

* Pasteurella Hemolytica

Por el Dr. Alvaro Gutiérrez M.
D. M. V.

El objeto del presente trabajo es dar a conocer los resultados de una serie de investigaciones efectuadas en el Instituto Terapéutico Byala Cía. Ltda., de los materiales remitidos de aquellas fincas donde se presentaba una entidad patológica, con caracteres enzoóticos muy similares a la septicemia hemorrágica, en los cuales la vacunación y los tratamientos a base de sueros específicos contra la *Pasteurella multocida* no dieron ningún resultado. En los materiales se encontró un germen hemolítico, gram-negativo en cultivo puro. Este microorganismo se resolvió investigar en vista de la frecuencia de los casos observados.

Historia:

Jones en el año de 1921 fue el primero en estudiar el microorganismo típico de esta especie, fundado en brotes de la enfermedad ocurridos en grandes hatos de bovinos. La enfermedad se presentó en forma aguda tanto en el ganado adulto como en los terneros. Caracterizándose la enfermedad por una neumonía. Distinguiéndose el microorganismo hallado por la fermentación de lactosa, y no producir indol, y además porque hemolizaba los glóbulos rojos del caballo. Newsom y Cross aislaron el microorganismo de un bovino y de una oveja y sugirieron el nombre de *Pasteurella hemolytica* (1932).

Muchos otros describen microorganismos que aparentemente pertenecen a esta especie; entre los que se encuentran Magnuson (1917), de un ternero enfermo; Spray (1923), de un grupo de *Pasteurella oviséptica*; Jorgensen (1925), en microorganismos de la flora bacteriana de un bovino normal; Tanake (1926), en cultivo obtenido en búfalo; Edington (1930), en cultivo hecho de nueve bovi-

nos; Ochi (1931-1932), cultivos avirulentos de seis bovinos; Hellesnes (1935), de cultivo virulento de un bovino enfermo; Rosenbusch y Merchant (1938), confirman los resultados de Newsom y Cross con nuevos cultivos.

Lesiones:

La enfermedad natural producida por este microorganismo en bovinos y ovinos está caracterizada por una neumonía difusa de naturaleza crónica. Y la infección también se caracteriza por una pleuritis fibrinosa con algunas adherencias y en algunos casos abscesos pulmonares.

BACTERIOLOGIA

Clasificación:

Clase Schizomycetes. — Orden Eubacteriales. — Sub-orden Eubacteriineae. — Familia Parvobacteriaceae. — Tribu Pasteurellaeae. — Género *Pasteurella*. — Especie *Pasteurella hemolytica* de Newsom y Cross.

Morfología y coloración:

El organismo es pequeño, no móvil, encapsulado, Gram-negativo, bastoncito que es difícil de distinguir de la *Pasteurella multocida* cuando se aísla recientemente. Este microorganismo cultivado en medios artificiales se vuelve muy pleomorfo.

Requerimientos culturales y características de los cultivos

El requerimiento cultural de este microorganismo es muy similar al de la *Pasteurella multocida*.

En medios sólidos las colonias de *Pasteurella hemolytica* son redondas, llenas, fluorescentes, lisas y húmedas, aunque la fluorescencia es un carácter variable.

En caldo, el microorganismo produce una nube difusa (fade) con marcado sedimento en cultivo que ha sido mante-

* Tesis de grado.

nido por largo tiempo y un precipitado viscoso en cultivo viejo.

El organismo no crece en bilis, crece en verdé de malaquita en solución al 1 por 70.000, en cristal violeta al 1 por 75.000 y en fuchsina básica al 1 por 33.000.

Resistencia:

El microorganismo es destruido a 60° por 10 minutos y al 0.5% de fenol a los 15 minutos, bicloruro de mercurio al 1 por 5.000, el 3.5% de cresol lo destruye en 5 minutos. El microorganismo raramente vive un mes en medio sólido, pero vive bastante cuando se cultiva en un medio semisólido o en uno que contenga suero. Cultivos trasplantados de una a dos semanas aseguran el crecimiento.

Propiedades bioquímicas:

La *Pasteurella hemolytica* forma ácido pero no gas en caldo que contenga lactosa, maltosa, sacarosa, manitol, dextrina, galactosa, glicerol, inositol, levulosa, raffinosa, sorbitol y xilosa. Pero no fermenta adonitol, salicina, rhamnosa, e inulina.

Algunas cepas pueden producir reacción en manosa, dulcitol y arabinosa; este organismo no forma indol; reduce nitratos a nitritos, no produce acethyl methyl carbinol, todas las cepas de este microorganismo producen hemólisis beta. La leche es acidificada y coagulada en 48 horas.

Estructura antigénica y toxinas:

El microorganismo es antigénicamente homogéneo. No han sido descritas exotoxinas.

Inmunidad:

La información concerniente a la inmunidad producida por este microorganismo no es aprovechable.

Diagnóstico:

El diagnóstico del germen en neumonía de bovinos y ovinos puede hacerse

por el aislamiento y la identificación del microorganismo. Para este propósito la no producción de indol, la fermentación de lactosa y la hemólisis son las reacciones características.

Animales de inoculación:

La *Pasteurella hemolytica* es relativamente no patógena para ratones y conejos. La virulencia es enteramente perdida después de ser cultivada en medios artificiales por algún tiempo.

INVESTIGACIONES EFECTUADAS EN EL INSTITUTO TERAPEUTICO BYALA CIA. LTDA.

Caso N° 1. Ternero enfermo remitido de Ubaté por el propietario.

Datos anamnésicos:

Que todos los terneros enfermos tienen sintomatología muy parecida y que no responden a ningún tratamiento. Diarrea, tos y se mueren aunque sean vacunados contra peste boba.

..Estado general:

Incoordinación de los movimientos, decaimiento, tos, pelo erizado, morro seco con abundante secreción nasal mucopurulenta, cabeza agachada, cuello estirado.

Examen general:

Pelo erizado y casposo, conjuntiva pálida, morro seco y presenta abundante secreción nasal mucopurulenta, un poco de edemas del canal exterior, pulso débil. A la percusión se encontró una zona de macez en la parte inferior del tórax, respiración disneica. A la auscultación estertores húmedos. En la cavidad abdominal los borborismos intestinales están disminuidos. Materia fecal con abundante moco y estrías de sangre.

Diagnóstico:

El diagnóstico clínico fue de una neumonía y una enteritis (sospechoso de septicemia hemorrágica).

Pronóstico:

Grave por el estado general.

NOTA: Fue el único ternero que se le practicó examen clínico; pues el resto de cepas obtenidas en el laboratorio fueron aisladas de cadáveres.

Autopsias:

En los terneros N° 1 y N° 2 que se les practicó la autopsia se hallaron las siguientes lesiones:

N. 1) Hepatización de ambos pulmones. N° 2) hepatización de ambos pulmones, especialmente del lóbulo apical, dicha hepatización de un color rojo azulado, al corte se encuentra un líquido mucopurulento en el árbol bronquial y la mucosa está congestionada y las pleuras con adherencias.

N° 1) Endocarditis y pericarditis exudativa. N° 2) Miocarditis y endocarditis.

N° 1) Hígado congestionado. N° 2) Hígado congestionado.

N° 1) Bazo normal. N° 2) Bazo normal.

En el N° 2 peritoneo congestionado, con petequias; los ganglios jugosos, y la mucosa del intestino congestionada y con foquitos necróticos.

Tanto en los animales autopsiados como en los materiales en que se aisló el germen, los pulmones presentaban una hepatización y adherencias pleurales.

Todos estos materiales quedaron registrados en el laboratorio con los números C N° 911, C N° 949, C N° 965, C N° 1130, C N° 1139 y C N° 1141.

Estudios bacteriológicos efectuados en el laboratorio:

En siembras hechas en agar sangre de oveja con los distintos materiales, se encontró un germen cuyas colonias producían una hemólisis beta y en cultivo puro.

Morfología y coloración de las cepas aisladas:

El microorganismo es un bastoncito pequeño bipolar, no móvil, Gram-negativo; bastoncito que es muy similar a la *Pasteurella multocidae*, cultivada en medios líquidos (caldo simple) es muy pleomorfo.

Requerimientos culturales y características:

En medios sólidos las colonias son circulares, convexa, lisa, siendo mayor la hemólisis en sangre de bovino.

En caldo simple a las 24 horas hay una ligera turbidez y a las 48 horas un sedimento.

Resistencia:

Dos cepas al baño de maría a 50° C. durante 10 minutos no murieron; en cambio sí murieron a 55° C. mantenidas también durante 10 minutos. Las siembras en agar sangre con un trozo de pulmón perteneciente a la consulta N° 911 que fue tomado el día 8 de agosto de 1950 y mantenido en nevera a 20°C. bajo cero se encuentra vivo, en estado de pureza y aún conserva el poder de hemolizar los glóbulos rojos. Cultivos de este germen mantenidos en la nevera a 20°C bajo cero y que fueron sembrados el 15 de diciembre de 1950, aún se encuentran vivos el 23 de febrero de 1951. Las mismas cepas sembradas en agar sangre y mantenidas al medio ambiente mueren entre los 6 y 7 días.

CUADRO COMPARATIVO DE LA RESISTENCIA AL FORMOL

Siembra inmediatamente después de agregar la solución de formol al cultivo.

Concentración del formol	1x10	1x100	1x1000	1x10000	1x100000
Cepa consulta N° 911	—	+	++	+++	+++
Cepa Consulta N° 949	—	+	++	+++	+++

Siembras efectuadas a los 5 minutos de agregar la solución de formol al cultivo

Concentración del formol	1x10	1x100	1x1000	1x10000	1x100000
Cepa Consulta N° 911	—	—	+	+	++
Cepa Consulta N° 949	—	—	+	++	+++

Siembra a los 10 minutos de agregar la solución de formol al cultivo.

Concentración del formol	1x10	1x100	1x1000	1x10000	1x100000
Cepa Consulta N° 911	—	—	+	+	++
Cepa Consulta N° 949	—	—	+	+	++

CUADRO COMPARATIVO DE LA RESISTENCIA AL FENOL

Siembra inmediatamente después de agregar la solución de fenol al cultivo.

Concentración del fenol	1x10	1x100	1x1000	1x10000	1x100000
Cepa Consulta N° 911	—	+	++	+++	+++
Cepa Consulta N° 949	—	+	++	+++	+++

Siembra a los 5 minutos después de agregar la solución de fenol al cultivo.

Concentración del fenol	1x10	1x100	1x1000	1x10000	1x100000
Cepa Consulta N° 911	—	+	++	+++	+++
Cepa Consulta N° 949	—	—	++	+++	+++

Siembra a los 10 minutos después de agregar la solución de fenol al cultivo.

Concentración del fenol	1x10	1x100	1x1000	1x10000	1x100000
Cepa Consulta N° 911	—	—	—	++	++
Cepa Consulta N° 949	—	—	—	++	+++

Nota: — = Cultivo estéril; + = cultivo colonias escasas; ++ = mayor número de colonias; +++ = cultivo abundante; ++++ = cultivo en capa uniforme.

Propiedades bioquímicas:

Las cepas N° 911 y 949 que fueron chequeadas con algunos azúcares dieron las siguientes reacciones: Acido pero no gas en lactosa, dextrosa, sacarosa, rafinosa, sorbitol, salicina y manitol. Pero no fermentaron inulina.

CUADRO COMPARATIVO DE LAS DISTINTAS CEPAS AISLADAS EN EL LABORATORIO BYALA CON LA DESCRITA POR MERCHANT.

Cepa	Mo	Hemólisis	I	D	S	L	N	H2S
Merchant	—	beta	—	+	+	+	+	—
C N° 911	—	beta	—	+	+	+	+	—
C N° 949	—	beta	—	+	+	+	+	—
C. N° 1141	—	beta	—	+	+	+	+	—

Nota: Mo = Móvil; I = Indol; D = Dextrosa; S = Sacarosa; L = Lactosa; N = Nitritos; H2S = Hidrógeno Sulfurado.

Estructura Antígena y Toxinas

Exotoxinas:

Se filtró por Seitz cultivo líquido de 48 horas de incubación con el objeto de separar la masa bacteriana de una posible exotoxina. El filtrado se inoculó a 6 ratones por vía intraperitoneal (0,5 cc.) no muriendo ninguno durante el período de observación de 10 días.

Endotoxinas Bacterianas:

Para demostrar la presencia de endotoxinas de las cepas del laboratorio se siguieron los métodos siguientes:

I) Cultivada la cepa en un medio líquido, por centrifugación se obtuvo la masa bacilar; ésta se lavó con suero fisiológico. Después ésta se emulsionó en suero fisiológico al 5% y se lisó (método de congelación) durante 7 días. El lisado obtenido se filtró por Seitz y con este filtrado se inocularon 6 ratones por vía intraperitoneal (0,5 cc.), durante los dos primeros días los animales presentaban como síntomas: pelo erizado y ligero decaimiento; muriendo uno a los dos días de inoculado. El resto murió durante el período de observación de 10 días.

II) Los gérmenes molidos se emulsionaron con suero fisiológico. Luégo se filtró por Seitz y con este filtrado se inocularon 6 ratones por vía intraperitoneal (0,5 cc.), no muriendo ninguno durante el período de observación de 10 días.

NOTA: De los estudios anteriores saco como conclusión que las cepas del laboratorio no producen exotoxinas ni endotoxinas de acuerdo con los métodos seguidos, en cantidad suficiente para matar ratones.

Patogenicidad:

Las cepas de *Pasteurella hemolytica* son poco patógenas para conejos y curies sea cual fuere la vía de inoculación. Y siendo bastante patógena para los ratones cuando se administra por vía intraperitoneal; pero pierde la virulencia cuando ha sido cultivada en medios artificiales por mucho tiempo.

El cuadro N° 1 sirve para demostrar los resultados de inoculación con las cepas C N° 911 y C N° 949.

NOTA: Las lesiones que presentaban los animales que murieron fueron las siguientes: pulmones congestionados, serosas congestionadas y hemorrágicas, hígado congestionado y algunos presentaban enteritis generalizada; correspondiendo las lesiones en general a las de una septicemia. Encontrándose el germen puro en los distintos órganos con que se hicieron frotis y siembras. El tiempo promedio de incubación en los animales inoculados fue de 20 horas y la mejor vía de inoculación fue la intraperitoneal.

Inoculación en terneros:

El día 4 de septiembre se inoculó un ternero de dos días de edad con una emulsión de *Pasteurella hemolytica* perteneciente a la consulta N° 911 que había sido aislada un mes antes usando como vía de administración la intravenosa y la intraperitoneal. La suspensión bacteriana contenía 5 ansas de medio de cultivo sólido.

Síntomas observados durante los 10 días siguientes a la inoculación:

5 de septiembre: El ternero presenta el morro seco y caliente, polipnea, decaimiento, piel y mucosas intensamente congestionadas pero conserva el apetito; temperatura 39,2°C. en la mañana y 40°C. en la tarde.

6 de septiembre: Secreción mucosa por ambos ollares, pelo erizado y sin brillo, y el morro sigue seco y caliente; temperatura en la mañana 39,5°C., en la tarde 39,3°C.

8 de septiembre: lo mismo que el día anterior, temperatura 39,5°C.

9 de septiembre: materia fecal de color verde oscuro sanguinolenta, fétida y con mucho moco; (1) morro con esfoliaciones y un poco decaído el animal. Temperatura 39,6°C. en la mañana.

(1) Este síntoma (moco y sangre en la materia fecal, fetidez) es casi constante

en los terneros afectados de la enfermedad natural.

10 de septiembre: mejora el estado general un poco, temperatura 39,2°C.

11 de septiembre: el estado general ha mejorado notablemente.

12, 13 y 14 de septiembre: el ternero está bien.

15 de septiembre: se da de alta por estar en buen estado general.

El día 21 de septiembre se inoculó una ternera de 8 días de edad por vía intraperitoneal y nasal, cantidad de cutlivo inoculada 5 ansas.

22 de septiembre: presenta el morro seco y caliente, ligero decaimiento, temperatura 39,6°C.

2 ansas emulsionadas en 1 cc. de suero	fisiológico C N° 911 2/2 0,5 cc.
2 ansas emulsionadas en 1 cc. de suero	fisiológico C N° 949 2/2 0,5 cc.
1 ansas emulsionadas en 1 cc. de suero	fisiológico C N° 911 2/2 0,5 cc.
1 ansas emulsionadas en 1 cc. de suero	fisiológico C N° 949 2/2 0,5 cc.
½ ansas emulsionadas en 1 cc. de suero	fisiológico C N° 911 2/2 0,5 cc.
½ ansas emulsionadas en 1 cc. de suero	fisiológico C N° 949 2/2 0,5 cc.
¼ ansas emulsionadas en 1 cc. de suero	fisiológico C N° 911 2/2 0,5 cc.
¼ ansas emulsionadas en 1 cc. de suero	fisiológico C N° 949 2/2 0,5 cc.
⅓ ansas emulsionadas en 1 cc. de suero	fisiológico C N° 911 2/2 0,5 cc.
⅓ ansas emulsionadas en 1 cc. de suero	fisiológico C N° 949 2/1 0,5 cc.
1/16 ansas emulsionadas en 1 cc. de suero	fisiológico C N° 911 2/1 0,5 cc.
1/16 ansas emulsionadas en 1 cc. de suero	fisiológico C N° 949 2/1 0,5 cc.

El numerador representa el número de animales inoculados y el denominador el número de muertos.

La dosis mínima letal en ratones está entre un dieciseisavo y un treintaidosavo de ansas, usando como vía de administración la intraperitoneal.

Nota: De 8 conejos inoculados tan sólo murieron 3. — De 9 curíes inoculados, murieron 6. — De 20 ratones inoculados por vía intraperitoneal todos murieron.

De los datos anteriores se deduce que las cepas obtenidas en el laboratorio son altamente patógenas para los ratones blancos, menos patógenas para curíes y relativamente poco patógenas para los conejos, siendo la mejor vía de administración la intraperitoneal.

Las inoculaciones en terneros si no han dado los resultados que se esperaban, esto se debe seguramente a la falta de ciertas condiciones higiénicas, alimentación deficiente, cambios climatológicos, etc.

23 de septiembre: decaimiento, morro presenta esfoliaciones, materia fecal con abundante moco, temperatura 39,5°C. en la mañana, 40,3°C. en la tarde.

24 de septiembre: el estado general ha mejorado notablemente.

En los días restantes no se observó síntoma ninguno de importancia y la ternera se dió de alta el 29 de septiembre.

Un cuadro comparativo de las cepas consulta N° 911 y consulta N° 949 para demostrar cuál es la dosis mínima en ratones blancos, usando como vía de administración la intraperitoneal.

Ratones inoculados

Inmunidad:

Los datos que hasta el presente se tienen sobre la aplicación de una Bacterina Específica preparada según los métodos del laboratorio son los siguientes: vacunaciones efectuadas en terneros de 8 días y revacunados 8 días después producen una inmunidad de 6 meses, tiempo necesario para prevenir los animales, puesto que la enfermedad se presenta únicamente en animales de 15 días a 6 meses. Lográndose en esta forma disminuir la mortalidad de un 10 a un 2% según observaciones del doctor A. H.

Los resultados de la inmunización con la Bacterina Específica en aquellas haciendas en las cuales se diagnosticó *Pasteurella hemolytica* son hasta la presente buenos, según datos de varios ganaderos.

Diagnóstico:

El diagnóstico de *Pasteurella Hemolytica* se hizo atendiendo principalmente a la no producción de indol, formación de ácido en lactosa, hemólisis en las distintas sangres, su forma y caracteres tintoriales y también a la sintomatología de los animales enfermos.

Conclusiones:

- 1) Por primera vez se estudia en Colombia un germen cuya clasificación corresponde a la *Pasteurella hemolytica*, únicamente diferenciándose de la descrita por Merchant en que aquélla es bastante patógena para los ratones cuando se administra por vía intraperitoneal, y la otra no.
- 2) Las cepas se conservan en buenas condiciones a bajas temperaturas (20° bajo cero).
- 3) Se sospecha que este agente (*Pasteurella Hemolytica*) sea el causante de una enfermedad de los terneros de 15 a 6 meses que presentan los síntomas si-

guientes: pelo erizado y casposo, conjuntiva pálida, morro seco y presenta abundante secreción nasal mucopurulenta, un poco de edema del canal exterior, pulso débil. A la percusión se encontró una zona de macidez en la parte inferior del tórax, respiración disneica. A la auscultación estertores húmedos. En la cavidad abdominal los borborismos intestinales están disminuídos. Materia fecal con abundante moco y estrias de sangre.

BIBLIOGRAFIA

- Bergey's. — Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore. The Williams & Wilkins Company. 549. 1948.
- Hagan Willian Arthur. — The Infectious Diseases of Domestic Animal. Comstock publishing Company Inc., Ithaca. N. Y. 162. 1947.
- Merchant Ival Arthur. — Veterinary Bacteriology. The Iowa State College Press. 368. 1946.
- Topley and Wilson's. — Principles of Bacteriology an Inmuniti. London Edward Arnold & Co. 778. 1946.

