

# Sobre la técnica del aislamiento del Actinomyces Necrophorus

Por el doctor Antonio Crua

Médico Veterinario.

Desde hace dos años hemos emprendido un estudio sistemático del Actinomyces Necrophorus, agente específico de la "Difteria de los terneros" enfermedad conocida también bajo el nombre de "Necrobacilosis de los terneros".

La difusión de la enfermedad en los terneros por el Actinomyces Necrophorus, en la Sierra ecuatoriana, tiene el carácter de una verdadera enzootia. La gravedad de las lesiones y la malignidad del proceso, constituyen para el futuro de la población ganadera del país un verdadero problema. El cuadro que más frecuentemente se presenta es de un proceso del aparato respiratorio, que puede ser acompañado por fenómenos entéricos: esta forma termina normalmente con la muerte de los animales. En los exámenes microscópicos hemos constatado lesiones necróticas masivas pleuro-pulmonares, asociadas en el 70% de los casos con lesiones del mismo tipo necrótico de localización rino-gloso-faríngea; en el 25% de lesiones umbilicales y hepáticas; en el 5% de los casos la lesión pulmonar es la única manifestación de la infección por Actinomyces Necrophorus. Las lesiones son de tipo caseoso o caseo-purulento. Recién hemos observado un caso de abscesos subdural de la fosa craneana por Actinomyces Necrophorus en una ternera; abscesos que se produjeron por infecciones de los senos y penetración a través de las vías olfatorias.

La enfermedad es fatal en los terneros en sus dos primeros meses de vida. La noxa afecta a los animales importados, cruzados y criollos: sólo datos estadísticos sucesivos nos darán conceptos sobre la mayor o menor resistencia de las razas y si existe esta resistencia. La enfermedad es bien conocida por los Médicos Veterinarios ecuatorianos y la misma ha si-

do identificada en el país como entidad nozoológica hace 20 años.

Por lo que concierne al aislamiento del microorganismo específico después de ensayar con resultados negativos los métodos que se encuentran indicados en varios textos de bacteriología decidimos seguir el método de L. H. Scrivner y M. Lee. Este método se había demostrado como satisfactorio en las experiencias de los AA. para el aislamiento del microorganismo. El método de los mencionados investigadores consiste en:

1º Inoculaciones subcutáneas en conejos sobre la línea alba del abdomen, de emulsiones de material necrótico o de cultivos que contienen Actinomyces Necrophorus (cultivos obtenidos de siembras de sangre del corazón de conejo, etc)

2º El animal inoculado es sacrificado algunas horas antes de que se verifique la muerte y 2 cc. de sangre no coagulada del corazón, es sembrada en cada tubo que contenga el medio de cultivo que es conocido bajo la denominación de Cooked Meat.

Con tal método nosotros no llegamos al aislamiento de cepas ni hemos podido comprobar durante los meses de ensayos las aseveraciones de Scrivner y Lee relacionadas con su método de aislamiento del microorganismo. Durante el decurso de los ensayos hechos según el método de los mencionados AA. tuvimos la oportunidad de hacer algunas observaciones las cuales nos proporcionaron los elementos para un nuevo método de aislamiento. Nuestro método no puede considerarse como una modificación del método de Scrivner y Lee, en cuanto ni el material de siembra ni el medio de cultivo usados, tienen algo en común. Por cuanto concierne el procedimiento de los métodos hay una única coincidencia la cual es precisamente de considerar como una necesidad indispensable, el pasaje sucesivo del material necrótico o de las siembras

de *Actinomyces Necrophorus* de un conejo al otro hasta obtener el aislamiento del microorganismo. Sobre el mismo punto hay discordancias de afirmaciones. Scrivner y Lee afirman de no haber constatado la purificación o mejor dicho el enriquecimiento al punto de inoculación, después de varios pases sucesivos de conejo a conejo. Nosotros afirmamos que es precisamente en el conjuntivo del conejo donde encontramos que el microorganismo se purifica en los pases sucesivos de conejo a conejo.

Este enriquecimiento y purificación del microorganismo en el tejido conjuntivo del conejo provoca un cuadro de necrosis característico. Cuadro anatomopatológico que obteniéndose por medio de los pases sucesivos en el conejo, asegura el aislamiento del microorganismo. Este cuadro consiste:

1) Examen objetivo de la lesión consiguiente a inoculación subcutánea en el conejo del *Actinomyces Necrophorus*, a las 24 horas el dermis presenta un eritema circunscrito; a las 48-72 horas se nota un edema marcado del tejido subcutáneo y un eritema del dermis por toda la amplitud de la lesión; sucesivamente, hasta que se verifique la muerte del animal el edema subcutáneo se extiende por toda la superficie ventral y aumenta gradualmente de volumen; cuando la lesión está ya en su último estado, el dermis que la recubre presenta un aspecto isquémico con demarcación perifocal de un aspecto papiráceo. La lesión presenta siempre un halo eritematoso.

2) Examen necroscópico del animal inoculado, al abrir la lesión se constata una necrosis masiva del conjuntivo afectado, con fenómenos regresivos de degeneración caseosa, especialmente evidente en la zona superficial e inmediatamente por debajo de ésta. El conjuntivo profundo de la parte afectada muestra un aspecto necrótico muy característico siendo incompleta la degeneración caseosa de la parte fibrosa del tejido conjuntival mismo. Si el germen es inoculado sobre la región lumbosacral se nota la difusión

del proceso por los haces aponeuróticos musculares.

Este cuadro del proceso demuestra una particular electividad del microorganismo por el tejido conjuntivo; esta electividad nos sugirió sucesivamente la idea de un medio de cultivo a base de tejido conjuntivo; este medio nos dió buenos resultados para la propagación y aislamiento del germen.

Hacemos notar que por medio de siembras de material necrótico de bovino nunca obtuvimos el aislamiento del microorganismo revelándose siempre las mismas siembras más o menos contaminadas. También cuando las formas típicas del microorganismo eran numerosas y los contaminantes relativamente pocos el *Actinomyces Necrophorus* era sucesivamente eliminado en los pases sucesivos "in vitro", por los otros microorganismos. Este hecho es también reconocido por Scrivner y Lee en su trabajo. La lesión del bovino cualquiera sea la localización, contiene una variada flora bacteriana, diversa según el momento en el cual se recogió el material necrótico. Esta flora bacteriana resulta constituida por microorganismos saprofitos de invasión secundaria pre y post-mortal. A consecuencia de esta invasión secundaria o asociación, el cuadro que se presenta en las primeras inoculaciones de emulsiones de material necrótico de bovino al conejo no corresponde como cuadro anatomopatológico al cuadro anteriormente descrito como típico. Se observan variaciones de tipo necrótico con putrefacción o supuración. Para obtener la producción del cuadro necrótico típico, por acción del *Actinomyces Necrophorus* necesita escoger de estas lesiones (para la emulsión e inoculación sucesiva en un nuevo conejo) los puntos necróticos más profundos y más característicos.

Nuestro método de aislamiento consiste en: inoculación subcutánea de material necrótico de bovino a un conejo y pases sucesivos de conejo a conejo de una emulsión de la lesión necrótica del conejo precedente. En la última parte del aislamiento se inocula también cultivos pro-

venientes de siembras de material necrótico procedente del conejo, cultivos que contengan numerosas formas características del *Actinomyces Necrophorus*.

Los detalles de las inoculaciones son los siguientes:

a) Examen bacterioscópico directo del material necrótico de bovino para constatar el tipo de la flora bacteriana.

b) Inoculación de material necrótico de bovino subcutáneamente al conejo, previa depilación.

c) La cantidad de emulsión inoculada varía de 0,5 a 1 cc.

d) La duración de la enfermedad experimental varía de 4-17 días según el grado de contaminación del material. Cuanto más puro es el microorganismo más larga es la duración de la enfermedad.

e) El animal es sacrificado a lesión pregresada cuando el mismo no está todavía en el período preagónico; pensamos que el sacrificio del animal en este período permite disfrutar de la acción consiguiente sobre los contaminantes por parte de las defensas orgánicas del conejo; al mismo tiempo pensamos que el sacrificio hecho pocas horas antes de la muerte del animal sea contraindicado por un posible pasaje en círculo y relativa contaminación de la lesión por parte de gérmenes saprofitos contenidos en las grandes cavidades.

El material necrótico del conejo es seleccionado y preparado para la siembra con las siguientes manualidades:

a) Disección del cutis en forma aséptica.

b) Separación de la parte necrosada del tejido subcutáneo más superficial, hasta llegar al tejido necrótico profundo.

c) Se toman trozos de tejido en tamaño pequeño.

d) Los trozos de tejidos necróticos despojados por sacudimiento en la solución fisiológica de la substancia caseosa toman el aspecto de red fibroelástica. Cuando toman este aspecto están listos para la siembra.

El medio electivo para el aislamiento del *Actinomyces Necrophorus* es el Thioglycolate Medium B. B. L. Las siembras de trozos necróticos da lugar a crecimiento con formación de gas, a las 12-24 horas. El crecimiento del microorganismo es característico. Se forman copos globosos, densos, consistentes, blanquecinos que nadan en el líquido del medio de cultivo, quedándose en la mayoría de los casos, suspensos en la mitad de la columna del líquido o saliendo casi a la superficie de la misma. Si el microorganismo está puro, afuera de los copos globosos se nota un enturbiamiento difuso del medio de cultivo. Hay también algunos gérmenes con estreptobacilos y estreptococos que dan la formación de copos en tal medio de cultivo, pero los copos formados por tales microorganismos tienen un aspecto diverso de los formados por el *Actinomyces Necrophorus*. En caso de formarse los copos característicos del *Actinomyces Necrophorus* y si existe contaminación manifestándose por enturbiamiento homogéneo, se toman con el asa tales copos y se pasan en solución fisiológica para separarlos de los otros microorganismos y se resiembran nuevamente en Thioglycollate medium B. B. L. En caso de no obtenerse la purificación del *Actinomyces Necrophorus* en los 2-3 primeros pases in vitro es preferible inocular con el cultivo nuevos conejos.

Conclusiones y Sumario:

### Conclusiones y Sumario:

Nuestro método consiste en:

1º Disfrutar de las propiedades electivas del *Actinomyces Necrophorus* por el tejido conjuntivo del conejo y de las propiedades orgánicas selectivas del conejo, frente a los microorganismos que comunmente se asocian y contaminan los focos necróticos en el bovino.

2º Disfrutar de la fuerte localización del *Actinomyces Necrophorus* en las partes recién afectadas por la necrosis típica.

3º Disfrutar de la forma especial de crecimiento del *Actinomyces Necrophorus* en Thioglycollate medium; copos globosos consistentes, tales de permitir los pases sucesivos de un tubo a otro de cultivo hecos en la forma indicada.

**BIBLIOGRAFIA:**

- 1º—L. H. Scrivner and M. Lee, Wyoming Agricultural Experiment Station, Laramie, Wyo. — The Morphology, Culture Isolation and immunity studies of *Actinomyces Necrophorus* in Calf diphtheria. Presented at the seventieth annual meeting of the American Veterinary Medical Association: Chicago II. August 14-18, 1933.
- 2º—Raymond a Kelser and Harry W. Schoenig: Manual of Veterinary Bacteriology.
- 3º—R. Caicedo Aguilar. — Necrosis bacilar de los animales y difteria de los terneros. Revista de Medicina Veterinaria. Enero-junio de 1945.