un filtrado tóxico se precipita la toxina por el sulfato de amonio y al líquido saturado de sulfato de amonio se lo precipita por 10 volúmenes de alcohol, se puede demostrar que este líquido alcohólico contiene un tóxico termoestable solo activo por vía venosa. En resumen la bacteria en estudio produce en los medios de cultivo una sustancia tóxica termolábil (toxina) precipitable por sulfato de amonio y que no dializa y además un tóxico termoestable que dializa y no precipita por sulfato de amonio. La proporción de ambas sustancias tóxicas determinadas por su acción letal por vía venosa es variable, llegando veces a estar ausente alguna de ellas. El estudio de las razones que determinan este comportamiento cambiante, nos permitió establecer las condiciones de formación de cada una de las sustancias tóxicas. Si la siembra se hace en un caldo común peptonado sin hidrato de carbono la toxicidad integral es muy baja. Esta toxicidad crece si se agrega extracto de hígado que favorece el desarrollo y que contiene glucosa. Si el cultivo, por el contenido excesivo de glucosa del extracto de hígado, después de 48 horas de incubación está muy ácido, sólo se encuentra el tóxico termoestable. La *DLM* del cultivo es en general de 0,2 cm³ por vía venosa o un poco menos. La muerte está precedida de un estado convulsivo semejante al del choque anafiláctico. En cambio si la acidificación es pequeña (p. ej. pn. 6,8 - 6,9) el líquido contiene los dos tóxicos; y se verá así que su toxicidad se manifiesta por vía venosa y peritoneal y que después de hervido tiene solo toxicidad por vía venosa. Fueron éstos los medios de cultivo que nos condujeron al hallazgo de las dos sustancias. Con el objeto de establecer si el exceso de glucosa bastaba por sí solo para inhibir la producción del tóxico termolábil y era condición suficiente para la formación del termoestable o si el cambio de reacción del medio tenía participación importante en la naturaleza del tóxico engendrado, se prepararon medios con cantidad apreciable de glucosa (0,5 % a 1 %) a los que se agregaba bicarbonato de sodio en solu-

ción estéril en proporción suficiente para que el pH no bajara de 7,8 (1 % de CO_2HNa). Pudimos así comprobar que en los medios con exceso de glucosa solo existe el tóxico termoestable y que en esos mismos medios el CO_2HNa , al mantener el cultivo siempre en la zona alcalina, permite la formación del tóxico termolábil solamente. En resumen: 1º la glucosa favorece la producción de las sustancias tóxicas; 2º si el desarrollo se hace en medio ácido solo se forma el tóxico termoestable; 3º si el medio permanece alcalino solo se forma el tóxico termolábil.

La toxina. — La toxicidad de los cultivos alcalinos, que es por regla general muy elevada, se debe a la presencia de la toxina propiamente dicha. Por el sulfato de amonio se precipita la toxina totalmente, y el precipitado seco disuelto e inyectado por vía venosa o peritoneal produce la muerte en corto tiempo con los signos y lesiones ya descriptos al tratar de la toxicidad de los cultivos filtrados. La toxina no es neutralizada por los sueros activos contra *B. perfringens*, *B. oedematiens*, *Vibrión séptico*, *B. sordellii* y contra *B. sporogenes*. Estos sueros tampoco neutralizan la acción patógena del cultivo entero. La inmunización de un caballo con toxina ha permitido obtener un suero antitóxico que neutraliza específicamente la toxina y también la acción patógena del cultivo.

Posición sistemática. — La bacteria descripta en estas páginas difiere de *B. sporogenes*, *B. centrosporogenes* y de *B. tyrosinogenes*, así como de *B. sordellii*. No se ha podido identificar con *B. parasporogenes*. Por el estudio comparado de las diversas especies y por el estudio de la literatura debemos considerar a la bacteria descripta como una nueva especie que por el momento designaremos como *Bacillus* sp. (n. sp.).