

DIAGNÓSTICO DE LA FIEBRE CARBUNCLOSA

(RECOLECCION DE MATERIALES)

POR EL

DR. ALFREDO C. MARCHISOTTI

Jefe de Trabajos del Laboratorio de Bacteriología

CONSIDERACIONES GENERALES.

Desalentados por las fallas que en la práctica presentan los métodos preconizados hasta hoy, para la recolección u obtención de materiales apropiados al diagnóstico bacteriológico de la fiebre carbunclosa y compenetrados de la necesidad de aportar nuevas orientaciones a esas técnicas insuficientes, es que: a indicación de mi profesor el Dr. Federico Sívori, y bajo su dirección, emprendí estas investigaciones, basadas en una serie de experiencias rigurosamente contraloreadas.

En nuestro plan de estudio, para el cual hemos utilizado cobayos, conejos y ovinos muertos por carbunco experimental, nos proponíamos probar durante que tiempo la forma vegetativa del *bacillus anthracis* persiste en los cadáveres, a fin de deducir el partido que de esta misma persistencia pudiera desprenderse para el diagnóstico bacteriológico de la fiebre carbunclosa.

Sobre estas bases, recogimos material carbuncloso de los diversos líquidos y pulpas orgánicas, en distintas etapas del proceso de la putrefacción, con los cuales, aparte de

las siembras efectuadas en medios artificiales comunes, tratamos de indagar por el examen microscópico, la presencia o ausencia del *bacillus anthracis*, su proceso de desorganización, la presencia y estado de las cápsulas y la aparición de otras formas microbianas.

Las reacciones tintoreales y culturales efectuadas en nuestras investigaciones, debía darnos una idea de como el *bacillus anthracis* desaparece de los cadáveres putrefactos y como este proceso de degradación orgánica, está regido por las variaciones de la temperatura ambiente; lógico era tener en cuenta factor tan importante.

A la vez que efectuábamos estas investigaciones y utilizando siempre el mismo material de estudio, emprendimos una serie de investigaciones de control de todos aquellos métodos de recolección de materiales preconizados en estos últimos años, a fin de hallarnos autorizados para emitir un juicio sobre las fallas o bondades de cada uno de ellos.

La forma especial y extensiva de la explotación de nuestros ganados; la extensión de nuestro país, que abarca desde la zona tórrida hasta la fría y la falta de laboratorios regionales, han sido hasta ahora un obstáculo serio que se ha opuesto a la posibilidad de efectuar diagnósticos bacteriológicos seguros, que hubieran redundado benéficamente en la adopción de medidas de profilaxia anti-carbunclosas.

Como se sabe, el *bacillus anthracis* desaparece bastante rápidamente en los cadáveres y si el material no es recogido inmediatamente después de la muerte y en forma adecuada, el diagnóstico ulterior será imposible. El ganadero que vigila diariamente su ganado, podrá recoger un material aprovechable para un diagnóstico bacteriológico seguro. Pero en ciertos establecimientos demasiado extensos, donde por la misma forma de explotación, es imposible recorrer continuamente los cuadros, es común, máxime si se trata de cadáveres expuestos a los rayos del sol y en épocas del año a temperaturas elevadas, que el ganadero recoja el material de estudio, cuando el *bacillus*

anthracis ha desaparecido ya del organismo. En estos casos, el material remitido será forzosamente un material inútil.

Las cosas se complican más aún, cuando son las autoridades sanitarias las que deben investigar y comprobar la presencia de carbunco en un establecimiento ganadero determinado. El técnico llega a un establecimiento muchas horas o por lo común, muchos días después de haberse producido la muerte. Las lesiones anátomo-patológicas del carbunco, encuéntranse veladas por las modificaciones imprimidas por el proceso de la putrefacción y no se encuentran en los órganos vestigios de *bacillus anthracis*. Si a todo esto se agrega la mala voluntad de algunos hacendados, que no ven en estas inspecciones sino una amenaza para sus intereses, es fácil deducir que la misión técnica debe malograrse fatalmente.

Estas dificultades para establecer un diagnóstico, trae, como consecuencia aparejada, la inaplicabilidad de la Ley de Policía Sanitaria Animal; una ausencia deplorable de profilaxia racional y la difusión, cada día más alarmante, de este flagelo, que constituye a la vez un peligro inminente para el hombre y una rémora al progreso de nuestra industria ganadera.

Nuestras experiencias han tenido por finalidad, buscar, dentro de lo posible, la forma de contrarrestar estos inconvenientes y hacer conocer el método más sencillo y práctico de recolección de material para el diagnóstico ulterior del carbunco. Si conseguimos nuestro objeto nos quedará la satisfacción de haber contribuído con nuestro grano de arena para contrarrestar los efectos de esta enfermedad que constituye una afrenta para una ganadería racional.

HISTORIA.

No nos ocuparemos del examen clínico, ni de las lesiones anátomo-patológicas del carbunco. En la mayoría de los casos no hay oportunidad de observarlos. Por otra parte,

según Schipp (1), el diagnóstico clínico y anátomo-patológico del carbunco, es sólo un «diagnóstico de probabilidad». La marcha sobreaguda y a veces fulminante que reviste la enfermedad, hace muy difícil que pueda formularse un diagnóstico. Aún en animales a galpón, vigilados continuamente, por lo común, no se observa el más ligero trastorno de la salud y mueren de la noche a la mañana. En cuanto a las lesiones anátomo-patológicas de carácter septicémico, no tienen nada de patognómico y las pocas que pudieran servir para una presunción, son rápidamente veladas por las modificaciones que los cadáveres experimentan, como consecuencia del proceso de la putrefacción.

Wulff (2), da tan poca importancia a los datos anamnésticos y a las lesiones observadas a la necropsia, que para él, no hay carbunco *sin determinación microscópica y cultural del bacillus anthracis*.

Pero el diagnóstico bacteriológico del carbunco con los materiales de estudio que diariamente se reciben en los laboratorios, es un problema que debía dilucidarse.

El envío de *frotis* de sangre u otros órganos para el examen microscópico, no siempre pueden ser utilizados provechosamente. Como ellos son preparados en la mayoría de los casos por manos inexpertas, es común recibir algunos que llegan en tales condiciones, que es imposible utilizarlo para un examen microscópico. Si ellos son prolijamente preparados inmediatamente después de la muerte, pueden ser un medio eficaz para establecer un diagnóstico, pero cuando el material es recogido tarde y que existe en los líquidos y pulpas orgánicas otros bacterios, las cosas se complican hasta el extremo de ser imposible individualizar entre estos al *bacillus anthracis*.

El envío que se hace tan frecuente, de pipetas llenas de sangre, de porciones de órganos diversos, de fragmentos de venas ligadas en ambos extremos, etc.; recogidos por lo general, en las peores condiciones de asepsia y sometidos antes de llegar a los laboratorios durante largo tiempo, a temperaturas de verdaderos días caniculares, son

muestras que llegan en un estado tal de descomposición, que se hace hasta ridículo pretender iniciar con ellas una investigación bacteriológica seria.

El *bacillus anthracis* colocado en estas condiciones de ambiente favorable al desarrollo de otras especies microbianas, no tarda en sufrir grandes modificaciones o en desaparecer por completo, en forma tal, que cuando esas muestras llegan a los laboratorios, es materialmente imposible con los medios actuales de investigación, poner de manifiesto su existencia y como corolario de esta investigación insuficiente, persistirá la duda si ha existido o no carbunco, en todos aquellos casos en que se hayan obtenido resultados negativos.

En estos últimos años y con el fin de preservar al *bacillus anthracis* de su fácil y rápida destrucción en los materiales de envío, se han aconsejado las formas más variadas para efectuar estas remisiones.

Hosang (3), aconseja colocar entre dos portas o trozos de vidrio, una gruesa capa de sangre y entre otros dos, una capa igual de pulpa de bazo, pero sin ejercer sobre ellas una fuerte compresión. Para ello indica colocar entre ambos portas, y en sus dos extremidades, trozos cuadrados de cartón de un espesor apropiado, para que los portas de cada preparación, no ejerzan sobre el material enviado, una presión exagerada.

Fischoeder (4), recoge sangre, que la deseca en el interior de pequeños tubos de ensayo de 5 a 7 centímetros de longitud por 12 milímetros de diámetro.

Prensse (5), muchos años antes de que fuera conocido el método de Schüller, solicita el envío de sangre en capas gruesas desecadas sobre papel de filtro.

Para Carl (6), es un trozo de oreja lo que debe remitirse, de preferencia a cualquier otro material, por cuanto es una de las regiones ultimamente invadidas por la putrefacción.

Bongert (7), prefiere desecar sobre portas, gruesas capas de sangre, recogida en la vena auricular, simultáneamente con preparados idénticos de bazo.

En cambio Olt (8), recoje muestras de sangre y bazo en capas delgadas sobre la superficie de sección de una papa cocida partida en dos mitades, que reunidas enseguida, son así remitidas a los laboratorios.

Szasz (9), haciendo estudios sobre la persistencia del *bacillus anthracis* en los diversos órganos, llega a la conclusión de que el pulmón, es el órgano que da resultados más constantes, pero a condición de someterlo a la acción del calor, para destruir así, las diversas formas microbianas que forzosamente contaminan dicha víscera.

Franke (10), busca con preferencia el *bacillus anthracis* en el seno del tejido muscular.

En cuanto a Hitzig, Eppinger y Hutyra (11), se inclinan hacia el lado del sistema nervioso central y sus anexos, obteniendo cultivos de ellos, cuando los demás órganos le dan resultado negativo.

Hace pocos años Steffenhagen y Andrejew (12), crean un nuevo método originalísimo para la remisión de estos materiales, utilizando para ello, la sangre absorbida por sanguijuelas, del interior de las cuales consiguen aislar quince días después el *bacillus anthracis* con toda su virulencia inicial.

Esta diversidad de opiniones pone en evidencia que, todos estos modos de remisión de material, adolecen de inconvenientes más o menos grandes para alcanzar el fin que se persigue.

Conocidas como eran las dificultades para conservar la forma vegetativa de *bacillus anthracis*, se pensó en utilizar el espora, forma menos susceptible a las causas de destrucción naturales y cuya vitalidad y resistencia han sido puestas de manifiesto por las célebres experiencias de Pasteur y Joubert (13), y ultimamente por Bruno Bussón (14), que aísla el *bacillus anthracis* de esporos conservados en hilos desecados durante 17 años.

Es así que Foster, Marxer (15), Jacobstal y Pfersdorff (16), se proponen favorecer por un método electivo la formación del espora, para luego utilizarlo como material eficaz de diagnóstico. Hacen un estudio paciente del

esporo y después de fijar la forma como mejor se favorece este proceso de esporulación, crean un método nuevo que se le conoce hoy por el nombre de método de Strasburgo o de las barritas de yeso. Este método, consiste en colocar al *bacillus anthracis* al abrigo de la acción nociva de los bacterios de la putrefacción y lo suficientemente aereados para que la esporulación pueda efectuarse normalmente, lo que se consigue, recogiendo sangre, líquidos o pulpas orgánicas en barritas de yeso, previamente humedecidas en caldo. El bacilo del carbunco, colocado en estas condiciones, esporula rápidamente y permite obtener cultivos característicos, mucho tiempo después de haber sido recogido el material. La adopción de este método, por la Dirección General de Ganadería de la Nación, la cual lo ha hecho su método oficial y los trabajos que más tarde se publicaron en nuestro país, sustituyendo el yeso con las tizas comunes de escuela (17), como contribución (18), y contralor (19), introduciendo modificaciones en la técnica de recolección y en las siembras (20), son los mejores testimonios que puedan darse de las bondades de este método.

Como sucede siempre que se hace un nuevo descubrimiento en ciencias, el método de Strasburgo fué controlado por todas partes y no tardó en sufrir toda una serie de modificaciones.

Schüller (21), prefiere utilizar en sustitución a las barritas de yeso, el material recogido en rollos de papel filtro humedecido, obteniendo resultados muy halagadores. Mas tarde Grabert (22), corrobora las experiencias de Schüller y determina la superioridad del papel a las barritas de yeso, mientras Foth y Wulff (23), llegan a conclusiones inversas. En cambio, en nuestro país, Garaguso (24), obtiene resultados halagadores con el método de Schüller. Sívori, aconseja recoger el material sobre la superficie interna del cartón de una caja de fósforos — cuando no se tiene otro material a mano— y que tiene la ventaja de ser un material que está siempre al alcance de todo hombre de campo.

Más tarde, Muller y Engler (25), hacen un estudio de los diversos cuerpos porosos. Investigan con barritas de yeso simple y adicionadas con cal apagada, papel filtro, cartón grueso, trozos de médula de sauco, madera de cedro, ladrillo, creta y arcilla y comprueban la superioridad de las barritas de yeso simples, a las revestidas de cal apagada y a los rollos de papel. En los trozos de ladrillos, la esporulación se efectúa rápidamente; la creta y arcilla húmeda resultan inmejorables. En cambio, el cartón, la médula de sauco y la madera de cedro, son inadecuados.

Mazzini (26), obtiene la esporulación sobre hilos de seda humedecidos con sangre o pulpa de bazo, remitidos en tubos comunes de ensayo conteniendo algunos trozos de cloruro de cal. Efectúa las siembras directamente y si sospecha contaminaciones calienta algunos minutos entre 60° y 65° C.

R. Bozelli (27), propone utilizar los tallos desecados de *ferula communis*, fácil de conseguir en todo el territorio de la península itálica y que por los abundantes poros que contienen, se prestan admirablemente a la esporulación del *bacillus anthracis*.

Como el método de Strasburgo y sus derivados presentan algunos inconvenientes para su aplicación en la práctica, Ciuca y Stoicesco (28), preconizan un nuevo método, corroborado más tarde por Pfeiler (29), que consiste en recoger esporos en las pieles de animales muertos por carbunco. Ellos obtienen cultivos característicos, hasta después de catorce meses de la muerte, en pieles de cadáveres que a las 56 horas, no revelaron *bacillus anthracis* en ninguno de sus órganos.

Más tarde Ciuca y Tenea (30), aconsejan recoger el material esporulado en el contenido intestinal.

Queda aún, un último medio de diagnóstico del carbunco y que en estos últimos años ha dado lugar a numerosísimos trabajos de contralor y que se le conoce con el nombre de método de la termo-precipitación de Ascoli (31).

DESAPARICIÓN DEL «BACILLUS ANTHRACIS» EN LOS CADÁVERES.

La biología del *bacillus anthracis* es bien conocida, para que hagamos en este trabajo, una descripción más o menos detallada de sus modalidades. Su persistencia en los cadáveres carbunclosos es efímera, su desaparición marcha en razón directa a la descomposición cadavérica y no tardan en ser suplantados por otras especies microbianas, más o menos constantes en el proceso de la dislocación de la materia orgánica. (*Vibrión séptico*, *proteus vulgaris*, *bacillus putridus*, etc., etc.)

El vibrión séptico es el primer bacterio que invade los órganos de los cadáveres carbunclosos.

Brauell (32), en 1857, es el primero en comprobarlo y contrariamente a Rayer y Davaine (33), por una parte y Pollender (34), por la otra, creía que el bacilo del carbunco inmóvil, se hacía móvil, entre el tercero y cuarto día, después de la muerte. Los trabajos posteriores de Delafond (35), Davaine (36), Pasteur (37), Koch (38) y Pasteur, Chamberland y Roux (39), esclarecieron hasta la evidencia, estos puntos que se presentaban oscuros, en los prolegómenos de la historia de las enfermedades infecciosas.

No hagamos historia y bástenos con saber que el bacilo del carbunco, desaparece del organismo; es incapaz de esporular en él y sólo lo hacen aquellos que logran ponerse en contacto con el aire. Así, la sangre y las serosidades derramadas por las aberturas naturales, la abertura prematura de los cadáveres y el contenido intestinal (Ciuca y Tenea), colocan al *bacillus anthracis* en las mejores condiciones para esporular y bajo esta forma de vida latente, difundir el contagio y resistir a las diversas causas de destrucción natural.

De estas características biológicas del *bacillus anthracis*, Sívori (40), crea un método sencillo y práctico de profilaxia anti-carbunclosa. Aconseja taponear las aberturas na-

turales de los cadáveres con trapos o estopas embebidas en alquitrán o cualquier otro líquido antiséptico y esperar que los bacterios de la putrefacción consuman su obra de destrucción. El *bacillus anthracis* es destruido *in situ* y para completar esta destrucción, se hace uso de la cremación, pero cuando ya no existen tejidos blandos, que son siempre difíciles de destruir por el fuego.

Los bacilos encerrados en el organismo están condenados a desaparecer bajo la influencia de un proceso de destrucción aún mal conocido. Para Jacobstal y Pfersdorff el bacilo sufriría una especie de digestión, en cambio para Bongert, serían más bien fenómenos de plasmolisis o de plasmoptisis, en oposición a la opinión de Fischer, que piensa que el *bacillus anthracis*, es uno de los microbios no susceptibles de sufrir plasmolisis. Si a estos distintos criterios agregamos el de Fraenkel, Kostjurin y Krainski; que ven su destrucción como una consecuencia de la invasión de los cadáveres por los microbios anaerobios de la putrefacción y a sus productos de denutrición, llegamos al convencimiento de que es un punto de la biología del microbio imperfectamente conocida.

Sin que sea nuestro propósito dilucidar este proceso de destrucción bacilar, bástenos saber que la desaparición del *bacillus anthracis* del organismo, marcha en razón directa al proceso de descomposición cadavérica y que en el cadáver, esta descomposición marcha del centro a la periferia.

La destrucción de las formas vegetativas del *bacillus anthracis*, se inicia en el organismo hacia las 24 o 36 horas después de la muerte, observándose ya con el método de Gran-Nicolle, formas visiblemente granulosas, como si hubiera un principio de disgregación del protoplasma bacilar y denunciado sobre los bordes del bacilo, que aparecen como dentellados. En el examen de las cápsulas, hecho con el método de Raebigert, no se observa nada anormal, salvo el mismo principio de disgregación del protoplasma, observado con el método de Gran-Nicolle.

Mientras estas modificaciones se observan en *frotis*, preparados con sangre del corazón, pulpas hepáticas y espléc-

nicas, los mismos preparados hechos con sangre recogida de la vena auricular, muestran bacilos típicos y normales en su morfología.

El método de Raebigert (violeta de genciana, 10 grs.: formol comercial a 40 volúmenes, 90 c.c.) actuando de 30 segundos a un minuto, en *frotis* recientemente preparados y sin fijar, colora muy bien las cápsulas del *bacillus anthracis* de un color ligeramente rosado, que aparece como una ancha aureola, circundando el cuerpo bacilar coloreado en violeta oscuro y muy retraído por la acción del formol. Este cuerpo parece actuar en forma muy distinta sobre la cápsula y sobre el protoplasma bacilar. Mientras por su acción, éste se retrae, hasta el extremo de exigir un poco de hábito para distinguirlo, la cápsula en cambio, se expande, se hace más corpulenta y de un espesor mucho mayor al denunciado cuando se hacen coloraciones negativas (método de Burri) o cuando se emplea simplemente la fucsina fenicada o el Giemsa.

Cuarenta y ocho horas después de la muerte estos fenómenos de destrucción bacilar se hacen más evidentes, sobre todo en los preparados de hígado y bazo, en los cuales se observan bacilos cuyos eslabones presentan al protoplasma completamente desorganizado pero que alterna sin embargo, con eslabones de bacilos típicos y normales. El método de Raebigert, revela bacilos típicos aún, pero en estado avanzado de granulación y cápsulas vacías, sin el menor vestigio de protoplasma bacilar. Entre estos dos puntos opuestos, de *cápsulas con bacilos* y *cápsulas sin bacilos*, existe toda una serie de formas de transición, con porciones más o menos abundantes y más o menos granuladas de protoplasma que tiende a desaparecer. Se observa así, cadenas de cápsulas vacías, alternando con restos escasos de sustancia protoplasmática o bien con bacilos normales o casi normales.

Con el método de Gran-Nicolle, pero empleando como colorante de fondo, la fucsina diluída al quinto, se observan bacilos que a primera vista, podrían tomarse por bacilos que no toman el Gran, pero que en realidad son

cápsulas vacías, que no teniendo afinidad por el Gran, porque esta propiedad es sólo propia al protoplasma bacilar, aparecen coloreadas en rosa, por el colorante de fondo.

El examen de la sangre, muestra más o menos las mismas características, aunque con menos intensidad. La acción simultánea de los dos métodos de coloración, revela la aparición de algunos vibriones que aparecen intensamente coloreados en violeta por el método de Raebigert. Los cultivos aerobios tentados con sangre del corazón, pulpas hepática y esplécnica, resultan positivos y puros, no así los efectuados con corte de oreja, que por las dificultades de absorber con la pipeta una gota de sangre, se contamina en la mayoría de los casos. El examen microscópico de sangre de la marginal, muestra en este período, una menor metamorfosis de los elementos bacilares, que aparecen por lo general, ligeramente granuloso.

Hacia el tercer día, la pulpa esplécnica reducida a una papilla negruzca, hace el diagnóstico, sino imposible, por lo menos muy difícil. En el hígado, es a veces posible comprobar una que otra cápsula vacía o con restos de protoplasma bacilar, que hacen el examen muy difícil. Los cultivos, por lo general, o resultan muy impuros o dan resultados negativos. En la sangre, es aún posible formular un diagnóstico por la presencia de bacilos más o menos típicos, muy granuloso o disgregados o por la presencia de cápsulas vacías que son las que predominan en los preparados.

A los cuatro días después de la muerte, el diagnóstico formulado con pulpas esplélicas y hepáticas, es materialmente imposible y los cultivos dan siempre e invariablemente desarrollo de bacterios que no tienen nada de común con el *bacillus anthracis*. El examen microscópico, siempre laborioso, por no decir infructuoso, conduce a conclusiones dudosas, y los cultivos, a veces positivos, son siempre impuros, siendo lo más común que resulten negativos.

Todas estas modificaciones comprobadas en la destrucción del *bacillus anthracis*, corresponden a experiencias rea-

lizadas en conejos y cobayos, en épocas del año a temperatura fresca y se comprenderá que ellas no pueden tener nada de matemático y sólo son el fruto de experiencias múltiples y de las cuales hemos extraído como término medio, las conclusiones enunciadas.

Este fenómeno de destrucción bacilar, puede acelerarse sensiblemente en épocas del año de temperaturas elevadas, cuando la putrefacción se inicia prematuramente; en cambio lo inverso tiene lugar en las épocas de otoño e invierno, en que el mismo fenómeno reviste una marcha mucho más lenta. El conejo núm. 336, mantenido a una temperatura que osciló entre 27° y 33° Centígrados, a las 56 horas, no dió ni a los cultivos, ni al examen microscópico, vestigios de *bacillus anthracis* en ninguno de los órganos en que fué investigado (corazón, hígado, bazo). El cobayo núm. 338, sometido durante 50 horas a una temperatura que varió entre 25° y 33° Centígrados, nos dió al examen microscópico un resultado negativo y desde las 32 horas, la destrucción bacilar era marcadísima y los cultivos de bazo no dieron desarrollo. En las ovejas núms. 409 y 410 a las 24 horas el estado de destrucción bacilar era muy notable y a las 36 horas los cultivos, de todos los órganos fué negativo. La temperatura varió entre 25° y 27° Centígrados.

En cambio en los conejos núms. 226 y 235, es posible obtener colonias de carbunco entre las 96 y 120 horas, respectivamente, pero la temperatura había oscilado en estos casos, entre 9° y 22° Centígrados.

Los ejemplos podrían multiplicarse, pero bástenos llamar la atención sobre la necesidad de tener en cuenta en toda investigación de carbunco, no sólo el tiempo en que se ha producido la muerte, sino también la temperatura reinante.

Para adoptar un método era necesario conocer los mejores, a fin de compararlos entre sí y formarnos un juicio exacto de cada uno de ellos.

En experiencias aisladas y con material que por intermitencias nos llegaba al laboratorio a modo de consultas, sea en *frotis*, trozos de vena yugular ligada en ambos extremos, etc., hemos podido comprobar que estos materiales no pueden ser más inadecuados para investigar el carbunco. En cada uno de esos casos hemos tenido que evacuar dichas consultas y no sin cierta violencia, con la frase invariable de siempre: *No se encuentra carbunco, pero vacínese si se sospecha existencia.*

Contralorear todos los métodos preconizados hasta aquí, hubiera sido tarea interminable y perder nuestro tiempo lastimosamente. El desuso en que ellos han caído, revela hasta la evidencia que no son métodos prácticos.

Para nosotros, sólo los métodos de Strasburgo y de Ciuca y Stoicesco, tenían un valor positivo, puesto que son dos métodos diariamente utilizados en los laboratorios. Fueron ellos los que nos propusimos someter a un contralor riguroso.

Las bondades del método de Strasburgo, no podían ser puestas en duda. Todos los que lo hayan experimentado, estarán de acuerdo en que es un método inmejorable, ideal; pero estarán también con nosotros cuando decimos que no llena las condiciones de nuestro ambiente. La existencia efímera del *bacillus anthracis* en los cadáveres carbunclosos y nuestra forma intensiva de explotación ganadera, son dos factores que contribuyen poderosamente a que el método de Strasburgo fracase en la mayoría de los casos. El material debe ser recogido inmediatamente después de la muerte, de lo contrario resulta forzosamente un material inútil.

Con el método de Strasburgo clásico, tal como lo describen sus autores y con preparados extraídos de cobayos y conejos, muertos en el laboratorio por carbunco experimental, hemos iniciado una serie de experiencias a fin de comprobar hasta que tiempo después de la muerte, es posible recoger en las barritas de yeso un material aprovechable para una investigación ulterior.

Sobre barritas de yeso o tizas indistintamente, extraíamos material en las diversas etapas del proceso de la putrefacción, reuniéndolo de los líquidos y pulpas orgánicas y controlando esta extracción por los cultivos y el examen microscópico y en todos los casos comprobábamos que cuando estas dos últimas pruebas eran negativas, las barritas de yeso se mostraban impotentes a revelarnos la presencia de carbunco. Por simple lógica no podía ser otro el resultado, pues ausente la forma vegetativa e incapaz de esporular en el cadáver, no era posible esperar recoger un material que nos diera resultados positivos.

Toda vez que los cultivos eran realizados con el raspado de barritas de yeso, preparadas con material recogido de cadáveres en avanzado estado de putrefacción orgánica, eran cultivos que permanecían estériles o se cubrían por el desarrollo más o menos abundante de otros bacterios que no hemos identificado. En los mismos casos y siempre que hemos recurrido a inoculaciones de esos raspados a cobayos, las reacciones han sido por lo común negativas, salvo algunos casos, muertos por septicemia gangrenosa, debido a la presencia en las barritas de yeso, de esporos de vibrión séptico, que inyectados profundamente con otros bacterios, habían escapado a la acción destructora de los fagocitos.

De estas experiencias llegamos a la conclusión de que el método de Strasburgo será eficaz, cuando el material sea recogido antes que la forma vegetativa desaparezca de los cadáveres. Pero, como el *bacillus anthracis* desaparece en determinados casos en un tiempo demasiado rápido, resulta que el material recogido por este método, ha de resultar con demasiada frecuencia un material insuficiente.

En cambio, cuando el material es recogido inmediatamente después de la muerte o en cadáveres en los cuales existía aún el *bacillus anthracis*, será un material eficaz para revelar en cualquier momento la presencia de carbunco.

Los esporos conservan su vitalidad y virulencia durante muchos años. En nuestro laboratorio conservamos tizas preparadas, hace cinco años por los alumnos del curso de

enfermedades contagiosas que dicta el Dr. Sívori, con sangre carbunclosa y con ellas obtenemos cultivos característicos dotados de su virulencia inicial.

El empleo de barritas de yeso o de tizas comunes de escuelas previamente humedecidas con caldo, con agua u orina simplemente, nos ha parecido indiferente.

Nosotros, a indicación del Dr. Sívori, humedecemos las tizas en la orina contenida en la vejiga del mismo animal y los resultados han sido positivos. La orina de los herbívoros, da a las tizas un ambiente favorable a la esporulación ulterior, con las cuales se obtienen más tarde cultivos característicos. El caldo o el agua con que se indica humedecer las tizas, se subsana con esta ligera modificación en la recolección del material. Humedecidas las tizas con la orina de la persona que recoge el material, los resultados son también favorables. El método del Dr. Sívori de humedecer las tizas con la orina, está basado en la observación de Pasteur y Joubert (13), de que la orina es un medio de cultivo para el *bacillus anthracis*.

En ciertos laboratorios se identifica el *bacillus anthracis* por la reacción tintoreal, su morfología y las reacciones culturales. Si bien es cierto que estas reacciones son lo suficientemente características para identificarlo, conviene no obstante, completar las investigaciones por medio de las inoculaciones a animales receptivos, a fin de evitar una confusión posible con los bacilos descritos por Hueppe y Wood (41), por Lutz (42), y Ziker (43), y cuyos caracteres permiten clasificarlos en el grupo de los *bacilos anthracoides*. Estos bacilos han sido aislados de muestras de aguas diversas, circunstancia que hace más posible tropezar con ellos en las investigaciones de carbunco, máxime cuando se hace uso de barritas de yeso humedecidas previamente en agua, no siempre pura. Lo mismo podría decirse de los *bacilos pseudo-anthracis* de Burri (44), y de Hartleb y Stutzer (45), encontrados en los polvos de varias muestras de carne, del *bacilo anthracis similis* de Mac-Farland (46), aislado del pus de un absceso bovino y de los bacilos *B.* y *C.* de Ottolengui (47).

En cuanto al método de Ciuca y Stoicesco, sugerido por el contagio que los cueros difunden en las personas encargadas de manejarlos, nos ha dado resultados tan contradictorios, que no nos atrevemos aconsejarlo como un método práctico. El método muy sencillo en sí, consiste en calentar a 70° C. y durante 30 minutos el producto del raspaje de las pieles sospechosas, previamente desecadas, con el cual se siembran luego, tubos de agar-agar, o se inoculan animales receptivos. La indicación de Tanner y Norman Hall (48), que prefieren la utilización del agar-agar y no el del caldo para la germinación de esporos, no la encontramos justificada, puesto que en nuestras experiencias no hemos observado la más pequeña diferencia en el desarrollo del *bacillus anthracis*. La única ventaja que reconocemos a los medios sólidos, es la facilidad con que se pueden aislar las colonias; que por lo común crecen junto a otras de determinados bacterios que no ha sido posible destruir por el calentamiento a 70° C.

La presencia de esporos en las pieles, crines, lanas de animales muertos por carbunco no es dudosa y muchas experiencias lo comprueban a la evidencia. El contagio de las personas encargadas del acarreo de estos cueros, es harto frecuente y no puede explicarse sino por la presencia en estos cueros de esporos carbunclosos. Glynn y Lewis (49), revelan la presencia de esporos en un 21,3 % de las muestras sospechosas examinadas y utilizan el cobayo como medio revelador. Gaillot (50), siguiendo el método de Pasteur, aísla el *bacillus anthracis* de sangre y carnes desecadas destinadas a abonos e imperfectamente esterilizadas y Seymour Jones (51), utiliza el raspaje de las pieles, para inyectar cobayos y controlar así su método de esterilización de cueros.

Los resultados que hemos obtenido con este método en el laboratorio, han sido tan opuestos, que en ciertos casos y con idéntico material llegabamos a conclusiones opuestas.

Los tubos de agar-agar, sembrados con el raspaje de las pieles procedentes de animales muertos por carbunco auténtico, daban algunas veces colonias características,

pero por lo general eran rápidamente invadidas por el desarrollo de otros bacterios que hacían toda observación posterior imposible. Las inoculaciones subcutáneas eran a menudo inactivas, ya sea por la ausencia de esporos, o por la acción antagónica de otros bacterios inyectados con un material forzosamente contaminado. Al lado de algunas reacciones positivas hemos registrado algunos casos de septicemia, sobre todo cuando hemos empleado un material de inoculación, demasiado contaminado.

Estos resultados eran el fruto de experiencias verificadas con materiales recogidos en los primeros días que seguían a la muerte y con pieles extraídas con la mayor asepsia posible, para evitar su contaminación con esporos de otro origen.

El esporo existe indiscutiblemente en estos cueros, pero lo difícil es obtener de él cultivos en una forma constante. Nosotros creemos que las asociaciones microbianas traban su desarrollo en los medios artificiales o modifican su virulencia, cuando se les inocula. Los resultados obtenidos por Glynn y Lewis y Seymour Jones, no tienen más que un valor relativo, puesto que ellos experimentaban con cueros de origen desconocido y no podían por lo tanto tener en cuenta más que los resultados positivos. Además, sus experiencias se efectuaban en cueros extraídos poco tiempo después de la muerte, sin cuya condición, no hubieran podido ser utilizados industrialmente.

Esos cueros extraídos cuando la forma vegetativa del *bacillus anthracis*, existía aún en el organismo, debían al encontrarse perfectamente aereados, producir esporos. Pero los cueros extraídos mucho tiempo después de la muerte, debían darnos resultados negativos, a no ser de que hiciéramos uso de porciones de pieles contaminadas por los derrames que se producen por las aberturas naturales.

Hemos extraído porciones de pieles del dorso de cadáveres que no habían sido abiertos y cuando ya no existían vestigios del *bacillus anthracis* en ninguno de los órganos y en todos estos casos, no hemos obtenido una sola vez una colonia de carbunco.

En cuanto al método de Ciuca y Stoicesco no lo hemos investigado porque después de algunos días de producida la muerte, el tubo intestinal es desorganizado completamente por el fenómeno de la putrefacción.

Tal vez fuera más práctico que estos dos últimos métodos, investigar por la antigua técnica de Pasteur los esporos contenidos en el producto de los derrames de las aberturas naturales, que siempre se encuentran al lado de los cadáveres.

En fin, el método de Ascoli no ha sido investigado por la falta material de tiempo y por las dificultades con que hemos tropezado para proveernos de un buen suero precipitante.

MÉTGO DO DE WULFF.

Un excelente método es el preconizado por Wulff (52), y que consiste en extraer el material carbuncloso de la médula de los huesos de los animales muertos por carbunco. Bien impresionados por los trabajos de dicho autor, creíamos que sus conclusiones podían ser aprovechables en nuestro país, donde por su grande extensión, los materiales llegan a los laboratorios, muchos días después de su extracción del cadáver. En este sentido dirigimos nuestras investigaciones y las experiencias siguientes no pueden ser más concluyentes.

Al mismo tiempo que investigábamos la presencia del *bacillus anthracis* en los demás órganos, proseguíamos nuestras experiencias buscándolo en las diversas médulas de los huesos.

Para ello seguíamos el mismo plan trazado, es decir, que en épocas diferentes de la putrefacción, recogíamos material de médulas distintas de conejos y ovinos, las cuales las controlábamos por el examen microscópico y por la siembra en tubos comunes de agar-agar.

El examen microscópico era efectuado simultáneamente en dos preparados, con el método de Gran-Nicolle y el

método de Raebigert, respectivamente. Por más que este examen era siempre insuficiente, lo creíamos útil para darnos cuenta de la desaparición del bacilo y de la presencia del vibrión séptico y otros bacterios.

Wulff, seguía en sus investigaciones casi el mismo método, pero con la diferencia que empleaba el Giemsa en sustitución del Raebigert. Nosotros habituados a este último método, lo preferimos y que para la finalidad que nos proponíamos, no era sino un detalle.

En los muchos exámenes de médula que hemos practicado con ambos métodos, hemos recogido la experiencia que tratándose de médula, siempre es difícil llegar a una conclusión determinada.

El Raebigert y el Giemsa que tan bien colora las cápsulas en los *frotis* de los demás líquidos y pulpas orgánicas, da siempre en las de médulas, resultados negativos.

Los exámenes aislados de estas médulas, aún combinando los dos métodos de coloración indicados, resulta por lo general un trabajo infructuoso. No obstante, cuando se examinan sucesivamente, las médulas de un mismo animal y de 24 en 24 horas, se observa que a medida que los exámenes son más alejados al día de la muerte, la médula va adquiriendo un mayor tenor de bacterios. Es así que en los primeros exámenes sólo se encuentra uno o dos bacterios por campo y no es raro que sea necesario recorrer varios campos para encontrar algunos. Son bacterios que responden más o menos al tipo del *bacillus anthracis*. Pero en los exámenes sucesivos, estos bacterios van aumentando diariamente y en forma tal, que es imposible a veces diferenciarlos entre ellos. Sería fácil tomarlos todos por bacilos del carbunco y cometer así un error.

En efecto, este aumento sucesivo de formas microbianas que toman el Gran, semejantes al *bacillus anthracis*, debe mirarse como una irupción del vibrión séptico, puesto que los cultivos aerobios, denotan una tendencia marcada a permanecer estériles a medida que esta invasión va siendo mayor. Por otra parte, el examen microscópico da

una riqueza extraordinaria de estos bacterios y en los cultivos aerobios desarrolla sólo un bacilito pequeño que no toma el Gran. Se trata pues, de un microbio anaerobio y que toma el Gran: puesto que no obstante su aumento sucesivo en la médula, no desarrolla en los medios aerobios comunes. Para hacer más difícil este examen, parece que el vibrión séptico se muestra en la médula más bien en formas cortas.

De lo que antecede hemos llegado a la convicción que el examen microscópico carece en estos casos de todo valor y hasta creemos oportuno omitirlo completamente.

No sucede lo mismo con los cultivos. Haciendo una sección transversal de un hueso largo, esterilizando a la llama la superficie de sección y recogiendo con una pipeta una regular cantidad de médula, que se lleva luego a un tubo de agar-agar inclinado, da a las 18 o 24 horas, cultivos puros y característicos del *bacillus anthracis*. Estos cultivos se obtienen puros, 7, 9, 10 y 12 días después de la muerte y de un día para otro, es común que el *bacillus anthracis* desaparezca bruscamente y sea sustituido por un bacilito casi constante, grumoso que, no toma el Gran y que reúne algunos de los caracteres del *coli* común.

En la mayoría de los casos conviene al esterilizar la superficie del corte, calentar ligeramente el resto del hueso, para hacer a la médula más fluida y facilitar así su ascensión en la pipeta, como lo mismo, recoger la mayor cantidad posible de semilla para asegurar la fertilización de los tubos de agar-agar, máxime cuando se trata de extracción de material cuya remisión data ya de algunos días.

Las médulas de conejos son fáciles de triturarlas en el líquido de condensación de los tubos de agar-agar, no sucediendo lo mismo cuando se utilizan médulas procedentes de bovinos u ovinos. En estos últimos conviene calentar ligeramente toda la superficie del hueso, la pipeta y la porción del tubo opuesta a la superficie del medio de cultivo, a fin de que la médula sea sembrada casi líquida y pasearla así por toda la superficie del agar-agar. Si no

se sigue esta técnica los escasos bacilos que existen quedan incluidos en el interior de un block indurado, de sustancia grasa y se expone a no tener, sino, resultados negativos. Debe comprenderse que este calentamiento debe ser muy moderado, sin lo cual se harían perecer los bacilos.

Los cultivos obtenidos por siembras de médulas, de acuerdo con la técnica que antecede, es común que no den esporos en el tiempo establecido, pero este carácter no es constante. Es posible que las sustancias grasas retarden la formación de esporos.

Tal vez por la misma razón, las tizas que hemos pretendido preparar con médulas no diluidas, nos han dado resultados que no son constantes. Sin embargo, cuando se tiene la precaución de facilitar la impregnación de las tizas, triturando y diluyendo previamente las médulas en agua, caldo u orina; es fácil poner en evidencia el *bacillus anthracis*.

Dentro de la misma especie animal, hemos observado que la médula de los diversos huesos largos se comportan más o menos igual y que cualquiera de ellos, indiferentemente, puede servir de semilla.

En cambio, cuando se investiga con médulas procedentes de especies animales distintas, se llega a la convicción que no todas dan idénticos resultados y que en unas la destrucción del *bacillus anthracis* es más rápida que en otras.

Las médulas de los ovinos núms. 409 y 410 nos revelan la presencia de carbunco hasta las 252 horas después de la muerte; en cambio en la de los conejos núms. 411 y 412 han dado resultado hasta las 156 horas solamente. Estas experiencias que demuestran una diferencia de cinco días de mayor persistencia bacilar en las médulas de los ovinos, son perfectamente comparables, por cuanto los conejos y ovinos mencionados, murieron en una misma época y estuvieron sometidos después a idénticas condiciones de ambiente. La destrucción medular es más rápida en los conejos que en los ovinos y a esta desorganización prematura, atribuimos la desaparición más precoz de los bacilos.

En las médulas de huesos de bovinos, no nos ha sido posible efectuar experiencias por carecer de material adecuado; no obstante puede admitirse *a priori* que estas médulas deben resultar excelentes. Los cortes de huesos de bovinos que nosotros hemos practicado, nos han demostrado que las médulas se conservan admirablemente y tal vez en mejores condiciones que las de ovinos y si a esto agregamos que las experiencias de Wulff se refieren todas a bovinos, con cuyas médulas obtiene cultivos, hasta 29 días después de la muerte dejaremos demostrado que no es aventurado admitir *a priori*, las bondades de las médulas de esta especie.

A fin de colocarnos dentro de las condiciones habituales de la práctica, hemos investigado también la persistencia bacilar en la médula de los huesos que habían sido separados del cadáver, en épocas diferentes del proceso de la putrefacción.

Encontrándose las médulas perfectamente protegidas contra las contaminaciones de origen exterior, creímos que, fuera del organismo podían conservarse mejor, máxime si eran separadas del cadáver inmediatamente después de la muerte.

Sin embargo, no ocurre así. Estas médulas se contaminan al mismo tiempo que las médulas que permanecen adheridas al cadáver y hasta se observa que es la misma flora microbiana la que suplanta al *bacillus anthracis*, (médulas de los conejos núms. 254, 264, 307, 411 y ovinos 409 y 410).

No siendo posible admitir la infección de origen sanguíneo puesto que se trata de médulas extraídas cuando aún se obtenían cultivos puros de la sangre o de médulas, era necesario ver el génesis de estas infecciones en los bacterios del aire que contaminan los huesos en el momento de sus extracciones y que luego harían irrupción en la médula, penetrando por sus propios movimientos al través de los canales de Havers; o una infección latente de la médula desde la muerte del animal. Tal vez exista

aquí un amplio campo de investigación para estudiar la forma de destrucción del *bacillus anthracis*.

Las tentativas hechas en diversas oportunidades para obtener la esterilización superficial de los huesos, han fracasado.

EXPERIENCIAS.

Conejo núm. 254—A las 36 horas se constata al microscópio la presencia de *bacillus anthracis* en la sangre, hígado, bazo y médula, corroborado a la vez por el desarrollo típico en tubos de agar-agar.

A los tres días y medio o sea a las 84 horas, el examen de sangre da bacilos granulosos, cápsulas vacías y otras con restos de protoplasma y vibrión, pero que permite aún hacer un diagnóstico de carbunco. El examen microscópico de hígado y bazo, es dudoso a causa de la invasión de muchos bacterios, algunos de ellos esporulados en la extremidad. A las 108 horas, examino médula y observo bacilos escasos, que toman el Gran (3 o 4 por campo) y en los que no es posible observar la presencia de una cápsula. Los cultivos dan desarrollo característico y puro. A las 132, 156 y 180 horas, iguales resultados. De este conejo se separan del cadáver a las 36 horas, las tres médulas restantes, que se examinan a los 8, 11 y 18 días, solo con resultados positivos a los ocho días. Las dos restantes fueron negativas. Durante esta experiencia, predominaron días templados (15° y 24° C).

Conejo núm. 264—A las 48 horas y al examen microscópico, se encuentran bacilos típicos en la sangre e hígado, no así en el bazo, que se halla muy modificado. Los cultivos dan desarrollo puro de *bacillus anthracis*, a excepción del bazo, que queda estéril. El examen de médula da pocos bacilos que toman el Gran, pero los cultivos son lujuriantes y puros. A los diez días de la muerte se hace cultivos en agar-agar, con una médula retirada del cadáver a las 48 horas y desarrolla carbunco típico y puro. La misma experiencia repetida con una médula retirada del cadáver a las 72 horas, es negativa. La misma experiencia realizada a los 12 días con médula extraída a las 48 y 72 horas, después de la muerte, da también resultados negativos. La temperatura varía en el curso de esta experiencia de 15° a 19° C.

Conejo núm. 622—A las 43 horas de la muerte se hace examen microscópico de sangre del corazón derecho, hígado y bazo, haciendo uso simultáneamente de los métodos de Gran-Nicolle y de Raebigert. Existen *bacillus anthracis* típicos, pero muchos de ellos ya granulosos. El examen de sangre de la auricular, revela bacilos típicos sin la más ligera modificación. Los cultivos efectuados desarrollan a las 18 horas puros y característicos. A las 96 horas, el examen microscópico es muy dudoso, por la invasión de vibrión séptico. Existen cápsulas coloreadas

por el Raebigert y bacterios esporulados (vibrión). Los cultivos de sangre del carazón izquierdo, dan aún desarrollo de colonias típicas de carbunco, pero impuras, no así los cultivos de bazo e hígado que resultan negativos. El examen de la médula de la tibia, efectuado a las 96 horas, es dudoso y la diferenciación de cápsula y bacilo, no es revelable por el método de Raebigert. Existen escasos bacilos que toman el Gran de difícil identificación al *bacillus anthracis*. Los cultivos efectuados desarrollan puros a las 24 horas. A las 120 horas se hace un nuevo examen microscópico de otra médula, y los resultados son los mismos, pues persiste la misma duda, que se disipa con la obtención de cultivos de un desarrollo característico. A las 24 horas después o sea a las 144 horas de la muerte, se observa un mayor número de bacilos que toman el Gran, por cada campo examinado y es imposible al microscopio establecer diferenciación entre el bacilo del carbunco y el vibrión, por cuanto son formas cortas de bacilos, las que predominan. Sin embargo, dado el abundante número de bacilos que se observa por campo, en oposición al escaso número observado en las primeras horas, es posible sospechar la invasión de la médula por el vibrión séptico. El examen cultural, corrobora esta sospecha, pues se obtiene solamente desarrollo puro de *bacillus anthracis*. Doce horas después o sea a las 156 horas, el aumento de vibriones es aún mayor, pero los cultivos desarrollan puros. Esta experiencia no pudo ser continuada. La temperatura durante seis días y medio que duró la experiencia, se mantuvo entre 9° y 21° C., con tendencias diarias a ascender.

Conejo núm. 336—A las 56 horas, el examen microscópico muy dudoso o negativo. En la sangre, hígado y bazo, observo una flora microbiana abundante y variada. Los cultivos de estos mismos órganos no dan desarrollo de una sola colonia de *bacillus anthracis*. El cultivo de la médula de fémur, da desarrollo puro de carbunco. A las 80 horas, o 24 horas después, siembro una nueva médula y obtengo cultivo puro. Otra médula sembrada a los ocho días, no desarrolla carbunco. Durante el transcurso de esta experiencia, la temperatura osciló entre 27° y 33° C.

Conejo núm. 307—A las 68 horas se examina sangre del corazón por el Gran y el Raebigert y las conclusiones son muy dudosas, duda que se aumenta aún al examen del bazo e hígado, pues existen en estos dos órganos, bacterios extraños y es difícil constatar carbunco típico o cápsulas. El cultivo de sangre, da colonias de carbunco junto con un bacilo que no toma el Gran. El examen microscópico de la médula, siempre dudoso, pues no es posible poner las cápsulas de manifiesto, da a los cultivos desarrollo puro. Se extraen en esta época, dos médulas que se examinan quince días después y no se encuentran *bacillus anthracis* en las formas diversas que desarrollan. La temperatura osciló entre 17° y 23° C.

Conejo núm. 354—A las 84 horas, las siembras de agar-agar efectuadas con sangre, hígado y bazo, no dan desarrollo de carbunco. La médula de

radio, da un cultivo puro. A las 154 horas obtengo cultivos puros y a las 178 horas resultados negativos. La temperatura en los tres intervalos de esta experiencia, varió entre 19° y 24°, 18° y 27°, y 18° y 25° Centígrados.

Conejo núm. 282—A las 64 horas de la muerte, se constata carbunco por examen microscópico de sangre de la vena marginal de la oreja. A las 86 horas y con una temperatura que varía entre 23° y 27° C., se extrae material del corazón, hígado y médula de la tibia. Sólo esta última da desarrollo de carbunco puro. En los cultivos de sangre, sólo se encuentra un bacilito pequeño, que no toma el Gran y que es frecuente observarlo cuando desaparece el *bacillus anthracis*. El cultivo de médula no esporula, aún después de 72 horas de sembrado en agar-agar. A las 110 horas y con una temperatura que oscila entre 19° y 21° C., se siembra otra médula que también da desarrollo a *bacillus anthracis* asporulado. A las 158 horas se siembra otra médula que de desarrollo impuro y a las 182 horas, otra con resultado negativo, habiendo variado la temperatura en estas últimas 48 horas, entre 18° y 23° C.

Conejo núm. 235—A las 96 horas de la muerte se hace el examen microscópico de sangre del corazón izquierdo, bazo e hígado y las conclusiones son muy dudosas por la presencia de vibrión séptico y de otros bacterios diversos que han invadido sobre todo el bazo y el hígado. Los cultivos dan resultados negativos para estos dos órganos, pero positivo para la sangre. A las 120 horas se hace un cultivo con sangre extraída del corazón izquierdo y se obtienen aún cultivos de carbunco; lo mismo que otro tubo de agar-agar sembrado con médula extraída de un fémur. El examen microscópico de médula, con el método de Gran revela bacilos coloreados en violeta que pueden tomarse por carbunco, así como por vibrión. El método de Raebigert no da cápsulas. Se hacen cultivos de otras médulas nuevas a las 144 y 168 horas, obteniéndose siempre cultivos puros; pero a las 192 horas, el bacilo del carbunco desaparece bruscamente de la médula y es reemplazado por un bacilito corto, que no toma el Gran y da la impresión de un cultivo puro. La temperatura oscila en las 192 horas que duró la experiencia, entre 8° y 21° C. y en las últimas horas ascendió hasta 30° C., para descender nuevamente.

Conejo núm. 262—A las 96 horas, los cultivos practicados con sangre del corazón, dan desarrollo puro de *bacillus anthracis*; los de hígado permanecen estériles y los de bazo dan desarrollo a formas diversas de bacterios. La temperatura osciló en esas 96 horas entre 18° y 25° C. A las 120 horas y con una temperatura de 18° a 20° C., se practica siembra de una médula que al día siguiente da desarrollo puro. A las 144 horas, con una temperatura de 19° a 22° C., se practica la misma experiencia, con otra médula obteniendo también un cultivo puro. A las 168 horas, con una temperatura más o menos igual se obtiene un cultivo puro de otra médula. A las 216 horas y con una temperatura un poco más elevada (23° a 25° C.) desarrolla carbunco, pero impuro. A las 240

horas, las siembras de médulas resultan negativas, como así mismo, unos tubos de agar-agar sembrados con triturados de la parte esponjosa de un fémur.

Conejo núm. 395— A las 96 horas de la muerte y con temperatura que osciló entre 18° y 22°, 18° y 23° y 18° y 21° C., se hacen cultivos con médulas de un fémur y se obtiene desarrollo puro asporulado. A las 192 horas, se hace un nuevo cultivo que no da bacilo de carbunco. Sólo se encuentra un pequeño bacilito que no toma el Gran.

Conejo núm. 355—A las 108 horas, siembro médula de tibia y desarrolla carbunco típico y puro. A las 132 horas desarrolla carbunco pero impuro y a las 152 horas no se obtiene carbunco. La temperatura osciló en estos tres intervalos, entre 19° y 26°, 18° y 26° y 19 y 28 centígrados.

Conejo núm. 239—Se le deja ocho días o sea 192 horas a la temperatura del laboratorio que osciló en esos días entre 13°, 19° 26° y 27° C. El examen y cultivos de sangre del corazón, hígado y bazo, son negativos. El examen de médula, es dudoso, por cuanto es imposible poner de manifiesto las cápsulas y por ser muy abundantes los bacilos que se observan por campo, pero los cultivos dan desarrollos puros y característicos. Se hacen nuevos cultivos de otras médulas a las 216 y 240 horas y el desarrollo es puro. A las 264, desarrolla impuro y no desarrolla a las 288 horas.

Conejo núm. 240—Permanece cubierto en el laboratorio durante 15 días y la temperatura osciló entre 12° y 27° C. Los cultivos de sangre, hígado y bazo, no dan desarrollo al bacilo del carbunco, pero sí a otras numerosas formas microbianas. De las médulas, que apenas existen vestigios, los resultados son idénticos.

Las experiencias correspondientes a los ovinos 409 y 410 y a los conejos 411 y 412 fueron efectuadas simultáneamente a fin de obtener resultados que pudieran ser perfectamente comparables. Las temperaturas, durante el tiempo que duraron estas experiencias, oscilaron entre 18° y 24°, 18 y 21°, 17° y 21°, 16° y 21°, 17° y 19°, 14° y 17°, 17° y 19° y 14° y 17° C.

Conejo núm. 411—A las 36 horas de la muerte se hace cultivo de médula y se obtiene desarrollo puro de carbunco. A las 108 horas, otra médula da cultivo puro. A las 132 horas se obtiene carbunco asporulado e impuro. A las 156 horas se obtienen nuevos cultivos de médula pero con escasos bacilos del carbunco y gran desarrollo de un bacilito pequeño que no toma el Gran.

A dos huesos largos, extraídos del cadáver pocas horas después de la muerte, se le extraen los tejidos blandos y se le sumerge luego durante dos minutos en una solución saturada de bicloruro de mercurio, conservándolos en el ambiente del laboratorio, envueltos en papel esterilizado. Con uno de ellos se hace cultivos a las 156 horas después de la muerte y se obtiene carbunco impuro, unido al mismo bacilito que no toma el Gran de la siembra anterior. A las 204 horas, se

repite la experiencia con el otro hueso, pero no se obtiene desarrollo de carbunco.

Conejo núm. 412.— A las 108 horas de la muerte, se obtienen cultivos puros de médula, pero asporulados. A las 132 horas, se repite la experiencia con otra médula y da también desarrollo de carbunco pero esta vez impuro. A las 156 horas, persiste aún el desarrollo, pero a las 204 horas, no se encuentran vestigios de carbunco.

Oveja núm. 409.— Pocas horas después de la muerte, se constata carbunco por el examen microscópico de sangre extraída de una vena marginal. A las 36 horas el examen microscópico practicado por los alumnos de cuarto año, no permite establecer la existencia de carbunco, por cuanto todos los órganos han sido invadidos por bacterios variados de la putrefacción. El examen de la oreja conduce a conclusiones dudosas y los cultivos practicados con sangre, hígado y bazo, dan resultados negativos. La médula en cambio, da desarrollo de carbunco puro. A las 60 horas, se obtiene de otra médula un cultivo purq. Se repite la experiencia con otras médulas a las 108, 132, 156 y 204 horas y con todas se obtienen un desarrollo puro de carbunco.

Con médula de radio extraída a las 156 horas y conservada en el laboratorio 72 horas más, es decir; a las 228 horas después de la muerte, se obtienen cultivos impuros de carbunco.

Con médula de húmero extraída también a las 156 horas y conservada en el laboratorio 120 horas más, es decir, a las 276 horas después de la muerte, no se obtiene carbunco.

Oveja núm. 410.—A las 228 horas después de la muerte, se obtiene desarrollo puro de carbunco, a las 252 horas desarrolla impuro y a las 276 horas no se encuentra carbunco.

CONCLUSIONES.

La presencia del *bacillus anthracis* en los animales muertos por carbunco, puede ser puesta en evidencia:

I. EN LOS CONEJOS.

- a) Por cultivos de la sangre del corazón izquierdo después de las 36 horas de la muerte hasta las 120 horas.
- b) Por cultivos de la médula de los huesos largos, desde los seis y medio días hasta los once días después de la muerte.

II. EN LOS OVINOS.

- a) Con una temperatura ambiente de 18° a 24° C. no se encuentra *bacillus anthracis* a las 36 horas después de la muerte, en la sangre y pulpa de los órganos de la cavidad torácica y abdominal.
- b) Por cultivos de la médula de los huesos largos, se pone en evidencia la existencia del *bacillus anthracis* entre los ocho y medio, nueve y medio y diez y medio días, después de la muerte.

El método de Strasburgo o el del empleo de las simples tizas, puede ser reemplazado con ventajas por el procedimiento del Dr. Sívori—tizas humedecidas primero con la orina del animal que se necropsia o con la de la persona que recoge el material y después en la sangre de una vena periférica.

Dado que la mayoría de los métodos preconizados hasta hoy, dejan un vacío enorme que crea grandes dificultades en la práctica, pues cuando no se encuentra carbunco en las muestras examinadas no es posible negar su existencia, por cuanto el *bacillus anthracis* pudo haber desaparecido antes de recojerse el material o bien después de recogido, y que el método de Wulff tiene sobre los demás la ventaja de permitir formular un diagnóstico en un sentido o en otro, siempre que se tenga en cuenta la fecha de remisión y el estado en que se encuentra la médula, aquellas hacen de este método uno de los medios más seguros de recolección de materiales.

Creando que la implantación sistemática de un buen método de recolección de materiales para el diagnóstico del carbunco aportaría grandes beneficios a la profilaxia

anti-carbunclosa y por consecuencia a nuestra ganadería, nos permitimos aconsejar el procedimiento siguiente:

I. Cuando se trate de recoger materiales de un animal, antes de las 24 horas de producida la muerte, humedéscase una tiza en la orina del propio animal y despues en la sangre de una de las venas del cuello (yugular); déjese secar; envuélvase en papel y remítase al laboratorio.

Adjúntese además un metacarpiano o metatarsiano (hueso de la canilla) extraído desarticulándolo y sin cuero, envuélvaselo en varios dobleces de papel y remítase conjuntamente con la tiza.

II. Si han transcurrido más de 24 horas después de la muerte, no se remita tiza con sangre, sino tan sólo un metacarpiano o metatarsiano.

III. La remisión de huesos puede hacerse aún después de más de seis días de muerto el animal.

IV. Si entre el momento de la muerte y la llegada de los materiales al laboratorio transcurrieran más de 12 días, extráigase un hueso largo—aún después de ocho días de muerto el animal;—córtese transversalmente por la mitad, revuélvase la médula, échese en ella un poquito de orina y una vez que se haya obtenido una masa líquida, humedézcase en ésta una tiza, déjesela secar y remítase para el análisis.

Nota: Estando este trabajo en corrección de la segunda prueba, llega a nuestras manos el núm. 5 del *Boletín Mensual de Informaciones Agrícolas y de Patología Vegetal*, de Roma, de Mayo del presente año, el cual analiza un trabajo del Dr. K. Girabert publicado recientemente y titulado: *Determinación de la presencia de gérmenes del Carbunco hemático en la médula de los huesos* (*Zeitschrift für Infektionskrankheiten parasitäre Krankheiten und Hygiene der Haustiere* T. 16, Fasc. 5, Pág. 324, 25 de Mayo de 1915). La conclusiones a que llega dicho autor, son muy semejantes a las nuestras. Mas aún, operando con médulas de bovinos y ovinos, en invierno obtiene por lo general, cultivos puros hasta después de 2 o 3 semanas de producida la muerte.

El autor llega a deducir que el método de examen de la médula de los huesos para la comprobación bacteriológica del carbunco, constituye un medio seguro para demostrar la existencia del germen de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) SCHIPP. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, núms. 6 y 7.
- (2) WULFF. *Zeitschrift für Infektionskrankheiten, parasitäre Krankheiten und Hygiene der Haustiere*. Página 270, número 3, tomo XII, año 1912.
- (3) HOSANG. *Arch. für wissenschaftl. u. prakt. Tierheilk.* Pág. 369, tomo 28.
- (4) FISCHOEDER. *Zeitschrift. d. Veterinärhygiene*. Año 1903.
- (5) PREUSSE. *Berliner Tierärztliche Wochenschrift*. Pág 855, año 1905.
- (6) CARL. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. Pág. 289, núm. 29.
- (7) BONGERT. *Bakt. Diagnostik*. Página 156, año 1908.
- (8) OLT. *Berliner Tierärztliche Wochenschrift*. Pág. 311, núm. 18, 1907.
- (9) SZASZ. *Zeitschrift für Infektionskrankh. usw. der Haustiere*. Página 43, tomo XI.
- (10) FRANKE. *Zeitschrift für Fleisch—u. Milch—Hyg.* Año 14.
- (11) HITZIG, EPPINGERT Y HUTYRA. *Zeitschrift für Infektionskrankh. usw. der Haustiere*. Página 49, tomo XI.
- (12) STEFFENHAGEN Y ANDREJEW. *Arb. a. d. Kais. Gesundh.* Página 221, tomo XXXVI, año 1910.
- (13) PASTEUR Y JOUVERT. *C. Rendus de l'Acad. des Sciences*. Página 900, tomo LXXXIV, año 1877.
- (14) BUSSON. *Centralblatt für Bakteriologie*. Página 505, tomo LVIII, año 1911.
- (15) MARXER. *Zeitschrift für Fleisch—u. Milch Hyg.* Fasc. 5, año 15.
- (16) JACOBSTHAL Y PFERSDORFF. *Zeitschrift für Infektionskrankheiten. usw. d. Haustiere*. Página 102, tomo I.
- (17) QUEVEDO. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, La Plata*. Página 45, tomo VIII, año 1911.
- (18) BOTTINO. *Tesis*. La Plata, año 1911.
- (19) CASTRO. *Tesis*. Buenos Aires, año 1913.
- (20) VALENTINI Y ORLANDO. *Revista de Zootecnia*, núm. 57, año 1914.
- (21) SCHULLER. *Zeitschrift für Infektionskrankh. usw. der Haustiere*. Página 1, tomo V.
- (22) GRABBERT. *Zeitschrift für Infektionskrankh. usw. der Haustiere*. Página 238, tomo VII, año 1910.
- (23) FOTH Y WULFF. *Zeitschrift für Infektionskrankh. usw. der Haustiere*. Tomo 8, fascículo I.
- (24) GARAGUSO. *Cita de Valentini y Orlando*. (Loc. cit.).
- (25) MULLER Y ENGLERT. *Zeitschrift für Infektionskrankh. usw. der Haustiere*. Página 346, tomo VIII, año 1910.
- (26) MAZZINI. *Archivio Scientifico della reale Società ed Accademia Veterinaria italiana*. Página 97, Julio y Agosto, 1907.

- (27) BOZELLI, *Il moderno Zoviatro*. Página 382, Setiembre de 1912. *Annali de Staz. esp. per. le mal. infect. de Bestiame*. Pág. 171, t. I.
- (28) CIUCA Y STOICESCO, *Societé de Biologie*. Página 140, tomo LXVII, año 1909. *Archivo Veterinara*. Página 71, año 1909.
- (29) PFEILER, *Arch. für wiss. u. prakt. Tierheilk.* Tomo 38, año 1912.
- (30) CIUCA Y TENEA, *Comptes Rendus de la Societé de Biologie*. Tomo LXVII, año 1909.
- (31) ASCOLI, *Lo stato attuale della reazione precipitante nel carbonchio emático*. Milan, año 1911.
- (32) BRAUELL, *Virchow's Arch. f. path. Anat.* Página 131, tomo XI, año 1857.
- (33) RAYER Y DAVAINÉ, *Comptes Rendus et mem. de la Societé de Biologie*. Página 141, año 1850.
- (34) POLLENDER, *Casper's Vierteljahrschrift. f. gericht. u. öffentl. Medicin.* Página 102, tomo VIII, año 1855.
- (35) DELAFOND, *Recueil de Medecine Veterinaire*. Página 668, tomo XXXVII, año 1860.
- (36) DAVAINÉ, *Comptes Rendus de l'Acad. des Sciences*. Página 320, tomo LVII, año 1863.
- (37) PASTEUR, *Etudes sur les maladies des vers. de soie*. París, año 1870.
- (38) KOCH (R) *Cohn's Beiträge z. Biol. der Pflanzen*. Página 277, tomo II, año 1870.
- (39) PASTEUR, CHAMBERLAND Y ROUX, *Comptes Rendus de l'Acad. des Sciences*. Página 42, año 1880.
- (40) SIVORI, *Proflaxia anticarbunclosa*. La Plata, año 1908.
- (41) HUEPPE Y WOOD, *Berliner klin. Wochenschrift*. Núm. 16, 1889.
- (42) LUTZ, *Societé de Biologie*. Página 789, Tomo LXX, año 1911.
- (43) ZIKER, *Centralblatt für Bakteriologie*. Pág. 389, t. XXX, 1902.
- (44) BURRI, *Hygienische Rundschau*. Núm. 7, año 1894.
- (45) HARTLEB Y STUTZER, *Centralblatt für Bakteriologie*. Página 81, año 1897.
- (46) MAC FARLAND, *Centralblatt. für Bakteriologie*. Página 556, tomo XXIV, año 1898.
- (47) ORLANDO, *Citados. Tesis*. Buenos Aires. Año 1910.
- (48) TANNER HEWLET Y NORMAN HALL, *Journal of Hygiene*. Página 473, tomo XI, año 1911.
- (49) GLYNN Y LEWIS, *Journal of Hygiene*. Tomo XII, año 1912.
- (50) GAILLOT, *Journal D'Agriculture Practique*. Núm. 26, t. I, año 12.
- (51) SEYMOUR JONES, *Bradbury*. Página 31, año 1910, Londres.
- (52) WULFF, *Berliner Tierärztliche Wochenschrift*. Página 241, tomo XXIV, *Zeitschrift für Infektionskrankh. usw. der Haustiere*. Página 266, tomo XII, año 1912.
-