



Revista de Medicina Veterinaria

AÑO XIII

BOGOTÁ, 1944

Nº 85

CONSIDERACIONES SOBRE LA IDENTIFICACION DE LOS PRINCIPALES ANAEROBIOS DEL GENERO "CLOSTRIDIUM" PATOGENOS PARA LOS ANIMALES DOMESTICOS (*)

Por ERNESTO SAENZ LONDOÑO

INTRODUCCION

La identificación de anaerobios del género "Clostridium", constituye uno de los capítulos más difíciles que contempla la Bacteriología. Sagaces investigadores en todo el mundo y a través de muchos años, han dedicado lo mejor de sus esfuerzos a la búsqueda de tales agentes, y los resultados obtenidos hasta hoy son muy contradictorios, debido precisamente a la complejidad del tema.

Capacidades, tiempo, preparación, he aquí la indispensable herramienta para un trabajo de semejante índole. Careciendo de ella, pedimos excusas al desafortunado lector por la esterilidad de estas líneas.

Queremos consignar nuestro profundo agradecimiento para el doctor Reinaldo Caicedo, Presidente de Tesis y muy noble amigo; para el Dr. Erich Schultze, digno Director del Instituto "Behring" de Bogotá autoridad en la materia tratada; para el doctor José Velásquez, Profesor y amigo ilustre; para el personal técnico del Instituto **Behring**.

CAPITULO I

Importancia de los agentes del género "Clostridium" en la patología de los animales domésticos

Dentro del género "Clostridium" se agrupan en Bacteriología gran número de gérmenes de muy diverso significado que se hallan profusamente extendidos en la naturaleza. Algunos juegan un papel importante en la Patología humana y animal, otros, los más, arrastran su vida saprofita en la tierra y tubo digestivo de los seres vivos, siendo incapaces de producir alteración alguna de su salud. La mayoría de los del grupo patógeno, viven también de manera saprofita en el tubo digestivo del hombre y de los animales, aprovechando determinadas circunstancias para virulentarse. Tanto los unos como los otros, desempeñan un papel preponderante en la putrefacción de los cadáveres.

Algunos de estos agentes atacan indistintamente al hombre y a los animales, produciendo en ambos la misma enfermedad, y ejemplo de ellos es el **Cl. tetani** causante en uno y otros del "Tétanos". Tienen otros, especificidad por alguna especie,

(*) Tesis de grado calificada "Meritoria".

como el **Cl. hemolítico bovino**, causante de la "ictero-hemoglobinuria bacilar" bovina. Existen por último gérmenes, que según la especie atacada, producen enfermedades clínicamente diferentes, y así vemos al **Cl. perfringens** como principal agente de la "Gangrena Gaseosa" humana y como factor etiológico de ciertas Entero-toxemias específicas de ovinos.

Pero si en Patología Humana desempeñan ellos un papel muy importante por ser los responsables de la tan temida "Gangrena Gaseosa" y de gravísimas intoxicaciones como el Tétanos y el Botulismo, en Patología Veterinaria llenan un capítulo fundamental. Las afecciones bajo el común título de "Edema Gaseoso" (Edema maligno, Gangrena gaseosa, Carbón Sintomático, Entero-toxemias infecciosas), el "Tétanos", especialmente en los equinos, el "Botulismo" en diferentes especies, etc., son flagelos constantes de los ganados, que gozan de permanente actualidad en dondequiera que existan animales.

CAPITULO II

Nomenclatura, división y papel patógeno de los agentes del género "Clostridium" en medicina veterinaria.

Consideramos este capítulo de interés, pues las diferentes denominaciones que anotamos y las distintas enfermedades a que hacemos relación, han sido tomadas de varios libros, los cuales, individualmente, no hacen mención sino del personal criterio de su autor. Principalmente los europeos, han contribuido a volver muy confusa la clasificación, ya que para un mismo germen y una misma enfermedad, existen denominaciones francesa, alemana, inglesa, etc. Hay también investigadores que creen ver en el agente por ellos encontrado, una variedad dig-

na de un capítulo aparte, cuando en realidad no se trata sino de razas y de sub-razas con diferencias más o menos triviales.

En lo relacionado con el CARBÓN SINTOMÁTICO y para-SINTOMÁTICO de los europeos, producidos respectivamente por el **Cl. chauvoei** y **Cl. séptico**, nos permitiremos denominarlos, "Carbón Sintomático" por **Clostridium chauvoei** y "Carbón Sintomático" por **Clostridium séptico**, pues al haber otros gérmenes que también pueden producir el síndrome "Carbón Sintomático", no dejaríamos espacio para ellos en la primitiva nomenclatura.

CLOSTRIDIUM SEPTICUM

Vibrión séptico (Pasteur) Bacilo del Edema Maligno (Koch) bacilo de Ghon y Sachs-Bacilo del Edema Maligno de Hibler-Bacilo del Bradset de Jensen-Bacilo de la Gangrena Enfisematosa de Kitt-Bacilo del Edema Maligno de Ficker-Bacilo de la Gangrena Para-enfisematosa de Miessner - Cornilia pasteuri - Para-Rauschbrand bacillus-Bacillus ulceris gangrenosi-Bacilo de la Gastro-mycosis ovina (Jensen). Sobre la identidad del **Cl. séptico** (Pasteur), con el bacilo del Edema Maligno (Koch) se ha discutido mucho. Entre los autores modernos prevalece la creencia de que el último, es una variedad proteolítica, idéntica al **Cl. sporogenes**.

Agente de:

1º—Algunos casos de "Carbón Sintomático" en bovinos: del 30% de los casos de "Carbón Sintomático" en ovinos (Nº 13); de casi la totalidad de los casos de "Carbón Sintomático" del cerdo.

2º—Del clásico "Edema Maligno", consecutivo a heridas infectadas, partos laboriosos, etc., en equinos, rumiantes y porcinos, principalmente, y en menor escala en perros, gatos y aves.

3º—Del “Braxy” inglés o “Gastromycosis ovina”, o también “Bradsot” de los países del norte de Europa (pero no de Alemania, en donde el “Bradsot” es producido por el **Cl. Gigas**, como veremos adelante). El “Braxy”, que prácticamente carece de sinónimo en castellano, pudiera llamarse de una manera gráfica “Edema Maligno del Cuajar de los ovinos”.

4º—Del “Grass ill” (Steward Hendersen 1929) “Enfermedad del Pasto de los corderitos”, que no es más que el “Braxy” de los pequeños.

5º—De una septicemia mortal de la Foca (Urbain 1932) y del Elefante marino (Urbain, Davesne, Mennerat, Bullier 1932 (15).

CLOSTRIDIUM CHAUVOEI

Bacilo de Chauvoei (Arloing, Cornevin y Thomas 1879-1994) **Bacilo de la gangrena enfisematosa de Foth-Bacilo Sarcoenfisematosa de Feser - Rauschbrand - bacillus.**—Alemania— **Bacillus anthracis Symptomatici-Vacillus carbonis.**

Agente de:

La mayoría de los casos de “Carbón Sintomático” en bovinos, y en menor proporción en cvinos; raramente en cerdos, cabra, camello, reno, ballena, morsa. Excepcionalmente en el caballo.

Algunos autores sostienen que existen dos razas definidas y diferentes de **Clostridium chauvoei**, bovina la una y ovina la otra. Marsh y Junherr en América (Nº 9) afirman que no hay sino un **Chauvoei**. Parece en definitiva que existan diferencias antigénicas de algunas razas que no atacan sino a una de las dos especies.

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

(Veillon y Zuber 1897) **Clostridium welchii** (Welch, Nutall 1892) **Bacillus phlegmonis emphisematosae** de

Eugenio Fránkel **Bacilo de la Gangrena Gaseosa-Bacilo gasógeno-Bacillus aerogenes capsulatus** (Welch) **Bacillus enteritidis sporogenes de Klein-Bacillus saccarabutyricus immobilis-Bacilo de Schattenfroh y Grasberger.**

Tiene dos variedades y cuatro tipos. Las variedades son: **Cl. perfringens var. Anaerogenes** y **Cl. perfringens var. Egens**. No se conocen las acciones de estas dos variedades en Patología Veterinaria. Los tipos son cuatro:

Tipo A—No se ha descrito su papel patógeno específico en Veterinaria.

Tipo B—“**Lamb Dysentery Bacillus**” (Dalling 1928) **Bacillus agnicus** **Bacilo de la Disentería de los Corderos.**

Tipo C—“**Clostridium paludis**” (Mc. Ewen 1930).

Tipo D—“**Clostridium ovitoxicus**” (Beneth 1932).

Agente de:

TIPO A—1º “Carbón Sintomático” de Bovinos (Zwick 1924), (Weinberg y Mihailesko 1928, Scott 1928), etc. y de ovinos (Zwick 1924).

2º—Del “Braxy” (Forgeot y Raif-Bey 1929, Doungell y Davesne 1931) y de lesiones intestinales del cerdo que recuerdan el “Bradsot” (Beneth 1930).

3º—De la clásica “Gangrena Gaseosa” en bovinos (Getze 1928) corderos (Mc. Ewen 1930) y otros animales, consecutiva principalmente a heridas.

4º—De ciertas afecciones intestinales de las aves (Nakamura 1922, Niemann 1930).

5º—De una estomatitis gíngiva gangrenosa del Chimpancé (Boutdelle, Urbain 1931).

TIPO B—1º Del “Lamb Dysentery” o “Bloodpens” (Dalling 1928) o “Disentería de los Corderos”. La participación de la **Escherichia coli**

en la etiología del "Lamb Dysentery", ha sido definitivamente descartada por los recientes trabajos de Dalling y Pool (16).

2º—De algunos casos de diarreas hemorrágicas de potros (Mason J. H. y Robinson E. M. 1938). (21)

TIPO C—Del "Struck" (Mc Ewen, Roberts 1930) en Inglaterra. En castellano podría denominarse esta enfermedad, "Enter-toxemia aguda de las ovejas adultas".

TIPO D—Del "Pulpy Kidney" (Montgomery, Rowlands 1934) y que en castellano traduciría "Riñón pulposo" o mejor "Enfermedad pulposa de los riñones de los corderos".

Montgomery en 1935, aísla este Tipo de una Enterotoxemia de ovejas adultas, y denomina la enfermedad "Strike" (No confundirla con el "Struck"). Bennets en Australia, lo encuentra también como responsable de una entero-toxemia de ovejas adultas que cataloga como "Struck" por Tipo D.

Fuera de los procesos anotados, se describe al *Clostridium perfringens* sin discriminación de tipos, como responsable del "Grass-Disease" (Bertrand 1934) "Enfermedad de la hierba" de los caballos, y de la "Tetania de la hierba" en las vacas (Bertrand 1934). También como el agente de determinadas hemoglobinurias acompañadas de diarrea en bovinos: como cómplice de algunas coccidiosis y como factor etiológico de la "Gangrena Infecciosa" de las ovejas, en Chile. (Sanz y Skiba).

CLOSTRIDIUM NOVI

(Weinberg, Ségiun 1915) *Clostridium oedematiens*, *Bacillus oedematis thermophilus*, *Bacillus oedematis maligni* II-Bacilo Nº 5 (Von Hibler 1908) *Bacillus bellonensis* Saqepée 1916) *Bacillus neigeux* (Costa y Troiser) *Bacilo de Edema Gaseoso de Aschoff*.

Agente de:

1º—Raros casos de "Carbón Sintomático" en bovinos, ovinos y cerdos (Mc Ewen 1927, Weinberg 1928, Scott 1928).

2º—Del "Big head" o "Swelled Head" (Bull 1929) "Cabeza enorme", "Edema maligno de la cabeza de las ovejas".

3º—De la "Black disease" (Gilruth, Dodd 1918) "Enfermedad negra de las ovejas". Esta misma enfermedad ha sido descrita como "Hepatitis Necrosante infecciosa" en Australia, y por Hopkork (17) en Nueva Zelandia, bajo el nombre de "Braxy like disease" ("Pseudo-Braxy"). En Francia por Carré y Debonerá como "Hepatitis Nodular Necrosante". La enfermedad está influenciada y asociada a la "Distomatosis hepática".

4º—"Edema Maligno" en bovinos, ovinos, caballos y puercos, consecutivo a heridas infectadas y, especialmente, en forma enzootica, después de castraciones y corte de cola en ovinos.

Una variedad del *Clostridium oedematiens*, el *Cl. gigas* (Zeissler y Rassfeld) es el productor del "Brad-sot" germánico. Kraneveld, describe (1934) al *Cl. gigas* como causante de una osteomielitis bacilar del búfalo en la India (Nº 15).

Algunos autores (17), Miessner, Schoop, Curasson, han demostrado que existe inmunidad cruzada entre el *Novyi* y el *Gigas*, pero Zeissler y Rassfeld sostienen que hay algunas diferencias que justifican la consideración del *Clostridium gigas* como una variedad del *Clostridium oedematiens*.

CLOSTRIDIUM BOTULINUM

(Van Ermengen 1897). Primitivamente se describieron (G. S. Burke 1919) tres tipos de *Clostridium botulinum*: A, B y C. Luégo se han descrito dos más: el D. y el E. Fuera

de estos tipos, existe una variedad del tipo D., conocida como el **Clostridium para-botulinum de Seddon**, importante en Patología Veterinaria. Estos tipos se diferencian por la especificidad de sus toxinas. Según Meyer (9), el **Clostridium Parabotulinum equi** de Theiler y Robinson, es idéntico al tipo C. de Bengston, y el **Clostridium Parabotulinum bovis**, igual al tipo D. Este criterio, que es el de muchos autores, lo seguiremos en la descripción del papel patógeno.

Agente de:

TIPO C—(**Clostridium Lucilia**, **Clostridium "C"** de Bengston).

1º—Del "Limberneck", "Cuello blando", "Cou-mou" (Dickson 1917), de los pollos en Norte América. Es éste el verdadero "Botulismo aviar".

2º—Del Duck Sickness" (Kalmback) "Enfermedad de los patos", "Botulismo de los patos", en Norte América.

3º—De una "Parálisis espinal de los caballos" en Africa, producida por la ingestión de cadáveres de ratas. De una "Parálisis bulbar de los caballos" de Australia. De una "Parálisis faríngea enzoótica de los caballos" en Alemania, Suiza, Dinamarca.

Graham (9) y sus colaboradores en América, encontraron en el ciego de un caballo muerto de "Forage Poisoning", el **Cl. botulinum C**. Sin embargo, parece que tanto el "Forage Poisoning" de los americanos, como el "Grass Disease" de los ingleses, que han sido considerados como Botulismo equino, no sean tal Botulismo, y más bien se trate de enfermedades por virus filtrables, análogas al "Borna" y a la "Meningo-encéfalo-mielitis enzoótica equina". Lo mismo puede decirse del "Grass Sickness" de Inglaterra, que Tocker y Buxton (17) consideran como producida por la toxina del **Cl. botulinum**.

4º—De algunos casos de "Botulismo" en el ganado bovino o "Silage disease" (Graham) o "Parálisis faríngea enzoótica" de los bovinos de Europa.

TIPO D—Del "Lamsiekte" del Africa del sur o "Gallamsiekte" que en Norte América es llamada "Cattle Paralysis". Kensly (Bib. 9) describe en Texas una "Parálisis lumbar bovina", que Theiler identifica con el "Lamsiekte". Sabido es que ésta, se encuentra asociada a una "Afosforosis".

VARIEDAD CLOSTRIDIUM PARA-BOTULINUM DE SEDDON

Esta variedad es la responsable, de la "Parálisis bulbar" del ganado bovino australiano.

TIPO E—(Meyer, Gunnison) se ha aislado del pescado alterado en Rusia.

CLOSTRIDIUM HEMOLITICUM

Agente de:

La "Ictero-hemoglobinuria bacilar bovina" (Red-water disease), que en raros casos afecta a los ovinos y al cerdo.

La variedad **CLOSTRIDIUM HEMOLYTICUM SORDELLI**, es descrita por Hauduray, Urbain, etc. (15) como productora de la "Meada de Sangre" en bóvidos y ovinos de Chile.

Demnitz (11) ha querido identificar al **Clostridium hemolyticum bovis**, con el **Clostridium gigas**, y aún más, las lesiones del "Bradsot" germano, con las de la "Ictero-hemoglobinuria bacilar", pero para lo primero se basa en caracteres morfológicos que tan poca importancia diferencial tienen dentro del género **Clostridium**.

CLOSTRIDIUM TETANI

(Nicolaier 1885).

Agente de:

El "Tetanos" (Lockjaw de los ingleses; Starr-kampf alemán) en to-

dos los animales domésticos. Son especialmente sensibles el caballo, asno y mula; luego los bovinos y ovinos; después el cerdo, cabra, perro y raramente las aves.

CLOSTRIDIUM FALLAX

(Weinberg Séguin).

Agente de:

Algunos casos de "Carbón Sintomático" en la oveja (4).

Asociado a veces en procesos e infecciones gangrenosas en diferentes animales (Weinberg, Aynaud).

CLOSTRIDIUM DE LA PESTE DEL RENO

Bacilo de la Peste del Reno. (Lundgreen, 1897, Bergmann 1901).

Agente de:

"Peste del Reno" (Reindeer Plague), principalmente de los pequeños de uno a dos años, en las regiones de Laponia al norte de Suecia y Noruega.

CLOSTRIDIUM SORDELLI

Clostridium bifermentans. Clostridium foetidum (No confundirlo con la variedad **Sordelli** del **Clostridium hemolyticum bovis**).

Agente de:

Asociado a otros gérmenes, se le encuentra a veces en afecciones gangrenosas. Su poder patógeno es muy variable.

Los agentes del grupo "Proteolítico" dentro del género **Clostridium**, **Cl. sporogenes**, **Cl. histolyticum**, **Cl. putrificus**, pueden hallarse asociados en infecciones gangrenosas, heridas infectadas (Weinberg, Beens-tock).

Fuera de los gérmenes que hemos enumerado y que tienen un papel patógeno definido, sólo o aisladamente, existe gran cantidad de sa-profitos del género **Clostridium** que pululan en la naturaleza, dificultando extraordinariamente el diagnóstico de los verdaderos responsables. Ellos son, principalmente: **Cl. buty-**

ricum, **Cl. beijerinckii**, **Cl. pasteurianum**, **Cl. carnis**. **Cl. multiferm-tans**, **Cl. difficile**, **Cl. nigrificans**, **Cl. fissum**, **Cl. aerofetidum**, **Cl. tyrosinogenes**, **Cl. parasporogenes**, **Cl. flabelliferum**, **Cl. acetobutylicum**. **Cl. felsineum**, **Cl. roseum**, **Cl. saccharolyticum**, **Cl. regulare**, **Cl. ventu-relli**, **Cl. mucosum**, **Cl. pruchii**, **Cl. filiformes**, **Cl. lentoputrescens**, **Cl. filamentosum**, **Cl. termosacca-robutyricum**, **Cl. sphenoides**, **Cl. caloritolerans**, **Cl. tetanomorfum**. **Cl. putrefaciens**, **Cl. angulosum**, **Cl. alcaligenes**, **Cl. cellulosolvens**, **Cl. capitovalis**, **Cl. ovalaris**, **Cl. zooglei-cum**, **Cl. saratogoforum**, **Cl. tertium**, **Cl. paraputrificum**, **Cl. cochlearium**, **Cl. wernerii**, **Cl. dissolvens**.

CAPITULO III

Estado actual del conocimiento de las enfermedades producidas por anaerobios en el país.

Anotamos ya la frecuencia y la trascendencia que en el mundo entero alcanzan las enfermedades producidas por **Clostridium**. Los investigadores de otras partes trabajan por esclarecer causas y efectos. En nuestro país, sabemos a ciencia cierta que existe el "Carbón Sintomático" en bovinos, sin mayores discriminaciones ni estadísticas sobre su etiología. Lo mismo podríamos decir de casos esporádicos de "Edema Maligno" en diferentes animales, consecutivos principalmente a heridas infectadas. El Tétanos se diagnóstica frecuentemente, pero hemos de anotar, que pese a las peculiares condiciones tropicales de nuestro suelo, su presentación es bien escasa.

Observaciones clínicas, y seguramente de laboratorio, existen y deben existir en el ánimo de los que diariamente trajinan en el ejercicio de la profesión. Habrán algunos observado, casos de parálisis aviar muy sospechosos de **botulismo**;

otros, que se hubieren ocupado en campañas y granjas ovinas, seguramente han tenido que afrontar ciertos brotes de gastro-enteritis en corderos y ovejas adultas, que recuerdan algunas enterotoxemias específicas. Cuántos casos de parálisis espinales que atribuimos a muy diversas causas, pueden ser manifestaciones de una intoxicación botulínica. ¿Y por qué no pensar en la posibilidad de una **hemoglobinuria bacilar**?

Pero si es cierto que muchas de éstas y otras conjeturas se hacen diariamente por los médicos veterinarios, poco es lo definitivo llevado a efecto, para decir sin temor y a cuatro vientos que existe tal o cual entidad patológica específica.

CAPITULO IV

Consideraciones generales sobre la identificación de anaerobios del género "clostridium". Descripción del método de Fortner para cultivos en cajas de agar-sangre.

Si el estudio diferencial de gérmenes que se cultivan en condiciones normales y en medios ordinarios, es dificultoso, qué no será el de aquéllos que requieren para desarrollarse un artificio bien difícil de conseguir como el vacío. Súmese a esto, la cantidad enorme de microorganismos del mismo género **Clostridium** y de diversas bacterias saprofitas que pululan en la naturaleza, acompañando con desesperante constancia a los verdaderos responsables.

Tres son los principios en los cuales se basan los métodos ideados para realizar la anaerobiosis:

- a) Exclusión simple del Oxígeno.
- b) Exhaustación del Oxígeno.
- c) Desplazamiento del Oxígeno por un gas inerte.

Estos tres principios, se traducen en procedimientos **físicos, químicos y biológicos**, dentro de los cuales

caben las innumerables técnicas puestas en práctica. Puede decirse, sin temor a equivocación, que cada investigador tiene un asomo de originalidad en sus sistemas.

Dentro de los métodos basados en procedimientos físicos, los más empleados son, el de Liborius, el de Von Esmarch y el de Roux, para cultivos profundos en gelosa y gelatina; el de Wright para cultivos en medios líquidos; el muy conocido del tapón de aceite de parafina; los de Hauser, Mc. Intosh y Filoës, y el de la bomba de Novy, basados en el desplazamiento del aire, por el Hidrógeno.

De los métodos químicos, que se sirven de las propiedades reductoras de ciertas sustancias y mezclas, los más conocidos son el de Buchner con Acido Pirogálico y Potasa cáustica, y el de Rosenthal, basado en la reacción del Acido Sulfúrico con el Cromo.

De los biológicos, que se aprovechan de las propiedades reductoras de ciertas bacterias, las cuales en asociación con el anaerobio, hacen posible el desarrollo de éste, hemos empleado en nuestros trabajos prácticos el método de Fortner, que describiremos luego detalladamente.

De todos estos sistemas y de los muchos más detallados en los libros, puede decirse, que los que no requieren aparatos costosos e instalaciones complicadas, son insuficientes para adelantar investigaciones diagnósticas, y constituyen más bien métodos de cultivo pero no de aislamiento. El aislamiento unicelular, que tiene decisiva importancia para investigaciones que requieren absoluta seguridad sobre la identidad de las cepas estudiadas, exige técnicas delicadas como las de Burri, Lindner, Scarpellini, Fortner, Janse-Peterfi, etc.

Las ventajas de un método cualquiera, pueden valorarse por las facilidades que conceda para obtener

un cultivo puro. En medios líquidos, muy difícil, pues no faltan indeseables acompañantes. Se necesita de medios sólidos para obtener colonias separadas de determinado germen. Pero generalmente el cultivo de anaerobios se hace en agar profundo, lo que dificulta la toma de las colonias para su traslado y estudio al mismo tiempo que facilita la contaminación por la dificultad misma de tomar la colonia. Necesítase de la obtención de colonias en superficie de medios sólidos, que permita su separación y estudio detallado. Para conseguirlo, hemos empleado el sistema de Fortner, en placas de agar-sangre. Zeissler, empleando placas de agar-sangre-glucosa, había adoptado su famosa clasificación, basándose en la forma de crecimiento. El distingue nueve diferentes formas: I, IIa, IIb, IIc, III, IV, V, VI y VII, entre las cuales tienen especial importancia para el estudio de los gérmenes productores de "Carbón Sintomático", que son los que más nos interesan, las formas I, IIa, III y IV, que serán descritas con los respectivos agentes.

Hemos empleado el agar-sangre sin glucosa, variación del método de Zeissler, que según los ensayos comparativos hechos por Hauptmann y Klöcker (23), no resulta desfavorable. La sangre empleada ha sido la de conejo, obtenida por punción cardíaca, y en la proporción del 7%.

Sobra decir, que la preparación correcta del agar-sangre, de manera que presente una superficie pulimentada lo más perfecta posible, y un grado de sequedad adecuado, son requisitos indispensables para obtener formas de crecimiento típicas. También importa mucho la cantidad de agar-sangre vertida en las cajas de Petri, para poder observar debidamente el grado de hemólisis que haya podido ocurrir, y otros caracteres importantes como

la transparencia de las colonias, valiosos factores coadyuvantes del diagnóstico.

Las sangres de oveja y de caballo que nosotros hemos empleado en ocasiones con fines comparativos, no son de recomendar especialmente cuando se trata del **Clostridium chauvoei**.

El método de Fortner para cultivos de anaerobios se basa, en la asociación biológica de un anaerobio con un germen ávido de Oxígeno, encerrados ambos herméticamente dentro de una pequeña cámara de aire, en la cual es posible, por su reducido volumen, que el germen asociado absorba el Oxígeno existente, haciendo aptas las condiciones para el desarrollo del anaerobio.

Es el **Micrococcus prodigiosus (Bacillus prodigiosus-Serratia marcescens)**, el bacilo empleado por nosotros para la simbiosis con los anaerobios. Se trata de un coco-bacilo, anaerobio facultativo, de 0,50 x 0,50 - 1 micras. Gram negativo, que en agar común da colonias rojas en tres o cuatro días. El poder reductor del Prodigiosus, es muy enérgico. Schultze (Nº 23) ha comprobado, que este bacilo es capaz de librar de Oxígeno por ocho veces consecutivas el sistema de Fortner. La alcalinidad del medio, produce cepas acromógenas de **prodigiosus**, lo mismo que la vejez de los cultivos, probablemente por una disociación sufrida (Tipo S en R). Es necesario, resemebrar frecuentemente las cepas de **prodigiosus**, con el fin de tener cultivos frescos y de absoluta pureza, que conserven intactas las propiedades reductoras.

UTENSILIOS EMPLEADOS EN EL METODO DE FORTNER

Se requieren cajas de Petri bajas, de un centímetro de altura. Placas de vidrio de unos doce centímetros por doce centímetros, y dos milíme-

tros de grueso. Un poco de plastilina.

Técnica

Antes de hacer la siembra del anaerobio, deben efectuarse algunas operaciones preliminares con el objeto de tener todo listo para que el "cierre" de la caja se haga inmediatamente después de la siembra.

Se preparan cordones de plastilina de unos cuatro milímetros de grueso y de la longitud necesaria para contener la caja de Petri. Estos cordones deben ser de consistencia compacta, lo cual se consigue con un amasado enérgico y parejo de la plastilina; la calidad de ésta influye también en el resultado satisfactorio del "cierre", pues ha de tener un grado de dureza adecuada para que ajuste convenientemente en el ángulo formado entre la caja de Petri y la lámina de vidrio.

Debe tenerse sobre la mesa en donde se efectúa la siembra, un papel secante o un pliego de papel absorbente común.

Terminados estos sencillos preparativos, se procede a la siembra del **Prodigiosus**. Repetimos que deben tenerse cepas frescas, de 24 horas, y ojalá extendidas en cajas de agar-sangre. Como la siembra ha de ser abundante, es preferible hacerla con espátula de Drigalsky preparada ad-hoc, pero el asa común si se carga abundantemente da resultado satisfactorio. Una vez bien extendido el **Prodigiosus** en la superficie del agar, y teniendo el cuidado de dejar un margen entre la siembra del **Prodigiosus** y el borde de la caja para poder observar la extensión por esta área libre de bacilos móviles formadores de films como el **Cl. sépticum** y el **Cl. tetani**, se procede a la siembra en la otra mitad, del material que contenga el anaerobio, procurando que en las primeras estrías se quede gran parte del material tomado en el asa, pa-

ra que en las últimas puedan obtenerse colonias separadas.

Hechas ya las siembras, se toma la caja y se apoya sobre el papel secante, con el fin de secar la humedad que pueda haber en sus bordes, la cual sería causa de un "cierre" defectuoso. Luégo, se toma la lámina de vidrio que debe estar estéril y envuelta en papel protector, se flamea ligeramente por ambas caras, y contra una de ellas se adosan los bordes libres de la caja. Con los dedos de la mano izquierda se hace firme presión para que ajuste bien la caja contra la lámina y con la derecha se toma el cordón de plastilina y se coloca a presión alrededor del ángulo formado entre caja y lámina, hasta cubrir toda la circunferencia. Como esta primera presión es insuficiente para obtener un cierre hermético, se pone entonces el sistema todo ya medido cerrado, sobre la mesa, y apoyando fuertemente los dedos de la mano izquierda contra la caja, se recorre con el índice o el anular de la derecha toda la plastilina, con el fin de que adhiera definitivamente, tanto de la caja como de la lámina. Para cerciorarnos de que el cierre ha sido perfecto, nos fijamos a través de la lámina de vidrio, debiendo aparecer la plastilina como una cinta uniforme, sin abolladuras ni grietas, ni metiéndose entre el borde de la caja y la superficie de la lámina. Conseguido el cierre hermético del sistema, ya el **Prodigiosus** se encargará de absorber el poco Oxígeno que cabe entre la superficie del agar ocupado por el material sembrado y la de la lámina.

En 24 horas de incubación, ya se pueden observar a través de la lámina de vidrio, las colonias que ha formado el anaerobio, y el velo difuso y brillante producido por el abundante material sembrado de **Prodigiosus**. En cepas muy preco-

ces, a las 15 horas hemos visto formas típicas que capacitan para un diagnóstico muy seguro. Si no nos satisface el grado de desarrollo alcanzado, se vuelven a la estufa los cultivos, pues no ha habido necesidad de interrumpir la anaerobiosis, ya que como dijimos, a través de la lámina de vidrio, y mejor con la ayuda de una lupa, pueden observarse perfectamente los caracteres del cultivo.

Es de advertir, que existen naturalmente cepas poco prolíficas que necesitan más tiempo para su desarrollo.

Cuando lo juzguemos conveniente, procederemos a abrir la caja, retirando la plastilina. Para esto, utilizamos los bordes de una lámina porta-objetos común. La plastilina retirada, sirve para nuevos cierres.

Con la caja abierta, observamos con toda comdidad las colonias desarrolladas, sus caracteres secundarios, la hemólisis que haya podido ocurrir, etc., y separamos las de nuestra predilección para traslado a otros medios de enriquecimiento, inoculaciones, frctes, etc.

Las ventajas de este método saltan a la vista: la obtención de colonias con caracteres típicos en la superficie de un medio sólido contenido en placas; la facilidad para tomar estas colonias sin peligros de contaminación y trasladarlas a otros medios, o para inoculaciones en las cuales se quiera conocer el poder patógeno de un germen, haciendo a un lado las propiedades tóxicas de un cultivo en medio líquido; la observación del cultivo día a día, sin necesidad de interrumpir la anaerobiosis; la posibilidad para el diagnóstico de infecciones mixtas, el fácil manejo, la técnica sencilla, el poco costo de los utensilios empleados. hacen del sistema de Fortner, algo muy precioso para trabajos de esta índole.

Para obtención inicial del agente, su enriquecimiento y conservación,

hemos empleado el bouillón hígado según Tarozzi, en tubos comunes con tapón de vaselina. Los cubos de hígado en este medio, contribuyen poderosamente con sus propiedades nutritivas y reductoras a la consecución de la anaerobiosis, lo mismo que formando verdaderos "nidios" en donde se alojan los gérmenes. Hemos notado que algunas bacterias, entre ellas, y dicho sea de paso, el *Actynomices necrophorus* del cual hemos obtenido cultivos puros en Fortner, siendo difícil de cultivar en un medio tan nutritivo como el agar-sangre, en cambio se desarrollan abundantemente en el bouillón de Tarozzi.

CAPITULO V

Resumen y crítica de los caracteres, propiedades y artificios empleados comúnmente para la identificación de los anaerobios.

MORFOLOGIA

Largas y detalladas descripciones de la morfología de estos gérmenes se han hecho, y cada autor se toma el cuidado de hacer énfasis sobre determinado carácter que juzgan específico. No negamos que la experiencia pueda dar una noción diferencial muy aguda sobre estas características, pero consideramos que en la práctica corriente, la morfología de estos bacilos, salvo en los casos que luégo detallaremos, nada definitivo dice sobre su verdadera identidad. Qué un bacilo del género *Clostridium*, sea más largo o más corto, más o menos grueso; que su esporo sea central, subcentral o subterminal, ovoide o elipsoide, no tiene mayor importancia en la clasificación definitiva. Una determinada variedad móvil, por ejemplo, pierde su movilidad en cultivos viejos, y lo mismo le sucede cuando se acostumbra a vivir en medios azucarados. La morfología puede variar

considerablemente de un día para otro en un mismo medio, de acuerdo con los diversos estados evolutivos, y un bacilo que hoy es Gram-positivo, mañana puede no serlo, y el que mañana tenga la forma de un simple bastón, pasado puede tener una extraña forma de evolución, para convertirse luego en raqueta, huso, etc.

Para que los caracteres morfológicos tengan algún valor, deben ser observados inmediatamente después del aislamiento.

La inmovilidad del **Clostridium welchii**, unida a la presencia de una cápsula en cultivos jóvenes, a la apariencia rechoncha del bacilo y a la dificultad para espcrular, son ya una base para la sospecha muy fundada de este germen. El esporo terminal y redondo del **Cl. tetani**, es también característico, sobre todo en cultivos viejos, pues en cultivos recientes, los esporos pueden ser de forma oval. No hay que olvidar sin embargo, que existen otros **Clodistridium**, muy difundidos en la naturaleza, conocidos bajo el común nombre de "pseudo-tetánicos", con morfología análoga a la del productor del Tétanos.

Las largas cadenas en la superficie del hígado de curies inoculados con **Cl. sépticum**, a pesar de ser muy características y constantes, no siempre existen, concepto éste, entre otros, de Weinberg y Séguin, autoridades en la materia. (Nº 15).

Cultivos

Los métodos culturales tiene un valor muy grande cuando se combinan unos con otros. En medios líquidos, a excepción de la leche, los cultivos de anaerobios no presentan reacciones muy características. En el medio de Tarozzi y en caldo de hígado, hemos observado en casi todos los gérmenes estudiados, el mismo proceso, consistente en el enturbiamiento uniforme del medio,

para luego formar en dos o tres días un depósito sucio en el fondo, con aclaramiento del resto. La producción de gas, manifestada por el desplazamiento del tapón de vaselina, es particularmente intensa si se trata del **Cl. welchii**. La fermentación violenta de la leche en 24 horas, con fragmentación del coágulo por el gas, es patognomónica del **Cl. welchii**.

Los cultivos en medios sólidos tienen una importancia fundamental en el reconocimiento y aislamiento de estos gérmenes. Ya anotamos los inconvenientes de los cultivos en profundidad; hacemos referencia a los obtenidos en la superficie del agar-sangre. En manos experimentadas, la observación de las colonias en la superficie de agar-sangre, puede evitar muchos ensayos inseguros y demcrados, especialmente en animales de laboratorio. La hemólisis, por ejemplo, es un carácter tan importante, que si la siembra no resulta hemolítica, pueden descartarse la mayoría de los anaerobios patógenos.

Algunos de estos anaerobios tienen formas de crecimiento características que capacitan al investigador para hacer un diagnóstico muy acertado. Describiremos brevemente dichas formas, por ser ellas la base de nuestros trabajos prácticos.

CLOSTRIDIUM SEPTICUM

A las 24 horas de cultivo, ya puede observarse a través de la lámina de vidrio en el sistema de Fortner, la formación de un césped fino que tiende a invadir la superficie del agar en todas direcciones, y la producción de una ligera hemólisis difusa. A las 48 horas, el césped ha adquirido su completo desarrollo y la hemólisis es más intensa, de mercado tipo difuso muy característico. Las ramificaciones del césped son como finos hilos que se entrecruzan en todo sentido, y re-

basan el área de la estría, invadiendo la superficie del agar que no ha sido tocada por el asa, e internándose en el campo sembrado de **Prodigiosus**. Esta forma corresponde a la III de Zeissler, la cual puede ser dada también por el **Cl. tetani**, aunque el césped formado por éste es más fino, y por el **Cl. putrificus tenue**, germen apatógeno y no hemolítico. El **Cl. tetani** tiene por lo demás caracteres morfológicos inconfundibles con los del **Cl. sépticum**. Este puede dar formas crecientes atípicas (forma Ha; de Zeissler) consistentes en colonias floculentas, con prolongaciones o raíces hemolíticas que se prolongan también en varios sentidos, y que, por su longitud y enmarañamiento, facilitan la diferenciación del **Cl. sépticum**.

CLOSTRIDIUM CAHUVOEI

Es típica para este germen la forma IV de la clasificación de Zeissler, consistente en colonias planas, abotonadas o en forma de una hoja de parra, con un anillo periférico y abolladuras en el centro de la colonia. Vista al trasluz, da la apariencia como de un aro, pues el centro es abollado, en forma de cráter. La colonia está rodeada de una zona estrecha de ligera y opaca hemólisis. A veces se presentan formas un poco atípicas que recuerdan la forma IIa. de Zeissler, pero que se diferencian por sus ramificaciones muy cortas.

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Forma colonias redondas, brillantes, lisas, de bordes netos, y rodeadas de una zona intensa de hemólisis. Esta forma corresponde a la I. de Zeissler.

CLOSTRIDIUM OEDEMATIENS

Se presenta en forma de colonias a veces circunscritas, a veces difusas, con ramas encurvadas, cortas, y a menudo dobles. La colonia es-

tá rodeada siempre de una zona de hemólisis más extensa y marcada que la del **Cl. chauvoei**, y de un tipo transparente.

CLOSTRIDIUM TETANI

Forma una delgada película muy fina, con bordes filamentosos, que tiende a invadir el agar y el campo del **Prodigiosus**, produciendo un tipo de hemólisis difusa.

Los cultivos en suero coagulado y en gelatina no son muy característicos y tienen más importancia para las variedades proteolíticas, **Cl. sporogenes**, **Cl. histolyticus** y **Cl. putrificus**, que apenas juegan un papel de asociación en algunos casos de afecciones grangrenosas mixtas.

PROPIEDADES BIOQUIMICAS

Hemos estudiado la acción sobre los azúcares más característicos, lactosa, salicina y sacarosa, pero hemos de anotar que los diversos autores están en desacuerdo con cuanto a la acción fermentativa de estos gérmenes, y mientras Jordán (18) trae como característica para el **Cl. oedematiens**, la no fermentación de la lactosa, Hauduray, Ehringer y otros (15) la dan como inconstante, y Kolmer (19), como positiva. Lo mismo podríamos decir de los otros anaerobios sobre cuyo poder fermentativo discrepan ampliamente los diversos autores.

Hemos observado en nuestra práctica como rasgos más característicos y constantes, la acción cruzada del **Clostridium sépticum** y del **Cl. chauvoei** sobre la salicina, la fuerte producción de gas por el **Cl. perfringens** y el débil poder fermentativo del **Cl. chauvoei**. El medio empleado ha sido el caldo común con tapón de vaselina, y el indicador usado, el de Andrade, en la proporción del 1%. La producción de gas se manifiesta por el levantamiento del tapón y la de ácido por el cambio del color amarillo ambarino del caldo, por rojo anaranjado.

La acción sobre los próticos la hemos estudiado únicamente en la leche, que como ya lo dijimos, da una reacción característica para el **Cl. perfringens**, conocida y practicada en todos los laboratorios, y de importancia en el reconocimiento de leches.

PODER PATOGENO

La inoculación de animales debe complementar los estudios culturales, y es el curí el animal electivo para estas pruebas. La vía de inoculación preferible es la intramuscular profunda, pero a veces la hemos combinado a la intraperitoneal, para unir la virulencia de un germen a su poder tóxico. El conejo en inoculación endovenosa, ha sido preconizado para el **Cl. perfringens**, y hemos tenido oportunidad de ensayarlo con tal fin. El ratón lo hemos empleado para pruebas con **Cl. tetani** y se recomienda para la toxina del **Cl. botulinum**.

Las propiedades patógenas de un determinado anaerobio, varían considerablemente con la edad de la cepa y del cultivo mismo. Las cepas viejas pierden gradualmente su virulencia, especialmente las del **Cl. chauvoei** y **Cl. oedematiens**, y los cultivos de varios días adquieren propiedades tóxicas que hacen variar considerablemente las lesiones en los animales inoculados.

Algunos autores traen documentados cuadros y extensas descripciones sobre los caracteres anatómo-patológicos de curies inoculados con los diversos anaerobios. No tenemos experiencia ni autoridad para discutir este ni otro cualquiera de tan complejos problemas, pero es nuestra opinión, que caracteres tales como la mayor o menor producción de gas; el olor fétido, rancio o sulfuroso; la predominancia de enfisema o de edema; la naturaleza serosa o sanguinolenta de éste; la variedad en el tono de su

color, la intensidad de la miólisis, etc., no dan la pauta para sacar conclusiones definitivas en materia de diagnóstico. En todo caso, se necesitaría de gran práctica y experiencia continua para hacer valederas tales observaciones.

En nuestras experiencias al respecto, hemos observado que el **Cl. sépticum**, produce siempre lesiones congestivas más intensas que sus congéneres y, muy constantemente, una marcada enteritis del delgado, en especial del ileon. El **Chauvoei** produce lesiones congestivas intensas, pero sin un rasgo característico. El **Cl. welchii** ocasiona un color rosado salmón de los músculos, los cuales se encuentran como disociados por depósitos de gas. El cuadro descrito como típico para el **Cl. oedematiens**, consistente en un edema gelatinoso blanco, no hemorrágico y sin gases, lo hemos constatado en una observación que tenemos al respecto. Sin embargo, este cuadro puede confundirse con el producido por cepas esencialmente toxígenas de otros anaerobios que no alcanzan a producir alteraciones musculares. Súmese a esto, que puede haber cepas de **Cl. oedematiens** con mayor acción infecciosa que tóxica, las cuales pueden causar congestiones musculares intensas.

Y resumiendo diremos, que estas lesiones varían considerablemente sobre todo con la edad del cultivo, la cantidad inoculada y la vía elegida.

PRUEBAS DE PROTECCION EN ANIMALES

Hemos hecho algunos ensayos de protección activa y pasiva en animales de laboratorio, más que todo con el objeto de probar el valor del método de Fortner. Estos ensayos, que no abarcan a la totalidad de las cepas estudiadas, pero que dan margen para juzgar a las

que presentan los mismos caracteres culturales en agar-sangre, se dificultan extraordinariamente sin poseer sueros específicos de difícil consecución y elaboración.

Los ensayos de inmunización activa en curies, son difíciles de practicar, demorados e inseguros. De dos grupos de curies que teníamos en inmunización, la mayoría sucumbió durante el proceso, a causa probablemente de una intoxicación de origen alimenticio. Las pocas pruebas que pudimos practicar, nos demostraron que la inmunidad producida por este sistema en animales de laboratorio, no es suficiente para contrarrestar las propiedades virulentas de un cultivo fresco. La inmunización activa tiene resultados seguros, o más o menos seguros, para casos de infección natural, en animales naturalmente susceptibles. En todo caso, para que estas pruebas tuvieran un resultado satisfactorio, se necesitaría hacer inoculaciones de tanteo, con el fin de aproximar las dosis mortales mínimas, y proceder luego a las inoculaciones definitivas con testigos.

Hicimos algunos ensayos muy alentadores, que relatamos al final de la parte práctica, con Suero Antigangrenoso "Behring", el cual contiene por cada 10 cc., 1.000 U. iles. anti-perfringens, 500 U. iles. anti-vibrión séptico, 400 U. iles. anti-adematosas, y 85 U. iles. anti-histolyticas. Para protección contra el **Clostridium tetani**, usamos Suero Antitetánico "Behring".

De las experiencias de protección hechas podemos concluir, que sin sueros específicos para cada agente, rigurosamente titulados, que sirvan no sólo para producir una inmunidad verdadera, sino también para obtener aglutinaciones específicas, no se pueden dar resultados categóricos por estos procedimientos.

CAPITULO VI

Plan para la identificación de anaerobios en la práctica corriente. Comentarios generales

OBTENCION DEL AGENTE

El material electivo en el caso de "Edema Gaseoso" (Carbón Sintomático, Edema Maligno, Enterotoxemias, Gangrena Gaseosa), es el foco infeccioso mismo: músculos, tejidos gangrenosos (Carbón Sintomático, Edema Maligno, Gangrena Gaseosa), mucosa intestinal o gástrica (Enterotoxemias). El **Cl. tetani** se buscará en el fondo de la herida sospechosa, y la toxina del **Cl. Botulinum**, en el alimento del que se presume sea el causante de la afección.

La médula ósea es un material bastante recomendable, si la enfermedad no ha revestido un carácter especialmente tóxico, y de ella hemos logrado aislar en estado de pureza, diversos anaerobios productores de "Carbón Sintomático". Lo mismo puede decirse de la sangre, siempre y cuando se proceda rápidamente después de la muerte. El hígado está también indicado en estos casos. En las Enterotoxemias de ovinos el agente causal generalmente no pasa a la sangre, y sólo se le halla en la mucosa lesionada y en los ganglios linfáticos vecinos.

En cuanto a la invasión del organismo después de la muerte por la flora intestinal, se ha discutido amplia y enconadamente. Afirman los unos, entre ellos Ruppert y Rottgard (24) que el **Cl. sépticum** invade siempre la médula ósea después de la muerte. Otros, como Meyn y Miessner (24), opinan que, "cuando se aparta el hueso un poco después de la muerte, el hallazgo del **Cl. sépticum** indica que este anaerobio ha jugado un papel importante en la enfermedad". Becker (24) por su

parte ha demostrado, que la sangre del corazón de curies inoculados con diversos anaerobios y con **bacillus anthracis**, no está invadida por la flora intestinal antes de 50^a a 60^a hora después de la muerte, desde que los cadáveres permanezcan a una temperatura inferior a 23° centígrados.

En nuestras experiencias hemos observado, que en la sangre del corazón y en el hígado de curies inoculados con diversos gérmenes, que han muerto en el transcurso de la noche y son autopsiados en las horas de la mañana, no se encuentra ningún género de contaminación. Es muy posible, naturalmente, que la contaminación post-mortem ocurra con mayor rapidez en climas cálidos.

Es nuestra opinión, que si en la médula ósea de un ternero que se sospecha haya muerto de "Carbón Sintomático", se encuentra en **estado de pureza**, el **Cl. sépticum**, el **Cl. welchii**, o el **Cl. oedematiens**, estos anaerobios han jugado un papel definitivo en la enfermedad. Si el **Vibrión séptico** se encuentra en la médula combinado con diversos agentes banales, aerobios y anaerobios, es también lógico suponer que su presencia en estas condiciones carece ya de importancia diagnóstica.

CULTIVO DEL GERME

Una vez obtenido el material indicado, se siembra en bouillon de Tarozzi, y después de 24 horas de incubación, se observa al microscopio, morfología, caracteres tintoriales y movilidad. Si el material está muy contaminado, conviene, antes de dar otro paso cualquiera, hacer un calentamiento del cultivo al baño maría, con el fin de destruir los agentes no esporulados. La duración de este calentamiento y el grado de temperatura que debe al-

canzar, es cosa que varía según el criterio de cada autor. Hemos ensayado diversas temperaturas por tiempos variables, y nos han resultado favorables los calentamientos bajos y prolongados, como una hora a 65° centígrados, que al mismo tiempo que destruyen la gran mayoría, si no la totalidad de los agentes no esporulados, respetan las propiedades de los anaerobios sospechosos.

SIEMBRA EN SUPERFICIE. INOCULACIONES, SIEMBRA EN LECHE

A partir del cultivo en bouillon de Tarozzi, se hará la siembra en superficie de agar-sangre, las inoculaciones necesarias, y la siembra en leche, si se sospecha del **Cl. welchii**.

Como lo anotamos al describir el método de Fortner, la sola observación de los cultivos en la superficie de agar-sangre, permite al investigador experimentado un diagnóstico muchas veces definitivo que ahorrará largos e inseguros procedimientos. Sin embargo, la acción patógena de determinado agente es de mucha importancia, y la inoculación al curi debe hacerse simultáneamente con la siembra en agar-sangre, si el cultivo en Tarozzi está puro. Si ha sido necesario el calentamiento, el cultivo ya no será apto para la inoculación, imponiéndose la siembra en agar-sangre, para tomar de aquí el germen y pasarlo nuevamente a Tarozzi, a partir del cual haremos las inoculaciones del caso.

Si la morfología observada en el primitivo cultivo en Tarozzi nos hace sospechar del **Cl. welchii**, inocularemos simultáneamente con la caja de agar-sangre y el animal elegido (curi o conejo) un tubo de leche, el cual en caso de tratarse de este agente, nos dará una reacción característica en 24 horas.

La vía preferible para la inoculación en el curí es la intramuscular. Los cultivos primitivos en bouillon de Tarozzi, gozan generalmente de un marcado poder patógeno, y la dosis de 0,50 cc., es más que suficiente para producir la muerte del animal en el transcurso de 12 a 36 horas. Las cepas viejas, especialmente de **Cl. chauvoei**, y del **Cl. oedematiens**, pierden gradualmente su poder patógeno, y con ellas se requieren dosis mayores para obtener la muerte de los curies inoculados.

El conejo es empleado por algunos como animal electivo para el **Cl. welchii**, y la vía utilizada es la intravenosa, sacrificando el animal, cinco minutos después de la inoculación, para ponerlo en la estufa por 5 a 6 horas. El **Cl. welchii**, se manifestará por distensión gaseosa, de órganos y tejidos, crepitación generalizada.

Para el **Cl. tetani** y su toxina, y para la toxina del **Cl. botulinum**, el animal electivo es el ratón en inoculación intraperitoneal. Si queremos observar el cuadro clínico del "Tétanos" experimental, haremos la inoculación del ratón en la base de la cola, a partir de un cultivo reciente en caldo, donde aún no haya toxina suficiente para producir una muerte rápida (la que nunca ocurre antes de 8 horas por más tóxico que sea el cultivo), o mejor, con emulsión en solución fisiológica de las colonias obtenidas en la superficie de agar-sangre. Para la investigación de la toxina botulínica, se procede con filtrados de alimentos sospechosos, mientras los testigos reciben el mismo filtrado, pero calentado a 70° centígrados durante una hora para destruir la toxina.

AUTOPSIA. RECUPERACION DEL AGENTE Y OTROS ENSAYOS

Observados los cultivos en la superficie del agar-sangre, los sínto-

mas y las lesiones que presenten los animales inoculados, y los frotos de la superficie del hígado, tenemos ya recorrido en gran parte el camino para la identificación del anaerobio.

El germen se recupera del hígado y de la sangre del corazón de los animales inoculados, sembrando en Tarozzi. Cuando se trata de cepas especialmente toxígenas, el agente no alcanza a invadir el organismo y hay que recobrarlo del punto de la inoculación. A partir de las colonias obtenidas por el método de Fortner que nos den garantía de pureza, haremos ensayos posteriores sobre azúcares, especialmente con lactosa, salicina y sacarosa, y con glicerina e inulina, de importancia estos últimos para los diversos tipos de **Clostridium perfringens**.

La acción proteolítica, en cultivos sobre gelatina y suero coagulado, lo mismo que la producción de Indol, son tan inconstantes y variables que nada agregan a lo que las otras pruebas nos hayan dicho.

PRUEBAS DE PROTECCION EN ANIMALES

Se procederá de acuerdo con las facilidades (sueros y vacunas) que se posean en el laboratorio. Debe tenerse muy en cuenta la posible diferencia antigénica de razas y subrazas, el grado de inmunidad obtenido en los animales protegidos, la dosificación correcta de toxina y de antitoxina, la virulencia de las cepas empleadas, antes de dar un fallo definitivo.

CAPITULO VIII

Trabajos prácticos.

De nuestros numerosos trabajos prácticos con diversos agentes del género **Clostridium**, hemos escogido las observaciones que nos pare-

cen más interesantes, tratando de sintetizar las pruebas de una misma índole practicadas con un mismo agente. Para experiencias de esta naturaleza, el ideal sería comprobar en el laboratorio las sospechas que personalmente se hayan fundado en la observación clínica. Como esto nos fuera imposible, hemos procurado tener en cuenta aquellas observaciones en las cuales la sospecha haya sido establecida por un Médico Veterinario, o por personas asesoradas por uno de ellos.

OBSERVACION N° 1

Especie: Bovina.

Edad: 1 y medio años.

Material: Hueso (Gran metacarpiano o metartasiano).

Procedencia: Funza (Cundinamarca).

Remitente: Dr. Alberto L. Herrán, Médico Veterinario.

Sospecha: Carbón Sintomático.

CARACTERES CULTURALES. MORFOLOGIA

En aerobiosis: (Agar-Sangre, caldo ordinario). Negativo total.

En anaerobiosis:

BOUILLON DE TAROZZI

A las 24 horas de incubación, enturbiamiento uniforme, escasa producción de gas y olor butírico. A las 48 horas se ha formado ya un sedimento gris en el fondo del tubo. Los frotos muestran un bacilo largo y grueso, de tipo *Clostridium*, Gram-positivo, aislado, o a lo sumo de a dos elementos, recto o ligeramente curvo, con escasos esporos ovales, subterminales, que dan al bacilo la apariencia clásica de raqueta. Se observa una movilidad muy lenta, casi imperceptible.

SUPERFICIE DE AGAR-SANGRE (Fortner)

A las 48 horas se ven colonias aisladas, de formas irregulares, por lo general alargadas, como islotes, opacas, de bordes rugosos y con prolongaciones periféricas cortas y poco entrelazadas. Una zona de hemólisis medianamente intensa y de considerable extensión rodea a cada colonia. La cepa pierde gradualmente su poder prolífico y sólo da colonias al cabo de cuatro días de cultivo en Fortner. Los frotos de cultivo en agar-sangre, nos muestran el mismo tipo de bacilo, grueso y largo observado en Tarozzi, aún sin esporular; algunas formas toman el Gram, otras no.

PODER PATOGENO

La inoculación de un centímetro de cultivo en Tarozzi en 24 horas, en inyección intramuscular, produce la muerte del curi N° 19 en 48 horas. Se encuentra en la autopsia, una infiltración del tejido muscular y subcutáneo de apariencia gelatinosa, sin gases ni congestión. Los órganos internos, normales macroscópicamente. En los frotos de la superficie del hígado, encontramos el mismo tipo de bacilo observado en los cultivos, grueso, largo, aislado, algunos con esporo subterminal oval. Las siembras de hígado, sangre del corazón y líquido del edema subcutáneo, reproducen exactamente los mismos caracteres culturales observados antes de la inoculación. Los curis números 20 y 38, reaccionan idénticamente al anterior con cultivos de 24 y 48 horas, respectivamente, recibiendo el primero un centímetro (la mitad intramuscular, la mitad intraperitonealmente); el segundo 1 c.c. intramuscularmente. La muerte fluctúa entre 36 y 48 horas, repitiéndose las mismas lesiones; del hígado y de la sangre del corazón, se recobra el mismo agente.

La cepa ha perdido con el tiempo gran parte de su primitiva virulencia, y el curí número 8, muere después de 5 días de inoculación por vía intramuscular, con 2 c.c. de cultivo en Tarozzi, de 24 horas, presentando, eso sí, el mismo tipo de edema blanquecino y no hemorrágico, además de algunas manchas necróticas en la superficie del hígado. De éste y de la sangre del corazón se recupera el mismo agente inoculado.

LECHE.—No se produce fermentación en 15 días de observación.

AZUCARES.—Lactosa: negativo. Sacarosa: negativo. Salicina: negativo. Esta observación ha sido hecha con la cepa ya vieja.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO: *Clostridium oedematiens* (Novy).

COMENTARIOS

El carácter de las colonias en Fortner, unido a la observación del cuadro anatómo-patológico de los curies inoculados, nos dan base por demás suficiente, para catalogar el bacilo encontrado como *Clostridium oedematiens*. Confirmamos las sospechas de Carbón Sintomático establecidas por el doctor Herrán, y juzgamos que sea éste un caso aislado producido por el *Clostridium oedematiens*, el cual se ha encontrado en estado de pureza en la médula ósea.

OBSERVACION N° 2

Especie: Bovina.

Edad: 1 año.

Material: Hueso (Gran metacarpiano o metatarsiano) Músculo.

Procedencia: Madrid (Cundinamarca) Hacienda de "Montecristo".

Remitente: señor Joaquín Quiñones.

Sospecha: Carbón Sintomático.

CARACTERES CULTURALES MORFOLOGIA

En aerobiosis:

Las siembras de músculo dan agentes de contaminación; las de médula ósea, resultan totalmente negativas.

En anaerobiosis:

BOUILLON DE TAROZZI

Después de 24 horas se nota bastante producción de gas y enturbiamiento uniforme del medio. La producción de gas es menor en la siembra con médula. Los frotos muestran un bacilo delgado, fino, con esporo oval, central o subcentral. Gram-positivo. Se observa movilidad ligera. Como el cultivo de músculo resulta muy contaminado y el de médula, puro, seguimos nuestros estudios a partir de éste.

SUPERFICIE DE AGAR-SANGRE (Fortner).

A las 24 horas se notan ya colonias redondas, abotonadas y en forma de naveta, con reborde periférico y abolladuras centrales, rodeadas de una zona hemolítica débil y poco extensa. Estas colonias típicas de *Cl. chauvoei*, alcanzan el maximum de desarrollo en 48 horas.

PODER PATOGENO

Se inocula el curí número 25 con un centímetro de cultivo en Tarozzi de 24 horas, aplicando la mitad intramuscular y la mitad intraperitonealmente. El animal muere en 18 horas. Se encuentra violento edema hemorrágico de la pierna y parte posterior del abdomen sin llegar al pecho, con escasa producción de gas, pero sin olor especial. Hepatitis, peritonitis, e inflamación

aguda del diafragma. En frotos de la superficie del hígado, se ve un bacilo delgado, recto, aislado, aun sin esporular. Del hígado, sangre del corazón y músculos afectados, se recobra el mismo bacilo, que reproduce exactamente los caracteres culturales primitivos. Los curies números 56 y 26, con inoculaciones de 1 c.c. intramuscular y de 1 c.c. (la mitad intramuscular y la mitad intraperitoneal) respectivamente, reaccionan de idéntica manera y mueren en el transcurso de 12 a 24 horas, recobrándose de la sangre del corazón el mismo agente.

LECHE.—No se observa fermentación en 15 días.

AZUCARES.—Lactosa: dudosa. Sacarosa: dudosa; Salicina; negativo.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO: *Clostridium chauvoei*.

COMENTARIOS

La siembra en superficie de agar-sangre, nos mostró desde un principio la presencia de *Clostridium chauvoei* en estado de pureza, partiendo de la médula ósea. Las posteriores pruebas confirman el diagnóstico. Las propiedades fermentativas sobre los azúcares resultaron muy débiles, y en sacarosa y lactosa, sólo tuvimos reacciones dudosas que no podemos catalogar como definitivamente positivas. Es éste, un caso clásico de "Carbón Sintomático" en ternero, producido por el *Clostridium chauvoei*.

OBSERVACION Nº 3

Especie: Bovina.

Edad: Ternero (sin especificación).

Material: Hueso (Gran metacarpiano o metatarsiano).

Procedencia: Cali (Valle).

Sospecha: Carbón Sintomático.

Remitente: Guillermo Garcés O'Byrne.

CARACTERES CULTURALES MORFOLOGIA

En aerobiosis:

(Agar-sangre, caldo ordinario, Drigalsky) Negativo total.

En anaerobiosis:

BOUILLON DE TAROZZI

A las 24 horas, mediana producción de gas, enturbiamiento uniforme y depósito gris sucio en tres días. Los frotos muestran un bacilo delgado, fino, Gram-positivo, con esporos ovales, subterminales y sub-centrales que dan al bacilo la apariencia de barril. Móvil.

SUPERFICIE DE AGAR-SANGRE (Fortner).

Después de 24 horas, se observa a través de la lámina de vidrio en el sistema de Fortner, un film difuso en forma de césped, con prolongaciones en todo sentido, enmarañadas, tendiendo a invadir la superficie ocupada por el *Prodigiousus*. La hemólisis es de un tipo difuso. A las 48 horas el césped ha invadido la mitad de la superficie del agar-sangre y se adentra en el campo del *Prodigiousus*. Esta cepa, con el envejecimiento, da en la superficie del agar formas un poco atípicas, consistentes en colonias que tienden a formar núcleos circuncritos de los cuales parten prolongaciones largas y enmarañadas que en 3 o 4 días de cultivo terminan por invadir la superficie del agar. El grado de hemólisis, a pesar de ser de un tipo difuso característico, ha disminuído en intensidad, pero estos caracteres que pueden considerarse como una disociación de la cepa, son suficientes para identificar el *Cl. sépticum*.

PODER PATOGENO

La inoculación de medio centímetro de cultivo en Tarrozzi de 24 horas por vía intramuscular, produce la muerte del curí número 31 en 12 horas. Se encuentra violento edema hemorrágico de la pierna, abdomen y pecho, sin gases ni olor especial. El color de los músculos y tejido subcutáneo es rojo encendido y en zonas negruzco. El intestino delgado se halla altamente congestionado y los demás órganos normales. En las preparaciones hechas mediante la coloración de frottes de la superficie del hígado, se ven largos filamentos que atraviesan todo el campo, típicos del *Cl. sépticum*. La siembra del hígado y sangre de corazón en Tarrozzi y luégo en Fortner, reproduce los mismos caracteres de los cultivos primitivos. Los curies número 70 y número 55, reaccionan de igual manera, con dosis de medio centímetro intramuscular y 1 c.c. (medio intraperitoneal), respectivamente, recobrándose del hígado y de su sangre cardíaca el mismo agente. La cepa con el tiempo no parece haber perdido su primitiva virulencia.

LECHE.—No se observa fermentación en 15 días de observación.

AZUCARES.—Lactosa: positivo. Sacarosa: negativo. Salicina: positivo.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO.—*Clostridium sépticum*.

COMENTARIOS

La siembra en la superficie de agar-sangre nos dijo desde un principio que se trataba de *Clostridium sépticum* en estado de pureza en la médula ósea. La inoculación de curies, el frote de la superficie del hígado y la acción sobre los azúcares, sólo sirvieron para confirmar nuestro diagnóstico. Esta-

blecida la sospecha de "Carbón Sintomático" por el remitente, y no habiéndose encontrado ningún anaerobio o aerobio concomitante en la médula, es lógico concluir que sea éste un caso de "Carbón Sintomático" producido por el *Clostridium sépticum*.

OBSERVACION N° 4

Especie: Bovina.

Edad: Vaca (sin especificación).

Material: Hueso (Gran metacarpiano o metatarsiano).

Procedencia: San Francisco (Cundinamarca) Hacienda "La Carlina".

Remitente: Sr. Arturo Pradilla.

Sospecha: Sin especificación.

CARACTERES CULTURALES MORFOLOGIA

En aerobiosis:

Caldo ordinario, Agar-sangre; Drigalsky, negativo total.

En anaerobiosis:

BOUILLON DE TAROZZI

Después de 24 horas, producción de poco gas enturbiamiento uniforme, olor putrífico. Después de 3 días, sedimentación y aclaramiento del Bouillon. Los frottes muestran un tipo de bacilo grueso y corto, con esporos ovales que deforman el cuerpo del bacilo, tomando éste la forma de barril. Se observa ligera movilidad.

SUPERFICIE DE AGAR-SANGRE (Fortner).

A las 24 horas se ven colonias transparentes, delicadas, de bordes ligeramente irregulares, con reborde periférico y abolladura en el centro que les da el aspecto de cráteres. Zona hemolítica débil y poco extendida alrededor de cada colonia. En los frottes se ven algunas formas Gram-negativas.

PODER PATOGENO

El curí número 73 recibe medio c.c. de cultivo en Tarozzi de 24 horas por vía intramuscular y muere en 12 horas. Presenta edema hemorrágico extendido en la pierna, abdomen y pecho; los músculos toman un color bermejo oscuro. El intestino se encuentra ligeramente congestionado. En frotos de la superficie del hígado, se ven bacilos cortos y delgados, Gram-positivos, sin esporular. Del hígado y de la sangre del corazón se recobra el mismo agente inoculado, que en Fortner, da de nueve colonias típicas de *Clostridium chauvoei*. Lesiones idénticas se producen en el curí número 97 con la aplicación de 1 c.c. (la mitad intramuscular y el resto intraperitonealmente). La cepa ha perdido gradualmente su virulencia, y la inoculación de 1 c.c. (medio im. y medio i.p.) en los curíes números 12 y 14, no logra producir sino una leve reacción local.

LECHE.—No se observa fermentación en 15 días de observación.

AZUCARES.—Lactosa: positivo. Sacarosa: negativo. Salicina: negativo.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO: *Clostridium chauvoei*.

COMENTARIOS

Estamos en presencia de un caso de Carbón Sintomático, clásico por su agente etiológico, no por el animal atacado, que es adulto. La observación de las colonias en agar-sangre, nos lo había dicho antes de que las otras pruebas lo confirmaran. Si algunos autores traen como positiva la acción del *Clostridium chauvoei* sobre la sacarosa (Bryan, 6), otros (Ehringer, Urbain 15) la dan como negativa y Bergey (4) en su "Determinative Bacteriology", no la menciona, probablemente por inconstante.

OBSERVACION Nº 5

Especie: Bovina.

Edad: Vaca (sin especificación).

Material: Hueso (Gran metacarpiano o metatarsiano).

Procedencia: Cunday (Cund.).

Remitente: Compañía Cafetera de Cunday.

Sospecha: Sin especificación. En las vacas de la Compañía vienen sucediéndose muertes esporádicas de animales a los cuales "se les hincha la garganta y mueren en 1 a 2 días".

CARACTERES CULTURALES MORFOLOGIA**En aerobiosis:**

(Agar-sangre, caldo común), totalmente negativo.

En anaerobiosis:

(Bouillón de Tarozzi).

En 24 horas de cultivo, enturbiamiento uniforme y gran producción de gas. El depósito demora en formarse 6 a 7 días. Los frotos muestran un bacilo corto y grueso, de apariencia rechoncha aislado o en cadenas de 2 a 3 elementos; se nota una ligera areola rodeando el bacilo. No se aprecia movilidad, en preparaciones no fijadas.

SUPERFICIE DE AGAR-SANGRE (Fortner).

A las 24 horas de cultivo se observan pequeñas colonias redondas, brillantes, compactas, que resaltan en la superficie del agar, de contornos netos y rodeadas de una zona hemolítica particularmente intensa y de una extensión tres o cuatro veces mayor que la de sus propios diámetros. En los frotos se observan bastoncitos rectos, sin esporos aparentes, de extremos redondeados, intensamente Gram-positivos.

PODER PATOGENO

El curi número 95, recibió 0,3 c.c. de cultivo de Tarozzi de 24 horas por vía intramuscular, muriendo a las 24 horas. Se encuentra edema gaseoso y ligeramente hemorrágico de la pierna y abdomen. Los frotos de la superficie del hígado, muestran un bacilo corto y grueso, rodeado de la misma areola observada en Tarozzi, y aislado, o a lo sumo de de a dos elementos. La siembra del hígado y de sangre del corazón, reproduce exactamente los mismos caracteres culturales primitivos. Los curies números 2 y 13 con inoculaciones, respectivamente, de 0,5 c.c. intramuscular y de 1 c.c. (medio c.c. i.m. y medio i.p.) mueren en el transcurso de 24 a 36 horas, siendo de notar un olor sulfuroso del cadáver, marcada distensión gaseosa, y color salmón de los músculos y del tejido conjuntivo subcutáneo lesionados. De la sangre del corazón de estos mismos curies se recupera el mismo agente.

LECHE.—En 24 horas, coagulación violenta con fragmentación total del coágulo el cual toma la apariencia de esponja. En 15 días de observación, el coágulo no ha variado.

AZUCARES.—Lactosa: positivo. Sacarosa: positivo. Salicina: negativo.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO: *Clostridium perfringens*.

COMENTARIOS

El diagnóstico no ha ofrecido problemas; las colonias en Fortner y el tipo de coagulación fragmentada de la leche en 24 horas, lo aseguran. No sabemos si exista el antecedente de una herida, pero en la información del remitente se nos habla de varios casos análogos. Si lo primero, tendríamos un caso clásico

de "Gangrena Gaseosa". Si nos atenemos a la información, se podría pensar en casos esporádicos de "Carbón Sintomático" espontáneos por *Cl. welchii*, en bovinos adultos, ocurridos en una zona en donde este agente esté gozando de particular virulencia, que le permite hacer sus víctimas intermitentemente.

OBSERVACION Nº 6

Especie: Bovina.

Edad: 8 a 12 meses (ternero).

Material: Hueso (Gran metacarpiano o metatarsiano).

Procedencia: Melgar (Cundinamarca), hacienda "La Florida".

Remitente: Hijos de Guillermo Sáenz.

Sospecha: Indeterminada.

CARACTERES CULTURALES MORFOLOGIA

En aerobiosis:

Negativo total.

En anaerobiosis:

BOUILLON DE TAROZZI

A las 24 horas mediana producción de gas, enturbiamiento uniforme, olor butírico. Al microscopio, bacilo delgado de extremos afilados, corto, Gram-positivo, esporo oval, subterminal y escasa movilidad.

SUPERFICIE AGAR-SANGRE (Fortner).

A las 30 horas de cultivo se observan colonias planas, transparentes, con abolladuras centrales, de bordes ligeramente festoneados, con reborde periférico y zona hemolítica circundante estrecha y de escasa intensidad. Los frotos muestran bacilo delgado- Gram-positivo, aunque algunas formas se han decolorado.

PODER PATOGENO

El curí número 18 recibe en inyección intramuscular 1 c.c. de cultivo en Tarozzi de 24 horas. Muere en 36 horas y presenta edema hemorrágico no muy marcado de la pierna y parte posterior del abdomen. Los frotos de la superficie del hígado muestran un bacilo delgado, de extremos redondeados, Gram-positivo y aislado. Del hígado y de la sangre del corazón se recobra el mismo agente. Los curíes números 29 y 73 con inoculaciones respectivas de 1 c.c. intramuscular y de 1 c.c. (mitad intramuscular y resto intraperitonealmente), mueren en el transcurso de 24 a 36 horas presentando edema hemorrágico violento de la pierna, abdomen y pecho.

LECHE.—No se observa fermentación en 15 días de observación.

AZUCARES.—Lactosa: positivo. Sacarosa :negativo. Salicina: negativo.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO: *Clostridium chauvoei*.

COMENTARIOS

Las formas típicas de las colonias en la superficie de agar-sangre, complementado luego por las otras pruebas, hacen de éste un caso clásico de "Carbón Sintomático" en bovino joven, producido por el *Clostridium chauvoei*.

OBSERVACION Nº 7

Especie: Bovina.

Edad: 9 meses.

Material: Hígado, hueso (gran metacarpiano o metatarsiano).

Remitente: Dr. Hermann Kuehl.

Procedencia: Barranquilla.

Sospecha: Carbón Sintomático. Existe el antecedente de una vacunación contra la Septicemia Hemorrágica, pocos días antes de la muerte.

En aerobiosis:

Tanto del hígado como de la médula se obtienen algunos agentes banales.

En anaerobiosis:

BOUILLON DE TAROZZI

A las 24 horas enturbamiento uniforme y abundante producción de gas, en los cultivos de hígado y médula. Los frotos muestran un bacilo Gram-positivo, delgado, en cadenas de 2 a 3 elementos y contaminado por diversos agentes banales. Algunas formas presentan esporo subterminal oval. Se observa ligera movilidad.

SUPERFICIE AGAR-SANGRE (Fortner).

A las 24 horas colonias en césped casi imperceptible, diseminado por la superficie del agar, fuera de la estría del asa y tendiendo a invadir el campo sembrado de *Prodigiosus*. Existe un tipo de hemólisis difusa, muy típica para el *Cl. sépticum*. Los frotos muestran bacilo aislado, Gram-positivo, delgado, con esporos ovales que apenas hinchaban el cuerpo del bacilo.

PODER PATOGENO

El curí número 16, recibe 0,2 c.c. intramuscularmente del cultivo en Tarozzi de 24 horas y muere a las 18 horas, con lesiones de edema hemorrágico de la pierna, abdomen y pecho, sin gases ni olor especial. El intestino delgado está fuertemente congestionado. En los frotos de la superficie del hígado se ven largos filamentos Gram-positivos, típicos de *Cl. Sépticum*. Del hígado y de la sangre del corazón se recobra el mismo agente. Los curíes números 30 y 3, reciben, respectivamente, 0,5 c.c. intramuscular y 1 c.c. (mitad id.m. y mitad i.p.) muriendo ambos entre 12 y 18 horas, presentando las mismas lesiones del anterior.

LECHE.—No se observa fermentación en 15 días.

AZUCARES.—Lactosa: positivo. Sacarosa: negativo. Salicina: positiva.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO: *Clostridium sépticum*.

COMENTARIOS

La siembra en Fortner nos decidió el diagnóstico bacteriológico desde el primer momento. Puede tratarse en este caso, de una contaminación post-mortem con *Cl. sépticum* ya que venían en la médula diversos gérmenes banales. Pero, como las sospechas del remitente han debido basarse en la observación de la sintomatología o en alteraciones musculares que hicieran recordar el "Carbón Sintomático", puede pensarse también en un caso esporádico de "Carbón Sintomático" producido por el *Cl. sépticum*, que haya ocurrido en el curso de una vacunación, mientras las defensas orgánicas estaban distraídas. No está por demás sugerir, que pueda ser éste un verdadero caso de "Edema Maligno", producido por la introducción del *Cl. sépticum* con una aguja infectada, dado el antecedente de la vacunación.

OBSERVACION N° 8

Especie: bovina.

Edad: 1 y medio años.

Material: Hueso (Gran metacarpiano o metatarsiano).

Procedencia: Guasca (Cundinamarca) hacienda "Puertobello".

Remitente: Sr. Severo Robayo.

Sospecha: Carbón Sintomático.

CARACTERES CULTURALES MORFOLOGIA

En aerobiosis:

Negative total.

En anaerobiosis:

BOUILLON DE TAROZZI

A las 24 horas de cultivo se observa escasa producción de gas, enturbamiento uniforme, con posterior depósito a los tres días. En los frotos se ve un bacilo largo, delgado, aislado o en cadenas de a dos elementos, provisto de un esporo oval, subterminal. En las preparaciones no fijadas se constata ligera movilidad.

SUPERFICIE DE AGAR-SANGRE (Fortner).

En 24 horas de cultivo se ha desarrollado un film difuso en forma de césped invasor que envía sus ramificaciones en todas direcciones. El tipo de hemólisis es difuso e intenso.

PODER PATOGENO

El curí número 4, recibe en inyección intramuscular 1 c.c. de cultivo en Tarozzi de 24 horas, y muere en 18 horas. En la autopsia se observa violento edema hemorrágico de la pierna, abdomen y pecho; los músculos se encuentran de un color rojo oscuro, casi negro. El intestino delgado, especialmente el ileon, sumamente congestionado. En los frotos de superficie de hígado, largas cadenas típicas de *Cl. sépticum*. Los curies números 85 y 31 reciben, respectivamente, 0,5 cc. intramuscular y 1 c.c. (mitad i.m. y mitad i.p.) de cultivo en Tarozzi de 24 horas, muriendo ambos entre las 12 y 24 horas; las lesiones constatadas son las mismas que en el curí anterior, siendo de anotar una ruptura de la mucosa gástrica en el curí número 31. Del hígado y de la sangre cardíaca se recobra de nuevo el mismo agente.

LECHE.—Negativo en 15 días de observación.

AZUCARES.—Lactosa: positivo. Sacarosa: positivo. Salicina: positivo.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO: *Clostridium sépticum*.

COMENTARIOS

El *Clostridium sépticum* se manifestó nítidamente desde la siembra en Fortner. La fermentación de la Sacarosa no puede desvirtuar el diagnóstico, habiendo pruebas tan concluyentes como la forma de crecimiento en agar-sangre y la inoculación al curí. Dadas las sospechas del remitente, y el hecho de encontrarse el *Cl. sépticum* en estado de pureza, no podemos menos de considerar el presente como un caso de "Carbón Sintomático" por *Cl. sépticum*.

OBSERVACION N° 9

Especie: Bovina.

Edad: 1 año.

Material: Músculo.

Procedencia: Bogotá.

Remitente: Dr. Guillermo Maldonado, Médico Veterinario. (Propietario, señor Justino Matallana).

Sospecha: Carbón Sintomático.

CARACTERES CULTURALES MORFOLOGIA

En anaerobiosis:

BOUILLON DE TAROZZI

Poca producción de gas en 24 horas y ligero enturbiamiento uniforme. En los frotos se ven bacilos cortos, gruesos, Gram-positivos con esporos ovales, centrales que deforman el cuerpo del bacilo, dándole una apariencia de barril. Las preparaciones no fijadas muestran una reducida movilidad.

SUPERFICIE AGAR-SANGRE (Fortner).

A las 24 horas se ven ya colonias pequeñas, transparentes, abotonadas que miradas al trasluz dan la apariencia de aros, redondas o en forma navicular, con rodete periférico y zona de hemólisis circunscrita de poca extensión e intensidad.

PODER PATOGENO

El curí número 1, recibe 1 c.c. de cultivo en Tarozzi de 24 horas por vía intramuscular, y muere en 24 horas. Se encuentra extenso edema sero-hemorrágico de pierna y abdomen. Los órganos internos permanecen normales. Los frotos de la superficie de hígado muestran un bacilo corto y delgado, Gram-positivo, sin esporos. El agente se recupera del hígado y de la sangre del corazón, reproduciendo en la superficie de agar-sangre los mismos caracteres culturales de los cultivos primitivos. Los curies números 84 y 39, con inoculaciones respectivas de 0,5 c.c. intramuscularmente y de 1 c.c. (la mitad por vía intramuscular y la mitad por vía intraperitoneal) reaccionan de idéntica manera al anterior, recobrándose de su sangre cardíaca y del hígado el mismo bacilo.

LECHE.—No hay fermentación en 15 días de observación.

AZUCARES.—Lactosa: negativo. Sacarosa: negativo. Salicina: negativo.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO: *Clostridium chauvoei*.

COMENTARIO

Las formas típicas de las colonias en Fortner, deciden definitivamente el diagnóstico. Esta cepa resultó de muy débiles propiedades fermentativas, y no observamos en los azúcares empleados, fermentación

alguna en el transcurso de seis días. La sospecha establecida por el Dr. Maldonado, en vista de las alteraciones musculares del ternero, son confirmadas por el laboratorio, hallándonos en presencia de un caso clásico de "Carbón Sintomático" por *Cl. chauvoëi* en bovino joven.

OBSERVACION Nº 10.

Especie: Bovina.

Edad: 1 y medio años.

Material: Músculo.

Procedencia: Hacienda "Santa Rosa".

Remitente: Dr. Manuel Gómez Rueda, Médico Veterinario, y señor Rafael Calderón.

Sospecha: Carbón Bacteridiano, Carbón Sintomático, Septicemia hemorrágica. **Muerte** en 2 días; músculos del cuello enfisematosos y negros.

CARACTERES CULTURALES MORFOLOGIA

En aerobiosis:

(Caldo común, agar-sangre), negativo total.

En anaerobiosis:

BOUILLON DE TAROZZI

A las 24 horas gran producción de gas, olor butírico, enturbamiento uniforme. Los frotos muestran un bacilo grueso, corto, recto, sin esporos aparentemente. En preparaciones no fijadas, no se observa movilidad.

SUPERFICIE DE AGAR-SANGRE (Fortner).

Colonias redondas en 24 horas, brillantes, compactas, grises, de bordes rodeadas de una zona hemolítica intensa y de una extensión igual al triple del diámetro de la colonia. Los frotos muestran el mismo tipo de bacilo observado en el medio de Tarozzi.

PODER PATOGENO

El curi número 51 recibe 1 c.c. de cultivo en Tarozzi de 24 horas por vía intramuscular. Muere en 24 horas y presenta edema rosado de la pierna con abundante producción de gas. El edema se extiende hasta el abdomen y pecho. Los pulmones se encuentran algo enfisematosos. En los frotos de la superficie del hígado se ven bacilos cortos, intensamente Gram-positivos, del mismo tipo de los observados en los cultivos y rodeados de una areola que con el Gram aparece azul muy clara. Del hígado y de los músculos de la pierna inculada se recobra el mismo agente. De la sangre del corazón no obtuvimos cultivo alguno. En los curies números 15 y 17 con inoculaciones respectivas de 1 c.c. intramuscularmente, y de 1 c.c. la mitad intramuscular y el resto intraperitonealmente, se produce exactamente el mismo cuadro anatómico-patológico del curi número 51. De la sangre de éstos, si recobramos el agente en estado de pureza. El conejo número 38, recibe endovenosamente 1 c.c. de cultivo en Tarozzi de dos días y es sacrificado cinco minutos después de la inyección. Se lleva a la estufa y después de ocho horas se retira. El cadáver está totalmente distendido por los gases, los cuales impregnan todos los tejidos y órganos, produciendo un desagradable olor sulfuroso. En frotos de la superficie del hígado se ven numerosísimos bastones cortos, rectos, gruesos, aislados, intensamente Gram-positivos. De la sangre del corazón se recobra el mismo bacilo en estado de pureza.

LECHE. — Violenta coagulación en 24 horas con fragmentación del coágulo, el cual toma aspecto de esponja. El coágulo no se disuelve en 15 días de observación.

AZUCARES.—Lactosa: positivo. Sacarosa: positivo. Salicina: negativo.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO: *Clostridium perfringens*.

COMENTARIOS

La siembra en Fortner, la reacción de la leche, las inoculaciones, aseguran el diagnóstico del *Cl. welchii*. De no existir el antecedente de una herida, como así nos lo manifestaron los remitentes, es éste un caso interesante de "Carbón Sintomático" en bovino joven, producido por el *Clostridium perfringens*.

OBSERVACION Nº 11

Especie: Bovina.

Edad: Ternero (sin especificación).

Material: Sangre.

Procedencia: Corregimiento La Paz (Cundinamarca), hacienda 'La Cajita'.

Remitente: Dr. Francisco Borrás, Médico Veterinario.

Sospecha: Carbón Sintomático.

CARACTERES CULTURALES MORFOLOGIA

En aerobiosis:

Se obtienen algunos agentes banales.

En anaerobiosis:

BOUILLON DE TAROZZI

En 24 horas de cultivo, se observa abundante producción de gas, enturbiamiento uniforme y olor butírico. Los frotos muestran un bacilo delgado, Gram-positivo, con esporos centrales o subcentrales, aislado. En preparaciones no fijadas se observa movilidad reducida.

SUPERFICIE DE AGAR-SANGRE (Fortner).

A las 48 horas de incubación colonias pequeñas, transparentes, redondas o de formas ligeramente irregulares, sin rodete periférico y con delicadas prolongaciones muy cortas. La hemólisis es estrecha, circunscrita y poco intensa. Estas colonias no son bien típicas del *Clostridium chauvoei*, pero sin embargo, características. Los frotos muestran un bacilo fino, delgado, de extremidades ligeramente afiladas, con espora oval subcentral o sub-terminal, Gram-positivo en su mayoría, pero algunas formas decoloradas.

PODER PATOGENO

La inoculación de un centímetro al curí número 72 por vía intramuscular le produce la muerte en 24 horas. Se encuentra edema hemorrágico violento de la pierna y abdomen, sin gases ni olor especial. Los frotos de la superficie del hígado muestran un bacilo recto, delgado, aislado, de extremos redondeados y aun sin esporular. La siembra de hígado y sangre del corazón reproduce los mismos caracteres culturales de la superficie de agar-sangre observados en los primitivos cultivos. El curí número 37 con 1 c.c. intramuscularmente presenta las mismas lesiones. La cepa pierde gradualmente su virulencia y el curí número 60 sobrevive después de la inoculación de 2 c.c. por vía intramuscular de cultivo en Tarozzi de 24 horas.

LECHE.—Formación en 48 horas de un coágulo compacto en el fondo del tubo. En 15 días el coágulo no ha sido digerido.

AZUCARES.—Lactosa: positivo. Sacarosa: positivo. Salicina: negativo.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO: *Clostridium chauvoei*.

COMENTARIOS

Las colonias observadas en la superficie de agar-sangre dieron la base a pesar de no ser típicas, para el diagnóstico del *Cl. chauvoei*. Las posteriores pruebas confirman las sospechas establecidas por el doctor Borrás, siendo éste un nuevo caso de "Carbón Sintomático" por *Cl. chauvoei* en bovino joven, cuyo agente etiológico ha sido aislado de la sangre. No tenemos datos de si ésta fue tomada en vida o después de la muerte.

OBSERVACION Nº 12

Especie: Bovina.

Edad: Ternero (sin especificación).

Material: Músculo.

Procedencia: Cali (Valle), hacienda "La Fortaleza".

Remitente: doctor Guillermo Maldonado. Propietario, Dr. Hernando Calcedo.

Sospecha: Carbón Sintomático..

CARACTERES CULTURALES MORFOLOGIA

En anaerobiosis:

BOUILLON DE TAROZZI

Enturbiamiento uniforme en 24 horas, abundante producción de gas y olor butírico. Se observa movilidad considerable. En los frotos, bastoncillo delgado, Gram-positivo en vía de esporulación.

SUPERFICIE DE AGAR-SANGRE (Fortner).

A las 24 horas de incubación, se observa un film extendido por toda la superficie del agar que tiende a invadir las partes no tocadas

por el asa. A las 48 horas ya la hemólisis se ha hecho bien notoria y es de un tipo difuso muy característico para el *Cl. sépticum*.

PODER PATOGENO

La inoculación de 0,50 c.c. de un cultivo en Tarozzi de 24 horas al curí número 45, le produce la muerte en 24 horas. A la autopsia se constata edema hemorrágico violento de la pierna, abdomen y pecho con coloración rojo bermeja de los músculos. El Ileon se encuentra muy congestionado. Peritonitis aguda visceral y parietal. Los frotos de la superficie del hígado muestran largos filamentos curvos, Gram-positivos. De la sangre del corazón, y del hígado se recobra el mismo agente. Los curíes número 27 y número 70 con inoculaciones respectivas de 0,3 y de 1 c.c., intramuscular la primera y la segunda (intramuscular la mitad e intraperitoneal el resto). De la sangre del corazón se retira el mismo agente inoculado.

LECHE. — No hay fermentación en 15 días.

AZUCARES. — Lactosa: no hay observación. Sacarosa: negativo. Salicina: positivo.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO: *Clostridium sépticum*.

COMENTARIOS

El hecho de encontrarse el *Cl. sépticum* en estado de pureza en un músculo el cual llegó al laboratorio en condiciones de rigurosa asepsia; establecida la sospecha del "Carbón Sintomático" por un profesional Veterinario, no podemos menos de considerar el presente, como un caso de "Carbón Sintomático" producido por el *Cl. sépticum* en bovino joven.

OBSERVACION Nº 13**Especie:** Bovina.**Edad:** 1 y medio años.**Material:** Músculo.**Procedencia:** Armero (Hacienda "El Puente").**Remitente:** Muestra tomada personalmente.

Sospecha: Se constata crepitación de la región glútea y los músculos de esta zona aparecen de un color oscuro, desprendiendo marcado olor butírico. Hacemos el diagnóstico de Carbón Sintomático, basados en las alteraciones musculares y en la edad del ternero.

**CARACTERES CULTURALES
MORFOLOGIA**
En anaerobiosis:**BOUILLON DE TAROZZI**

A las 24 horas de cultivo marcada producción de gas, enturbiamiento bastante pronunciado, olor butírico. Los frotos muestran un bacilo delgado con esporo oval, terminal o sub-terminal. Además contaminación con agentes banales. Se observa movilidad considerable.

**SUPERFICIE DE AGAR-SANGRE
(Fortner).**

A las 24 horas de incubación, se notan colonias pequeñas, redondas, grises, con prolongaciones periféricas cortas y delicadas. **No se produce hemólisis.** En los frotos, encontramos un bacilo tipo **Clostridium**, Gram-positivo, delgado con esporo oval terminal.

PODER PATOGENO

El curí número 54 recibe en inyección intramuscular, 0,5 c.c. de cultivo en Tarozzi de 24 horas, y no reacciona sino con leve claudi-

ción natural. El curí número 32 recibe 1 c.c., la mitad intramuscular y el resto intraperitonealmente y la inoculación se queda igualmente sin efecto. El curí número 77 recibe 2 c.c. en inyección intramuscular y 1 c.c. en inyección intraperitoneal, y tampoco reacciona.

LECHE.—No hay observaciones.

AZUCARES.—No hay observaciones.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO: Negativo.

COMENTARIOS

Hemos relatado este caso negativo, por habernos tocado personalmente tomar la muestra para análisis. Las reacciones en azúcares y leche no las practicamos, pues una vez comprobado el poder apatógeno del bacilo encontrado, rechazamos la cepa para nuestros estudios. Hecho el diagnóstico de "Carbón Sintomático", basados en las lesiones musculares, pensamos fuera fácil comprobar en el laboratorio la presencia de algún anaerobio patógeno. Desde el momento en que las colonias en la superficie de agar-sangre no resultaron hemolíticas, dudamos ya de las propiedades patógenas del bacilo encontrado. Puede haber sucedido que, el agente causal haya desaparecido en el calentamiento (15 minutos a 80° centígrados) que del cultivo primitivo en Tarozzi hicimos, por haberlo encontrado contaminado con agentes de la putrefacción, habiendo sobrevivido el anaerobio concomitante. No podríamos clasificar esta cepa como atípica del **Cl. chauvoei**, sin propiedades patógenas ni hemolíticas, porque no se explicaría la muerte del ternero. Pese, pues, a nuestro primer diagnóstico de "Carbón Sintomático"

que hicimos sobre el cadáver, hemos tenido que dar como negativo para gérmenes específicos, el resultado del análisis bacteriológico.

OBSERVACION Nº 14

Especie: Bovina.

Edad: Vaca (sin especificación).

Material: Hueso (Gran metacarpiano o metatarsiano).

Procedencia: Cali (Hacienda "El Limonar").

Remitente: doctor Guillermo Maldonado, Médico Veterinario.

Sospecha: Carbón Bacteridiano.

CARACTERES CULTURALES MORFOLOGIA

En aerobiosis:

Algunos agentes banales.

En anaerobiosis:

BOUILLON DE TAROZZI

A las 24 horas de incubación se nota mediana producción de gases y enturbiamiento uniforme del medio. En las coloraciones hechas se observa un bacilo Gram-positivo de tipo *Clostridium*, recto, aislado de extremo redondeado con esporo oval sub-terminal. En las preparaciones no fijadas se constata movilidad muy lenta.

SUPERFICIE AGAR-SANGRE (Fortner).

A las 48 horas se observan colonias redondas o irregulares, rodeadas de una zona de hemólisis estrecha y un poco intensa. El borde periférico es muy neto y al trasluz, se ven formas típicas de aro.

PODER PATOGENO

El curí número 92 recibe en inyección intramuscular 1 c.c. de cultivo en Tarozzi de 24 horas. Muere en 36 horas y a la autopsia se encuentra edema hemorrágico de pierna, abdomen y pecho, regado, sin gases ni olor especial. El intestino delgado permanece normal y un lóbulo del hígado presenta lesiones necróticas. Los frotos de la superficie del hígado muestran bacilos aislados, Gram-positivos, y algunos con esporos ovales, subterminales, otros sin esporular. Del hígado y de la sangre del corazón se recobra el mismo germen inoculado. Los curies números 35 y 36, reciben 1 c.c. intramuscularmente y 1 c.c. (la mitad i.m. y la mitad i.p.), respectivamente, muriendo en el lapso de 24 a 36 horas y presentando análogas lesiones a las descritas.

LECHE.—En 15 días se produce un coágulo muy blando.

AZUCARES.—Lactosa: positivo. Sacarosa: positivo. Salicina: negativo.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO: *Clostridium chauvoei*.

COMENTARIOS

Las colonias desarrolladas en la superficie de agar-sangre, nos sirvieron desde el primer momento para rectificar la sospecha establecida por el doctor Maldonado. Es el presente un caso de "Carbón Sintomático" en bovino adulto, producido por el *Cl. chauvoei*.

OBSERVACION Nº 15

Especie: Bovina.

Edad: 3 y medio meses.

Material: Hueso (Gran metacarpiano o metatarsiano).

Procedencia: Mosquera (Cundinamarca), hacienda "La Fragua".

Remitente: doctor Antonio J. Iregui.

Sospecha: Carbón Sintomático.

CARACTERES CULTURALES MORFOLOGIA

En aerobiosis:

Negativo total.

En anaerobiosis:

BOUILLON DE TAROZZI

En 24 horas de incubación se produce mediana cantidad de gas, enturbiamiento uniforme, olor butírico. Los frottes muestran un bacilo Gram positivo en vía de esporulación, y en estado de pureza. Se comprueba movilidad lenta.

SUPERFICIE DE AGAR-SANGRE (Fortner).

A las 48 horas de cultivo, formas clásicas de *Cl. chauvoei*, consistentes en delicadas colonias transparentes, redondas e en forma de naveta, con abolladura central y reborde periférico, rodeadas de estrecha zona de hemólisis difusa.

PODER PATOGENO

El curí número 5 recibe en inyección intramuscular $\frac{1}{2}$ c.c. de cultivo en Tarozzi de 24 horas y muere en 48 horas. A la autopsia se comprueba un marcado edema de carácter hemorrágico de la pierna y región posterior del abdomen. Los frottes de la superficie del hígado muestran un bacilo Gram positivo, aislado, con esporos ovales, sub-terminales, algunos sin esporular. La siembra del hígado y de la sangre del corazón, permiten recobrar el agente inoculado. Los curíes números 88 y 47, reciben, respectivamente, 1 c.c. en inyección

intramuscular y 1 c.c. (la mitad intramuscular y el resto intraperitonealmente) muriendo ambos en el transcurso de 24 a 36 horas, recobrándose del hígado y de la sangre del corazón el mismo agente, el cual reproduce en la superficie del agar-sangre los caracteres clásicos del *Cl. chauvoei*.

LECHE.—No se observa fermentación en cinco días.

AZUCARES.—Lactosa: no hay observación; Sacarosa: negativo. Salicina: negativo.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO: *Clostridium chauvoei*.

COMENTARIOS

Los caracteres culturales y la inoculación a curies aseguran el diagnóstico de *Cl. Chauvoei*. Es éste un caso de "Carbón Sintomático" de un ternero de tres meses y medio.

OBSERVACION N° 16

Esta observación se hace sobre una cepa vieja y clasificada de *Cl. tetani*, más que todo para establecer caracteres culturales diferenciales en la superficie de agar-sangre.

.. BOUILLON DE TAROZZI

En 24 horas de cultivo, se nota apenas un ligero enturbiamiento medio. Los frottes muestran un bacilo delgado, Gram-positivo, recto, aún sin esporular. La movilidad es considerable. A los cinco días de cultivo hay un poco más de gas, y olor desagradable. Los frottes muestran el mismo tipo de bacilo descrito, pero ya se observan algunos esporos terminales redondos y formas que no han tomado el Gram.

SUPERFICIE DE AGAR-SANGRE

(Fortner).

Únicamente después de 4 días de incubación, se observa la formación de un prado fino que se sale del área de la estría y que en los días siguientes invade la superficie del agar, enviando ramificaciones en todos sentidos. Se observa hemólisis difusa. El prado o césped, adquiere en 6 o 7 días de incubación, un aspecto un poco denso, muy parecido al dado por el *Cl. séptico* y un poco atípico para *Cl. tetani*, el cual tiene por característica la formación de un prado muy tenue, casi imperceptible. Esta atipicidad puede atribuirse a la vejez de la cepa estudiada. Los frotos muestran el clásico *Cl. tetani* con sus esporos redondos terminales. La gran mayoría de los bacilos no han tomado el Gram.

PODER PATOGENO

La inoculación intraperitoneal de 0,20 c.c. de cultivo en Tarozzi de 10 días a un ratón, le produce la muerte a las 12 horas por intoxicación aguda. La inoculación en la base de la cola de un ratón, de 0,50 c.c. de la emulsión de media asa de cultivo en agar-sangre en 3 c.c. de solución fisiológica, produce en 48 horas la rigidez espasmódica de los miembros posteriores, los cuales son dirigidos hacia atrás y arrastrados en la marcha en posición característica. El animal muere en 56 horas.

LECHE.—Negativo en 15 días de observación.

AZUCARES.—Lactosa: negativo. Sacarosa: negativo. Salicina: negativo.

COMENTARIOS

Los caracteres culturales del *Cl. tetani* pueden confundirse con los del *Cl. séptico*, sobre todo cuando se trata de cepas viejas, pero los caracteres morfológicos de ambos son inconfundibles.

PRUEBAS DE PROTECCION EN ANIMALES

Empleamos Suero antigangrenoso "Behring" en cuya composición entran por cada 10 c.c. mil U.iles. Anti-Perfringens, 500 U.iles. Anti-Vibrión Séptico, 400 U. iles. Anti-edematosas y 85 U. iles. Anit-histolíticas. Para la protección contra el *Cl. tetani*, empleamos Suero anti-tetánico "Behring".

Hemos escogido las cepas de 6 observaciones, en las cuales se obtuvieron formas típicas de crecimiento en la superficie de agar-sangre. Dos de *Cl. chauvoei*, las números 9 y 14; dos de *Cl. séptico*, la número 8 y número 12; una de *Cl. oedematiens*, la número 1; y una de *Cl. perfringens*, la número 5.

Un grupo de seis curies, recibe cada uno 5 c.c. de Suero antigangrenoso por vía intraperitoneal; 24 horas más tarde, recibe cada curi otros 5 c.c., la mitad por vía intraperitoneal, la mitad en los músculos de la pierna, donde inmediatamente después se inyectará el cultivo del anaerobio.

Otro grupo de 6 curies testigos, recibe simultáneamente con la segunda inoculación de los del primer grupo, el cultivo del anaerobio en Tarozzi de 24 horas. Tanto los unos como los otros, reciben cada uno 1 c.c. de cultivo, la mitad intramuscularmente (en la misma pierna en donde inmediatamente antes se ha aplicado el suero en los curies del primer grupo) y la mitad intraperitonealmente.

C U R I E S

Nº 1	—	Recibe 10 c.c. de Suero y 1 c.c. de cultivo cepa.	Observación	Nº	1
" 2	—	" " " "	" "	"	5
" 3	—	" " " "	" "	"	9
" 4	—	" " " "	" "	"	14
" 5	—	" " " "	" "	"	8
" 6	—	" " " "	" "	"	12

C U R I E S T E S T I G O S

Nº 1	— a.	Recibe 1 c.c. de cultivo cepa.	Observación	Nº	1
" 2	— a.	" " " "	" "	"	"	9
" 3	— a.	" " " "	" "	"	"	14
" 4	— a.	" " " "	" "	"	"	8
" 5	— a.	" " " "	" "	"	"	12
" 6	— a.	" " " "	" "	"	"	

En el transcurso de 24 a 36 horas mueren todos los testigos, a excepción del curí número 1-a, que muere únicamente a los 6 días de la inoculación; en todos se encuentran las lesiones descritas en las respectivas observaciones, inclusive en el curí número 1-a. De la sangre del corazón se recobran los mismos agentes inculcados.

En 24 horas también, mueren los curíes números 3 y 4, correspondientes a las observaciones números 9 y 14, en las cuales se obtuvieron formas clásicas del *Cl. chauvoei* en la superficie del agar sangre.

Los curíes números 1, 2, 5 y 6, han resistido la inoculación del anaerobio, protegidos por el suero. Al duodécimo día de haber sido inoculados, mueren el 2 y el 5. En la autopsia no se observan lesiones algunas de edema gaseoso, y las siembras del hígado y de sangre del corazón dan resultado total-

mente negativo. Estos animales han muerto de una intoxicación de dudoso origen, probablemente accidental.

En conclusión, el suero ha protegido a los curíes inoculados con cepas de *Cl. sépticum*, *Cl. perfringens* y *Cl. oedematiens*, dejando sin protección a los curíes inoculados con cepas del *Cl. chauvoei*.

Creemos que esta experiencia es por demás concluyente para apreciar el valor del método de Fortner para cultivos de anaerobios en superficie de agar-sangre.

En cuanto a los ensayos de protección con suero anti-tetánico, el curí número 7 recibe intraperitonealmente 5.000 U.iles. de Suero anti-tetánico "Behring", y 24 horas más tarde otras 5.000 U. Iles por la misma vía, simultáneamente con la aplicación de ½c.c. intraperitoneal de un cultivo en Tarozzi de 11 días. El curí número 7-a re-

cibe simultáneamente, sólo $\frac{1}{2}$ c.c. del mismo cultivo en Tarozzi, y muere en el transcurso de 28 horas, en medio de convulsiones espas-

módicas. En la autopsia no se comprueban lesiones orgánicas de ninguna naturaleza. El curí número 7 ha resistido la inculcación.

CUADRO SINOPTICO

Observaciones	Diagnóstico	Hst.	Formas de crecimiento en Fortner	Lecio	Lactosa	Sacarosa	Salicina	Poder patógeno; rasgo más característico y constante.
1	Cl. oedematiens	Hueso	Características.	—	—	—	—	Edema blanco gelatinoso, no hemorrágico.
2	Cl. Chauvoei.	Hueso	Típicas	—	?	?	—	Ningún rasgo característico.
3	Cl. sépticum	Hueso	Típicas al principio, después característica.	—	+	—	+	Largas cadenas en la superficie del hígado Int. delgado muy congestionado.
4	Cl. chauvoei	Hueso	Típicas	—	+	—	—	Ligera congestión del intestino delgado.
5	Cl. perfringens	Hueso	Características	Típica	+	+	—	Distensión gaseosa y músculos color salmón.
6	Cl. chauvoei	Hueso	Típicas	—	+	—	—	Nađa de característico.
7	Cl. sépticum	Hueso	Típicas	—	+	—	+	Largos filamentos en la sup. del hígado. Int. delgado muy congestionado.
8	Cl. sépticum	Hueso	Típicas	—	+	+	+	Largas cadenas en la superficie del hígado. Intestino delgado altamente congestndo.
9	Cl. chauvoei	Músculo	Típicas	—	—	—	—	No se observa rasgo característico.
10	Cl. perfringens	Músculo	Características	Típica	+	+	—	Ecdema rosado. Pulmones enfisematosos. Distensión gaseosa en conejo.
11	Cl. chauvoei	Sangre	Características	+	+	+	—	Nada de característico.
12	Cl. sépticum	Músculo	Típicas	—	—	—	+	Largos filamentos en la superficie del hígado. Congestión Ileon.
13	Negativo	Músculo						
14	Cl. chauvoei	Hueso	Típicas	—	+	+	—	Nada de característico.
15	Cl. chauvoei	Hueso	Típicas	—	—	+	—	Nada de característico.
16	Cl. tetani	?	Características	—	—	—	—	Tétanos experimental en ratón.

CONCLUSIONES

1º—Existe en el país una variada flora microbiana del género "Clostridium", que interviene en la producción de diversos procesos gangrenoso-edema-enfisematosos, en vinos de todas las edades, y hemos constatado a este respecto, la presencia del *Cl. chauvoei*, *Cl. séptico*, *Cl. prefringens* y *Cl. oedematiens*.

2º—El método de Fortner para cultivos de anaerobios en cajas de agar-sangre, es de gran utilidad en la identificación y aislamiento de dichos agentes, siendo de recomendar para todos los laboratorios de diagnóstico veterinario.

3º—La médula ósea es el material más apropiado para la búsqueda de anaerobios del género "Clostridium", principalmente cuando

no se trata de afecciones que hayan revestido un carácter de especial toxicidad, pues su contaminación post-mortem, demora más que la de otros órganos.

4º—La congestión de intestino delgado de curies inoculados con *Cl. séptico*, es un rasgo muy constante.

5º—Es también muy constante la acción cruzada del *Cl. séptico* y del *Cl. chauvoei* sobre la Salicina.

6º—La observación de frotos de la superficie de hígado, es muy valiosa para la identificación del *Cl. séptico* y su diferenciación con el *Cl. chauvoei*, pero presta poco servicio para la diferenciación de éste, con otros agentes del género "Clostridium" que no forman largos filamentos.

BIBLIOGRAFIA

- 1—**Agasse-Lafont.** — "Les Applications pratiques du Laboratoire a la Clinique". 1936.
- 2—**Arloin M. M., Cornevin et Thomas.** "Le Charbon Symptomatique du Boeuf". 1887.
- 3—**Barzizza Carlos y Manso Soto Alberto.** — "Microbiología". 1941. Tomos I-II.
- 4—**Berger David H.-Braed Robert.-E. G. D. Murray.-A. Parker Hitchkens.** "Determinative Bacteriology". 1939.
- 5—**Bray W. E.** Colaboración de Velásquez Canseco.—"Sinopsis de los métodos bioquímicos de laboratorio". 1941.
- 6—**Bryan Arthur and Charles.**—"Principles and practice of Bacteriology". 1940.
- 7—**Buchnan Robert.** — "Veterinary Bacteriology". 1922.
- 8—**Courmont et Pannisset.** — "Precis des Microbiologie des maladies infectieuses des animaux". 1914.
- 9—**Curasson G.**—"Traité de Pathologie Exotique Veterinaire et comparée". 1936. Tomo II.
- 10—**Da Silva Junior, Olegario.**—"Infecciones por anaerobios com os animais". Boletín Veterinario do Exército N° 12-1937, N° 1-5-6-7. 1938.
- 11—**Demnitz Albert.**—"Con respecto a la cuestión de la identidad entre el Bacterium Gigas (Zeissler), y el agente de una hemoglobinuria que se presenta en el territorio de los Andes de América Norte y Sur". 1934.
- 12—**Froner, Zwick.**—"Patología y Terapéutica Veterinarias". Tomo II. 1926.
- 13—**Gaiger S. H. and Davies Gwilym.**—"Veterinary Pathology and Bacteriology". 1938.
- 14—**Haring Clarence.**—"Diagnosis diferencial de Botulismo y Encefalomyelitis infecciosa del tipo Oeste en los caballos".

- 15—**Hauduray G. Ehringer.-I. Urbain.-G. Guillot.-J. Magrou.**—“Dictionnaire des Bacteries Pathogenes”. 1937.
- 16—**Henning M. W.**—“Animal Diseases in South Africa”. Vol. I. 1932.
- 17—**Hutyra Franz.-Marek Joseph.-Manniger Rudolph.**—“Special Pathology and Therapeutics of the diseases of Domestic Animals”. Vol. I-II. 1938.
- 18—**Jordan Edwin Ph. D.**—“A Text book of General Bacteriology”. 1938.
- 19—**Kolmer John and Boerner Fred.**—“Método de Laboratorio Clínico”. 1943.
- 20—**Lober H. J. A.**—“Gangrene Gaseosa en la Apendicitis”. Reseña seg. Munch. med. Woch. Nº 50. 1938.
- 21—**Mason J. H.-Robinson L. M.**—“The Isolation of *Cl. welchii* Type B. from Foals affected with dysentery”. The Veterinary Record”. Nº 45. Vol. 52. Nov. 1940.
- 22—**Moussu G. et Moussu R.**—“Traité des Maladies du Gros Bétail”. 1928.
- 23—**Schultze Erich.** — “Vergleichende Untersuchungen über die Leistungsfähigkeit der Makro, und Mikroplattenkultur nach Fortner bei der Diagnose des Rauschbrand, und Pararauschbrandbazillus”. 1936.
- 24—**Weinberg M. et. B. Ginsbourg.**—“Données récentes sur les Microbes Anaérobés et leur rôle en Pathologie”. 1927.
- 25—**W. M. H.**—“The Bacteriology of Infected Wounds”. The Veterinary Record, August. 1940.
- 26—**Vergara Letelier Heliodoro.**—“Estudios sobre cultivos de anaerobios en medios con fierro porfirizado”. 1935.
- 27—**Zinsser and Bayne.-Jones.**—“Textbook of Bacteriology”. Eighth. Edition. 1939.