

# QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA CAUSADA POR MORAXELLA BOVIS. PRIMERA COMPROBACION EN EL URUGUAY

SINONIMIA. Oftalmía epizoótica. Oftalmía infecciosa. Queratitis hemofiliana. Queratitis infecciosa. «Pink eye».

Dr. C.A. Quiñones-Sowerby\*  
Dr. L.A. Rivas-Piguillen\*\*  
Dr. Tomás Ramos-Vidal\*\*\*  
Dr. L.A. Saravia\*\*\*\*  
Dr. I.R. Rivero\*\*\*\*\*  
Julio Sanchez\*\*\*\*\*

## RESUMEN

Por primera vez en el Uruguay se comprueba queratoconjuntivitis bovina causada por *Moraxella bovis* (Hauduroy et al, 1937).

A partir de exudados oculares de bovinos clínicamente enfermos de queratoconjuntivitis (abreviadamente: Q.C.) se procesan microbiológicamente materiales de diversas zonas de la República Oriental del Uruguay, aislándose ocho cepas de una bacteria que fue clasificada como *Moraxella bovis*.

Se observó la bacteria típica en frotis directos, preparados con exudados oculares de casos característicos de la enfermedad y a partir de los referidos exudados se obtuvieron cultivos puros de *Moraxella bovis*, los que inoculados en bovinos sanos que no habían padecido previamente la enfermedad, reprodujeron un cuadro típico de queratoconjuntivitis.

Se señalan algunas diferencias de las cepas aisladas en el Uruguay con las resenadas en el standard internacional.

Se hacen consideraciones respecto de la clasificación en estadios clínicos de los animales enfermos, que creemos da importancia en cuanto al tratamiento y pronóstico de su evolución.

Se hace el estudio histopatológico de especímenes oculares en los diferentes estadios.

## HISTORIA

Según Leclainche (35), citado por Dechambre, 1973 (15), desde la antigüedad las Q.C. de los bovinos habían sido descritas y comprobadas.

En 1843 Coulomb (14) comprobó en Francia una oftalmía con pronóstico favorable que evolucionaba en tres semanas.

En 1857 Joyeux (34) precisa las condiciones epidemiológicas y describe lesiones típicas de queratoconjuntivitis.

Parecería que el primero que identificó esta enfermedad como un nuevo cuadro clínico específico fue Billings (6) en 1889

\* Facultad de Veterinaria

\*\* Facultad de Veterinaria

\*\*\* Facultad de Veterinaria

\*\*\*\* Departamento de Treinta y Tres

\*\*\*\*\* Facultad de Veterinaria

\*\*\*\*\* Asistente idóneo de Veterinarios Unidos S A

en Netraska, U.S.A.; describe un bacilo corto y de extremos redondeados, hace una completa descripción de la sintomatología, que coincide con precisión con lo que observamos hoy día. No logra reproducir la enfermedad experimentalmente.

En 1897, Penberthy (40) en Inglaterra registra cuatro brotes de queratitis y reproduce la enfermedad partiendo del exudado de dos bovinos. Por primera vez se pone en evidencia el carácter inoculable de la Q.C.

En 1911 Poels (42) en Holanda, considera como agente causal de la oftalmía infecciosa a *Bacillus pyogenes* (*Corynebacterium pyogenes*), logrando reproducir la enfermedad por inoculación subconjuntival de cultivos.

En 1919 Allen (2) publica sus observaciones en U.S.A y comunica el aislamiento de un diplobacilo gramnegativo, muy semejante al de Morax-Axenfeld (Morax, 39-1896) (Axenfeld, 3-1897), agente de una infección muy similar en el humano; ya en esa época destaca el gran pleomorfismo de la bacteria e insinúa que su fracaso en reproducir la enfermedad con cultivos puros, sería a causa de la atenuación que sufrirían los microorganismos por sucesivos pasajes en medios de cultivo artificiales.

En 1923 Jones & Little (33) en U.S.A. aislan un diplobacilo gramnegativo y hemolítico con el que pueden reproducir la enfermedad típica; en este sentido les pertenece la prioridad mundial.

En 1936 Coles (13) descubre en los ojos de los bovinos atacados de Q.C. una *Rickettsia*. La encuentra en las células epiteliales de la conjuntiva, bajo forma de cuerpos citoplasmáticos, pero no encontró estos corpúsculos o cuerpos citoplasmáticos en las células de la córnea.

En 1937, Hauduroy et al (23), clasifica la bacteria de Jones & Little como *Hemophilus* para posteriormente proponer Lwoff (37) en 1939 su reclasificación dentro del género *Moraxella*.

En el Manual de Bergey (7) 1957, está caracterizada como *Moraxella bovis* (Hauduroy et al, 1937). (loc cit).

Esta enfermedad desde el punto de vista clínico se conoce desde hace muchos años en el Uruguay, estando a cargo de los Dres. Viera y Castelo (60) en 1940 el primer estudio publicado, siendo atribuida a elementos rickettsiales, no aislándose el agente causal, pero lográndose infectar bovinos sanos con materiales patológicos de bovinos enfermos. En lanares padeciendo similar cuadro clínico, objetivaron también una rickettsia y reprodujeron la infección experimentalmente en lanares sanos; en ningún caso lograron infecciones cruzadas.

Posteriormente Pilz (41) en 1944 estudia la enfermedad pero no aporta ningún dato respecto del o de los agentes causales.

En 1945 Baldwin (4) estudia diferentes epizootias observadas en varios estados norteamericanos (Ohio, Montana, California), aislando *Moraxella bovis* en un 80% de los casos.

En 1952 Barner (5) confirma *Moraxella bovis* como agente de Q.C. encontrándola en más del 90% de los casos. Describe también otros gérmenes asociados (*Micrococos*, *estreptococos*, *pasteurelas* y *neisserias*). Confirma la inoculabilidad de la Q.C.

En 1961 Acinarayanan (1) en India aisla *M. bovis* en terneros afecta de Q.C. y pone en evidencia la aparición de anticuerpos aglutinantes específicos.

En 1964 Hughes et al (26) distinguen dos formas de Q.C. bovina. Una a *M. bovis*, la otra a virus IBR.

En 1965 y 1968 Hughes et al (27 y 28) destacan la importancia de la radiación Ultravioleta atribuyéndole un papel etiológico primario en la enfermedad.

En 1968 Wilcox (62) publica una completa revisión destacando la difusión mundial y la importancia que esta enfermedad tiene en la cría de ganado bovino.

Curiosamente esta enfermedad -que despierta enorme interés entre los productores y los colegas veterinarios que actúan en el medio rural- no ha sido motivo de ulteriores estudios por parte de los investigadores del Uruguay.

Habiendo sido incluida en el programa de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de Montevideo como «enfermedad sospechada» en el país, es decir diagnosticada clínicamente pero no comprobada su etiología microbiológica, y contando con el número de animales que necesitaríamos, puesto a disposición por uno de nosotros, nos decidimos a organizarnos en un equipo de diferentes especialistas con el objeto de determinar la etiología en nuestros ganados, presentación clínica, patología, inmunología, terapéutica, etc., enfocando un estudio frontal estudiando materiales de diferentes zonas del país. El estudio fue realizado principalmente sobre materiales obtenidos en la zona de Santa Clara de Olimar, del Depto. de Salto, Canelones (Piedras de Afilar, Reboledo), Florida (San Gabriel), Durazno (Carpintería), Tacuarembó (Molles de Tranqueras).

### CONSIDERACIONES GENERALES

Debe destacarse que la importancia que se le atribuye desde el punto de vista patológico, es muy grande, y según algunos destacados colegas (Saravia, 51-1973; Supparo, 56-1974 y López, 36-1974), es una de las enfermedades más perjudiciales y que más atraso producen en el desarrollo de los bovinos jóvenes afectados por ella, estimándose por muchos productores en un año de atraso a los tres años de edad en aquellos animales severamente afectados.

Debido a ello es que la elegimos como primer objetivo en una selección de problemas. Esta importancia radica en la repercusión económica y las ingentes pérdidas que representa no solamente en el atraso de desarrollo mencionado, sino además en los gastos directos e indirectos ocasionados por los tratamientos necesarios, y el considerable inconveniente provocado por el manejo de haciendas afectadas en el ciclo estacional coincidiendo

con la entorada, esquila, inseminación, balneaciones, etc. es decir, en los momentos en que la administración rural se ve enfrentada a la suma de los trabajos más complejos, tanto en cuanto a la distribución del personal, como a la movilización de las distintas haciendas, aprovechamiento y rotación de potreros, etc. Además del punto de vista económico debe sumarse la desvalorización de los animales en forma individual, debido a las lesiones residuales de la enfermedad o a la eventualidad de que como secuela resulte una ceguera permanente o necesidad de enucleación del ojo enfermo.

A sumarse el atraso en lograr el estado de preñez. Es de común observación que las hembras bovinas en edad de servicio generalmente no hacen celo, o no retienen el servicio mientras padecen esta enfermedad (Saravia, loc cit).

### INCIDENCIA

En general se presenta como estacional en todo el país. Se observa en todas las razas, pero parecería más frecuente en la raza Hereford, y menos en las razas Shorthorn Aberdeen Angus y Holando a campo.

(Jackson (32) 1953; Griffin et al, 21, 1965).

La máxima incidencia se registra en los meses de verano según nuestras comprobaciones, pero presentándose un porcentaje variable de casos a lo largo del año.

El número de casos en el Uruguay puede comenzar a aumentar a partir de octubre, si las condiciones del clima son de verano, coincidiendo en este sentido con las observaciones desde Schimmel (53) en 1894 (citado por Poels, 42, 1911), hasta Hughes et al (27) en 1965 que incriminan como importante factor a la radiación ultravioleta de la luz solar. Es precisamente en estos meses que en el Uruguay van siendo más largos y por ende más intensa y prolongada la radiación que normalmente padecen o soportan los animales.

## CAUSAS PREDISPONENTES

En establecimientos ya infectados de años atrás, naciendo las terneras entre agosto y octubre, los casos en terneros puedan comenzar hacia octubre y persistir el brote hasta fines de febrero.

En muchos establecimientos afecta de preferencia a los animales de sobreaño, con comienzo del problema hacia octubre o noviembre y no observándose mayores casos en los terneros, como tampoco en animales de más edad (salvo casos esporádicos). En establecimientos sin antecedentes de esta enfermedad pueden afectarse animales de cualquier edad y en cualquier época del año, o a lo largo del año, a veces coincidiendo con remates-feria, liquidaciones, compra de animales, destete de terneros, traslados largos de las haciendas con el «stress» consiguiente, etc.

En los dos últimos años (1975-76) en invierno en los meses de julio, agosto y setiembre, hemos estudiado y comprobado varios brotes gravísimos en terneras destetadas poco tiempo antes en varias zonas del país, tanto en campos con buenas pasturas, como en zonas muy pobres de pastoreo (Hughes et al, 29, 1970; Pugh & Hughes, 48, 1972). Estos brotes fueron de mucha importancia en cuanto a que el porcentaje de animales afectados superó en algunos casos el 50% y el número de lesiones residuales fue muy alto, además de una importante mortalidad (cerca del 30%) cuando el brote coincidió con escasez de pasturas y/o condiciones climáticas muy desfavorables.

A este respecto parecería que un nivel nutritivo superior, hasta cierto punto sería un factor que limitaría la rápida propagación y gravedad de la enfermedad.

Así, en ganados Holando (naturalmente bastante resistentes) criados en malas condiciones nutritivas, higiénicas y ambientales, se observan graves brotes de la enfermedad.

Además de la acción de la radiación ultravioleta de la luz solar, cuya importancia ha sido muchas veces destacada (Schimmel, loc cit; Allen, loc cit; Carpano, 11, 1938; Calvi et al, 10, 1973) y que mereció estudios cuali-cuantitativos por parte del grupo de Hughes et al (26), 1965; (27), 1968; al punto que algunos autores proponen que la radiación ultravioleta tiene un papel etiológico primario en la enfermedad; deben mencionarse también factores como la sequía, viento, polvo, incidencia de trabajos de campo que impliquen movilización de ganados, (rodeos, balneaciones, vacunaciones, etc.), el destete, estados de desnutrición, carencias vitamínicas y/o minerales, aumento de la población de artrópodos, las pasturas altas y rígidas (espartillos), etc.

## CUADRO CLINICO. CLASIFICACION

En la literatura consultada (Billings, 6, 1889; Baldwin, 4, 1945; Barner, 5 1952; Farley et al, 18, 1950 b; Jackson, 31, 1953, etc.) tanto en casos naturales como experimentales se encuentran descritos -según su evolución- las siguientes formas clínicas: sobreaguda, aguda, subaguda y crónica. Solamente Jackson comprobó una forma fulminante con alta mortalidad. Se podría agregar una forma abortiva o frustrada (observada experimentalmente por uno de nosotros, S.) que no va más allá del Estadio Clínico I (vide infra) manifestándose por epífora, fotofobia y lesiones menores de córnea y conjuntiva, con una evolución y recuperación total en 5 a 8 días. En algún caso, por lo menos, se pudo recuperar la bacteria específica del exudado ocular.

Creemos más importante hacer una clasificación según el grado de evolución, en relación con la profundidad que pueden

presentar las lesiones oculares en un sujeto en particular, dado que puede hacerse un pronóstico bastante acertado de su evolución. Partimos de la base que la enfermedad típica es *en todos los casos aguda* y variaría en su intensidad de acuerdo al terreno en que se desarrolla el proceso.

Desde este punto de vista sugerimos distinguir los siguientes estatutos clínicos, coincidiendo en parte con Formston (19) 1954 y Dechambre (15), 1973.

**Estadio clínico I:** epífora intensa, blefaritis y tilosis y fotofobia manifestada por un parpadeo frecuente, manteniéndose los párpados entrecerrados cuando el sujeto está al sol. El animal suelto en el campo, en las horas de sol más intenso, permanece parado, con la cabeza baja, no come y busca la sombra.

La semiología ocular muestra vasos ingurgitados y edema conjuntival.

Algunas actitudes que presentan los animales parecerían ser la expresión de un fuerte dolor.

**Estadio clínico II:** Se observa intensificación de los síntomas aparentes en el Estadio Clínico anterior, a los que se agrega, opacidad de córnea que se observa al centro de la misma, rara vez paracentral o periférica, aprox. de 1.5 x 1 cm. con una pequeña úlcera plana que puede hacerse cóncava y si profundiza puede llegar a tomar el aspecto de un cráter. Alguna vez hemos podido apreciar la presencia de una pequeña vesícula que antecede a la úlcera, hacia el centro de la opacidad, pero no se pudo documentar fotográficamente.

**Estadio clínico III:** Está determinado por la aparición de un anillo rojo escarlata a la altura del limbo corneal, el que frecuentemente comienza por un delgado hilo vascular. Posteriormente aumenta de ancho llegando a formar una banda.

Poco más tarde comienza a aparecer un arco incompleto en forma de "U" entre el limbo y el centro de la córnea en cuyo

interior se destaca la úlcera, ya grande y en forma de cráter, de color amarillo verdoso, con bordes nítidos y salientes.

A partir de este estadio pueden suceder una de tres variantes:

- a) recuperación lenta y completa.
- b) recuperación lenta e incompleta.
- c) continúa un proceso degenerativo de los tejidos con pérdida de los elementos anatómicos del ojo y ceguera total (phtisis bulbi, panofalmitis) causados generalmente por infecciones sobreagregadas.

En general, si la úlcera solo afectó las capas superficiales (epitelio estratificado pavimentoso no queratinizado y membrana de Bowman) de la córnea, la cicatrización habrá de producirse en forma más o menos rápida, apareciendo el tejido cicatrizal bien irrigado primero, para luego disminuir esta vascularización, a medida que avanza la reparación de los tejidos, siendo su color final blanco y desapareciendo por completo en cuatro a seis semanas.

A partir del Estadio II en el centro de la córnea puede aparecer una cicatriz blanca, irrigada por algunos finos vasos, que posteriormente desaparecen, quedando la córnea con un punto blanco en su centro; la visión en estos casos sin ser perfecta parecería casi completa.

Opinamos que se puede producir la restitución completa de los elementos anatómicos y funcionalidad de la córnea, solamente cuando el período regresivo se inició en el Estadio Clínico II, llamando la atención la recuperación completa en animales con lesiones severas.

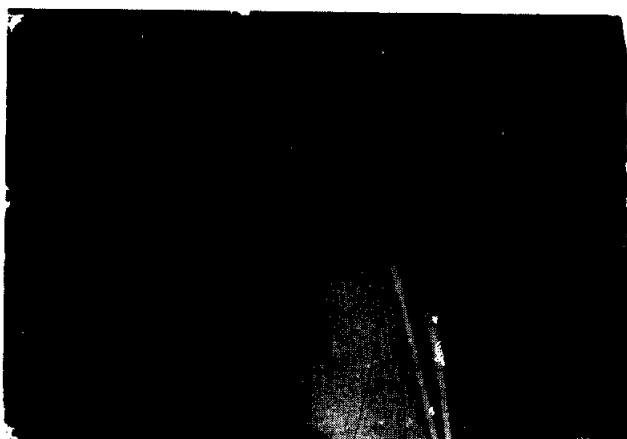
Si la lesión sigue evolucionando desfavorablemente, la solución de continuidad aumenta en profundidad, se produce un queratocele debido a la presión del humor acuoso sobre los tejidos externos disminuidos en resistencia, pudiendo llegar a producirse la ruptura de la membrana de Descemet y salida del contenido de la cámara anterior. En estos casos no hemos comprobado hipopión.



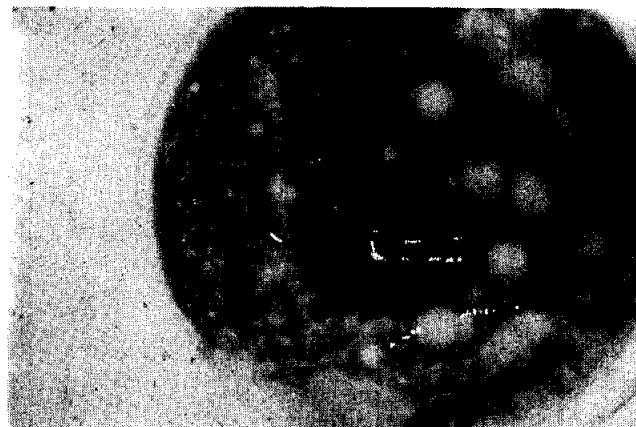
Ojo izquierdo, tercer estadio, leucoma, aro rojo y congestión conjuntival. Ternero de dos meses.



Ojo izquierdo, queratocono, vascularización radial de la córnea. Ternero Hereford de 5 meses.



Ojo Derecho, tercer estadio en ternero Hereford de 4 meses. Apreciar ulcera.

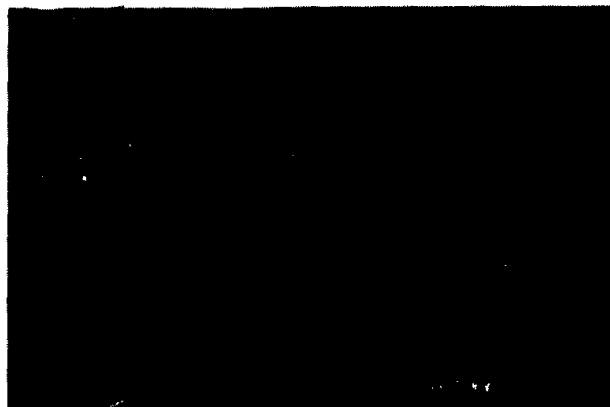


Colonias de *Moraxella bovis* y colonias de contaminantes. Se aprecia betahemólisis.



Colonias de *Moraxella bovis* en placas de agar soya sangre. Se aprecia beta hemólisis.

Frotis teñido por el método de Gram de un cultivo en medio sólido. Se aprecia disposición dominante en diplo. 1500 x



Detalle de colonias de *Moraxella bovis* en placa de agar sangre. 5 x.

Ternero enfermo del ojo izquierdo, en el brete. Observar actitud y compararla con la de los otros terneros sanos.



El humor acuoso aparentemente mantiene su transparencia, color y viscosidad, normales, salvo que probablemente pueda aumentar su cantidad.

Seguidamente se produce iridencisis que evoluciona según la flora microbiana presente hacia phtisis bulbi o panofthalmitis.

## MATERIAL Y METODOS

*Medios de cultivo y reactivos.* Bacto Tryptic Soy Agar (BTSA Difco) con el agregado de 5% de sangre de bovino u ovino (procedente de animales no sospechosos de padecer o haber padecido la enfermedad en el caso de bovinos, recogida sobre ACD), dispuesto en pico de flauta en tubos con tapón roscado y/o en placas e Petri. También se usó en algunos casos agar base (Difco) más el agregado de 5-10% de sangre ovina, bovina o humana.

Bacto Tryptic Soy Broth (BTSB Difco) con o sin el agregado de 5% de sangre (tal como para el medio sólido descrito).

SIM (Difco), TSIA (Difco), Gelatina Nutritiva (Difco), Leche Litmus (Difco), medios azucarados (Difco); suero coagulado de Löffler (Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina), reactivo de Kovacs para el test del indol, MRVR medium (Difco), solución alcohólica de alfa-naftol y solución acuosa de hidróxido de potasio al 40%, solución hidroalcohólica de rojo de metilo, solución de tripaflavina neutra en agua al uno por mil para la prueba de Pampana, urea de Christensen (Difco) y citrato de Simmons (Difco). Técnicas de siembra: vide infra.

*Métodos de coloración.* Hemos utilizado la técnica de Gram según descripción clásica. Fijación por el calor de frotis finos confeccionados en láminas nuevas, prolijamente lavadas y desengrasadas con alcohol-acetona.

Reactivos para Gram clásico: 1) Solución colorante: Cristal violeta (Merck): 1 g.; ácido fénico: 2 g.; alcohol absoluto: 10 ml.; agua destilada: 100 ml.

Los frotis fueron coloreados con esta solución durante un minuto.

2) Solución Lugol fuerte (según Nicolle): Iodo: 1 g.; yoduro de potasio: 2 g.; agua destilada: 200 ml. Los frotis se trataron con esta solución durante un minuto. Diferenciador: alcohol a 96°: 4 partes; acetona purísima: 1 parte. Esta solución se dejó actuar durante quince segundos (por reloj).

Coloración de contraste: Fuscina fenicada de Ziehl: 1:10. Se dejó actuar durante un minuto.

Para el estudio de la movilidad se examinaron preparados en gota pendiente o gota entre porta y cubre, utilizando cultivos en medio líquido, (de 18 a 24 hs.), examinados por microscopía en campo claro, contraste de fases y en campo oscuro.

Para el examen de cápsula procedimos a tinciones con azul de metileno de Löffler, colorante de Wright, técnicas de la tinta china, en fresco o en preparados extendidos secados y contrateñidos.

Para los estudios macro y micro patológicos se procedió a la fijación en formol-salina al 12%, inclusión en parafina, cortes seriados y técnicas de coloración usuales.

## RESULTADOS

En alto porcentaje de los casos estudiados por nosotros de cuadros clínicamente típicos de la enfermedad en el Uruguay hemos podido aislar como factor etiológico una bacteria que llena casi todas las características señaladas en el manual de Bergey (loc cit) y en datos aportados por la escuela norteamericana para clasificar a *Moraxella bovis* (Barner, 5, 1952; Jackson, 32, 1953; Henson & Grumbles, 24, 1960 y Pugh et al, 43, 1966).



**Morfología macroscópica.** De cultivos primarios en BTSA en caja de Petri o en pico de flauta, en 24 horas observamos colonias aisladas pequeñas, de 0.5 a 1.5 mm de diámetro, umbonadas frecuentemente, redondas, blanco grisáceas a la luz reflejada, lisas, de borde entero, rodeadas por una estrecha pero nítida zona de hemólisis beta.

Al ser emulsionadas en solución fisiológica, caldo simple o agua destilada, siempre dieron gruesos grumos, demostrando no encontrarse en fase lisa. A la luz transmitida presentan color amarillento, siendo transparentes.

En caldo simple desarrolló muy escasamente, mientras que en BTSB desarrolló en forma apreciable dando notorios grumos algodonosos que sedimentan.

**Morfología microscópica.** En frotis directos, de cultivos primarios o de primer subcultivo se observa que domina un diplobacilo de 1-2 1/2 x 0.5- 1 micras, como también elementos aislados en menos de un 5% del total y eventualmente algunos elementos dispuestos en cadeneta corta.

Cuando el cultivo envejece se aprecia tendencia a formar filamentos y además, algunos diplococos y cocos.

**Reacción tintoreal.** Hacemos hincapié que en la Técnica de coloración de Gram, la diferenciación se llevó a cabo con alcohol-acetona (4:1) durante 15 segundos por reloj (en lugar de los 5-10 segundos comúnmente usados), dado que en ese tiempo observamos que frotis finos preparados con cultivos de 18 a 24 horas, quedaban macroscópicamente diferenciados y que esta técnica que utilizamos regularmente en nuestro laboratorio con resultados satisfactorios, coloreó a *Moraxella bovis* (en frotis directos preparados con exudados oculares o recientemente aislada en cultivos) en forma ambigua, en comparación con coloraciones simultáneas llevadas a cabo con mezclas de *Moraxella bovis*, *Brucella abortus* (cepa 19 del B.A.I.), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, estos últi-

mos en cultivo de 24 horas aprox. y utilizándolos como testigos de coloración gramnegativa o grampositiva.

Posteriormente, como probable consecuencia de subcultivos la reacción tintoreal de las cepas que hemos trabajado de *Moraxella bovis* vira hacia la gramnegatividad en un lapso no muy largo.

Destacamos que la mayoría de los autores que han trabajado en el tema y en el Manual de Bergey señalan que su reacción tintoreal es gramnegativa, excepción por ejemplo de Saint Aubert & Toma (50), 1971.

**Movilidad:** Cultivos en BTSB de 14-18 horas fueron inmóviles, tanto por la microscopía reseñada como en los medios de cultivo especialmente diseñados para comprobar movilidad.

**Cápsula:** En frotis directos o preparados a partir de cultivos de 14-48 horas en los medios sólidos descritos, coloreados por una o varias de las técnicas reseñadas, pudo apreciarse la presencia de una cápsula fina en algunos elementos, nunca en todos los de un campo microscópico.

**Bioquímica:** No atacó: glucosa, sacarosa, lactosa, manitol.

Indol: negativo. Voges-Proskauer: Negativo. Rojo de metilo: Negativo. SH<sub>2</sub>: negativo. Nitratos no reducidos a nitritos. Suero coagulado de Löffler: desarrolló colonias típicas con digestión.

Leche litmus: desarrolló con peptonización en 10-12 días y ligera alcalinización. Gelatina a 22°C (por picadura): desarrollo pobre con ligera digestión que comienza con infundibuliforme.

Hemólisis: estrecha pero nítida zona de hemólisis beta en medio sólido y hemólisis total en 24-48 horas cuando se estudió en BTSB con sangre de bovino, humano u ovino.

Conservación: a temperatura de refrigerador (+4 a + 8°C) las cepas mueren rápidamente; en 5 días el 50% de las cepas han muerto y en diez días ya no existen organismos viables.

La hemos conservado en tubos de tapón roscado con BTSA con 5% de sangre bovina en pico de flauta a 24-28°C o a 37°C, pero a lo sumo se conserva correctamente alrededor de 30 días a cualquiera de las temperaturas señaladas.

El único medio que permite una buena y prolongada conservación es la liofilización y que nos ha dado el mejor de los resultados en los pocos ensayos realizados hasta la fecha.

No hemos ensayado todavía la congelación en nitrógeno líquido.

## ASPECTOS DE LA ANATOMIA PATOLOGICA

**Material:** los ojos afectados de Q.C. fueron extirpados quirúrgicamente y remitidos fijados en formol-salina al 12%.

Todos los casos fueron diagnosticados previamente a la extirpación, presentando estadios evolutivos de la enfermedad y no observándose en los que estudiamos los primeros estadios de la misma y sí algunos con complicaciones.

La inflamación de la capa córnea del ojo (queratitis) presenta un comienzo a través de un proceso de "irritación" más o menos intensa y se caracteriza:

1. Necrosis o necrobiosis del epitelio corneal y una rápida reacción exudativa.
2. Plasmolinfocitaria: que se localiza por debajo de los puntos en que se encuentra alterado el epitelio. Este exudado es detenido momentáneamente por la membrana de Bowman, que es perforada. El exudado se entremezcla con el epitelio alterado, estableciéndose una solución de continuidad, que es la úlcera corneal.
3. Al constituirse la úlcera corneal, interesa en 2.º término su profundidad (ésta ha de dar valor pronóstico al órgano).

El comportamiento de la neo-vascularización, también ha de respetar esta situación:

- a. que la úlcera llega a las capas superficiales de la escleral, es decir que ha tomado en su evolución necrotizante sólo la capa epitelial y la membrana de Bow-

man subyacente. En estos casos se establece una neovascularización conjuntival, comportamiento semejante a las alteraciones del sector límbico. Los vasos se observan en estas condiciones: aislados, rojo vivo y hecho importante: se desplazan en la conjuntiva.

- b. La úlcera se profundiza, llegando a las capas profundas de la escleral, es decir, ha hecho participar la membrana de Descemet y su recubrimiento endotelial (embriológicamente derivados de la úvea).

En estos casos, si bien hubo participación conjuntival, en lo que respecta a la neovascularización, en la 2a. etapa lo harán la red venosa y capilar episcleral (hiperemia que se presenta en los vasos profundos de la córnea). Por distribuirse en la capa escleral, deben adoptar un curso rectilíneo, dando un aspecto de "fibras de un pincel", en su forma pura, se extiende como un halo rojo, sin llegar a observarse los vasos (nítidamente visibles en la primera forma), mientras que en ésta se presenta como un halo rojo límbico.

En estas primeras etapas no siempre se alcanza a observarse la nitidez de la vascularización (se esconde a través de los tempranos exudados que opacifican la córnea).

Al llegar a la zona profunda de la úlcera, los vasos pueden sufrir:

- hemorragia y asomar, rellenando el fondo de la úlcera: el tapón hemorrágico.
- trombosis, profundizando aún más la úlcera.
- desorganización de la capa escleral.

La participación inflamatoria del iris, lleva a la hiperplasia del epitelio pigmentario, cuyas células pueden encontrarse en la vecindad de la úlcera corneal.

El músculo ciliar así como el esfínter pupilar del iris llegan a hialinizarse.

La arteriola (del círculo arterial del iris) sólo en un caso la encontramos semi-obstruída.

La retina: desprendimiento, hemorragias, etc.

En nuestros casos (tres) en el fondo de la úlcera corneal se observó un exudado (neutrófilos y piocitos) con trombosis de la neovascularización.

En todos los casos: opacificación corneal.

En seis casos, metaplasia escamosa del epitelio corneal; hiperplasia fibro-vascular-conjuntiva, desorden (de la capa escleral de la córnea), desaparición de la membrana de Bowman y alteraciones de la membrana de Descemet.

Iridociclitis: participación de las células pigmentarias que se extienden tanto por el esfínter pupilar, como por la capa escleral de la córnea.

En un caso: calcificación superepitelial a nivel de la membrana de Bowman, sustituida por la hiperplasia fibroconjuntiva hialinizada y calcificada.

## MATERIALES TRABAJADOS

Entre los numerosos materiales procesados destacamos:

*Cepas Santa Clara:* Para este trabajo se concurreó a la localidad de Santa Clara de Olimar en numerosas oportunidades, y en dos establecimientos de la zona se realizaron in situ, contenidos los animales en el cepo, siembras en cajas de Petri (con BTSA/sangre), colectando los exudados oculares con asa de platino.

En el medio mencionado, ya en 14-18 horas a 37°C se observó notorio crecimiento de colonias típicas (vide supra). Picadas éstas con espátula a tubos con BTSA/sangre, se obtuvo crecimiento típico en estado de pureza.

De este material se partió para los estudios bioquímicos y para la reproducción de la enfermedad.

El aislamiento a partir de hisopados (utilizando hisopos secos de algodón estéril) y siempre dentro de las 2-4 horas de extraídos, nos dio resultados bastante buenos, pero marcadamente inferiores a la técnica directa referida.

*Cepa Salto:* Estudios realizados a partir de hisopados de exudados oculares y fondo de saco conjuntival obtenidos con hisopos estériles de algodón ligeramente humedecidos con BTSB nos permitieron lograr un aislamiento sobre veinte materiales procedentes del Depto. de Salto y remitidos por los medios comunes de transporte, debido a que desarrolló un número altísimo de contaminantes, de los que -especialmente los móviles resultaron un grave inconveniente.

Entre otros desarrollaron: *Staphylococcus aureus* patógeno (coagulasa positivo, manitol positivo, betahemolíticos), *Corynebacterium pyogenes*, *Proteus* spp, *Bacillus* spp. Invariablemente las cepas que hemos trabajado aisladas de casos recientes de la enfermedad en terneros o animales de aprox. un año, se han presentado en *fase rugosa* suspendiendo en forma de grumos en solución fisiológica o en caldo simple, y generalmente las colonias sobre agar-sangre, al ser tocadas por la espátula o hilo de platino, se *deslizan* sobre la superficie del medio, siendo relativamente difícil "picarlas".

Algunas cepas que se aislaron de casos crónicos o en animales adultos, o a principios de otoño, se presentaron como lisas, ligeramente beta hemolíticas, suspendiendo homogéneamente en solución fisiológica, pero sometidas a la prueba de Pampana con acriflavina, aglutinaron en grumos, comportándose como rugosas.

Una de estas cepas, aplicada en cultivo puro sobre la córnea, saco conjuntival de 4 bovinos susceptibles, no reprodujo la enfermedad.

En el invierno del 1975 (julio, agosto, setiembre) hemos comprobado graves brotes afectando novillitos casi de un año, en varias localidades del país (Piedras de afilar, Reboledo, etc.) aislándose en todos los casos cepas típicas rugosas betahemolíticas.

**Reproducción de la enfermedad:** Realizado el aislamiento primario, a partir de animales jóvenes en los primeros días de evolución de la enfermedad, se multiplicó la bacteria en estado de pureza en tubos de BTSA con sangre bovina al 5% dispensado en pico de flauta; se levantó el cultivo con unos 3 ml de solución fisiológica, y se aplicó con gotero estéril, a razón de 0.15 a 0.25 ml por ojo y por animal, homogeneizando continuamente por la tendencia a formar gruesos grumos; se descargó la suspensión de bacterias en un solo ojo, quedando el otro como testigo, además de dejar un número representativo de bovinos sin inocular.

Se controló la viabilidad de la suspensión con resultado positivo, al final de la operación.

El cuadro clínico característico se presentó en 3 a 18 días.

El aislamiento intentado en dos de cinco animales que padecían la enfermedad experimental, nos permitió identificar *Moraxella bovis* en ambos.

De esta manera completamos los *Postulados de Koch* respecto de la etiología de las enfermedades infecciosas bacterianas.

## DISCUSION

Como se ha apreciado, coinciden nuestros trabajos con las experiencias de Jones & Little (33) en 1923; Baldwin (4) en 1945; Reid & Anigstein (49) en 1945; Barner (5) en 1952; Jackson (32) en 1953; Gallagher (20) en 1954; Hoffmann (25) en 1956; Seth et al (52) en 1957; Henson & Grumbles (24) 1960; Adinarayanañ & Singh (1) en 1961; Hughes et al (26) en 1964; Hughes et al (27) en 1965; Pugh & Hughes (46) en 1971; Bryan et al (8) en 1973.

En base a los estudios realizados *podemos afirmar categóricamente la presencia en la República Oriental del Uruguay de queratoconjuntivitis infecciosa bovina producida por Moraxella bovis* (Hauduroy et al 1937).

Si bien hemos identificado a *Moraxella bovis* como agente etiológico de Q.C., deben investigarse otras causas reconocidas o desconocidas de Q.C. en relación con su prevalencia en la población bovina del Uruguay: *Rickettsia*, ya reconocida por Coles (13) en 1936, Viera & Castelo (60) en 1940, Carpano (12) en 1941; *Neisseria*, reconocida por Spradbrow (54) en 1967, Wilcox (63) en 1970; *Virus* identificado como *IBR* por Studdert (55) en 1961, Hughes et al (26) en 1964, Pugh et al (45) en 1970; *Virus de "cáncer de ojo"* comunicado por Sykes et al (57-58-59) en 1962 y 1964; agentes del grupo *psitacosis-linfogranuloma* reconocidos por Dymil (16-17) en 1965; *parasitarias* como nematodos del género *Thelazia*, según Griffiths (22) en 1922, Varela Calzada, en 1940.

Deben estudiarse asimismo su distribución geográfica, factores stresantes como el destete, condiciones nutricionales, epizootiología y sus relaciones con los cambios del clima, especialmente en cuanto a cantidad de radiación ultravioleta de la luz solar y su relación con la temperatura ambiente, inmunología, formas de transmisión, reservorios, etc.

En este sentido si bien jerarquizamos la importancia de la radiación ultravioleta, es evidente que sin *Moraxella bovis* no hay brotes de Q.C. por lo que insistimos en adjudicarle a la radiación ultravioleta un importante papel en Q.C. pero como causa predisponente o coadyuvante (véanse en este sentido los trabajos de Hughes et al.

Debido a la fragilidad de la bacteria aislada en nuestro país y su escasa patogenicidad para animales de laboratorio (investigación que está en progreso), se descarta casi totalmente la posibilidad de su vehiculización o mantenimiento por objetos inanimados, animales de sangre fría y probablemente también homeotermos, indicándose como futura línea de investigaciones su individualización en el bovino (recuperado) en tiempo de invierno (ya lograda, pero en pequeño número de ani-

males), especialmente a nivel del aparato respiratorio, y se destaca la probabilidad de su transmisión a otros animales indemnes por el corrimiento nasal de sujetos enfermos, ya sea en el rodeo, al ser encerrados en el corral, o a lo largo de su pasaje y trabajos en los bretes o tubos.

Estudios serológicos parciales y todavía incompletos (trabajo en progreso) han mostrado la aparición de aglutininas y precipitinas en animales gravemente afectados, faltando muchas veces en animales que han hecho lesión en un solo ojo.

En varios lotes de sujetos inoculados con diferentes antígenos experimentales (experimento en progreso) se han podido demostrar niveles altos de anticuerpos al igual que lo encontrado en la literatura publicada por Calvi (9) en 1967, Hughes et al (29) en 1971, Pugh et al (47) en 1971, Hughes et al (30) en 1972.

Parece evidente por el estudio de fichas de sujetos experimentales, que la enfermedad no repite en el mismo ojo y no sería alto el porcentaje de sujetos que repite el cuadro en el ojo previamente sano, pero esto debe ser objeto de un estudio crítico y análisis estadístico que informaremos también oportunamente, procurando esclarecer en algo el problema para nuestro país.

Poco después de terminado a este nivel este trabajo, hemos podido aislar *Neisseria* spp en bovinos (Spredbrow, 1967), loc cit; Wilcox, 1970, loc cit) y poco después *Neisseria ovis* en laneros (Lindquist, 64, 1960), especies que hasta la fecha no habían sido descritas en el Uruguay; todavía no se ha completado el estudio de la patogenicidad de estas dos nuevas especies para sus respectivos huéspedes, lo que será comunicado oportunamente.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.— Adinarayanan, N. & Singh, S.B.- Infectious bovine Keratitis with Special Reference to Isolation of *Moraxella bovis*. *Vet. Rec.* (1961), 73: 694-696.
- 2.— Allen, J.A.- A preliminary note on infectious Keratitis. *J.A.V.M.A.* 1916, 54: 306-313.
- 3.— Axenfeld, T.- *Zentbl.Bakt.Parasitk de I.* 21:1-9 (1897).
- 4.— Baldwin, E.M.- A study of bovine Infectious Keratitis (infectious keratitis). *Am.J.Vet.Res.* 1945, 6, 180-187.
- 5.— Barner, R.D.- A study of *Moraxella bovis* and its relation to bovine keratitis. *Am.J.Vet.Res.* 1952, 13: 132-144.
- 6.— Billings, F.S.- Contagious inflammation of the cornea in cattle. *Nebraska Agric.Exper.Stat.Bull.* (1889), Vol. 3; 10, 217-252.
- 7.— Breed, R.S., Murray E.G.D. & Smith, N.R.- *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1957), 420.
- 8.— Bryan, H.S. Helper, L. Killinger, A.H., Rhoades H.E. & Mansfield, M.E. Some bacteriological and ophthalmologic observations on bovine Infectious Keratoconjunctivitis in an Illinois beef herd. *Jour.Am.Vet.M.A.* (1973), 163: 739-741.
- 9.— Calvi, Santiago A. Tratamiento y prevención de la queratoconjunctivitis bovina. *Rev. Mee. Vt. (Bs. As.)* (1967), 48 (6): 505-539.
- 10.— Calvi, S.A., Cortina Cervera, C.A. y Basso, E.- Posibles factores intervinientes en la transmisión de la queratoconjunctivitis bovina. *Gaceta Vet.* (1973), 35, N.º 282, 581.
- 11.— Carpano, M.- *Azione vet.* (1938), 7: 624-626.
- 12.— Carpano, M.- *Riv. Parassit.* (1941), 5: 197-208.
- 13.— Coles, J.- A rickettsia. Like organism of the conjunctivae epithelium of Cattle. *J. South Afric. Vet. Med. Ass.* (1936), 7: 221
- 14.— Coulomb M.- *Ophtalmie avec taie.* *J.Vet.du Midi* (1843), 35.
- 15.— Dechambre, I.- *La Kerato-Conjonctivite Infectieuse Bovine.* These pour le Doctorat Veterinaire, Année 1973, N.º 54.
- 16.— Dymal, B.- *Vet.Med., Praha* 10: 385-392 (1965 a)
- 17.— Dymal, B.- *Veterinársteví* 15: 452-454 (1965 b).
- 18.— Farley, J., Kliwer, I.O., Pearson, C.C. & Foote L.E. Infectious Keratitis of Cattle. A preliminary report. *AM. J. Vet. Res.* (1950b), 11, 17-21.
- 19.— Fomiston, C. - *Vet. Rec.* (1954), 66:522.
- 20.— Gallagher, C.M. - Investigations of the etiology of infectious ophtalmia of Cattle. *Austr. Vet. J.* (1954), 30: 61-68.
- 21.— Griffin, R.M., Gleeson, L.N. & Schael, A.S. *Vet. Rec.* (1965), 77, 1056.
- 22.— Griffiths, J.A. - *Vet. J.*, (1922), 29: 471-477.

- 23.— Hauduroy, P., Ehringer, G., Urbain, A., Guillot et Magrou, J. - Dictionnaire des bactéries pathogènes. Edit. Paris (1937): 247.
- 24.— Henson, J.B. & Grumbles, L.C. - Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. I. Etiology. Am. J. Vet. Res. (1960), 21: 761.
- 25.— Hoffmann, A.P. - La Queratoconjuntivitis Infecciosa de los bovinos. Rev. Vet. Militar (1956), 4, N° 18: 99-118. (Bs. As.).
- 26.— Hughes, J.C., Plander, H.J. & Wada, M. - J. Am. Vet. M.A. (1964), 145, 32-39.
- 27.— Hughes, D.E., Pugh, G.W. Jr., & McDonald, T.J. - Ultraviolet Radiation and Moraxella bobovis in the Etiology of Bovine Infectious Keratoconjunctivitis. Am. J. Vet. Res. (1965), 26: 1331-1338.
- 28.— Hughes, D.E., Pugh, G.W. Jr. & McDonald, T.J. - Experimental bovine infectious keratoconjunctivitis, caused by sunlamp irradiation and Moraxella bovis: Determination of optimal irradiation. Amer. J. Vet. Res., 29: 821- (1968).
- 29.— Hughes, D.E. & Pugh G.W. Jr. - Five-Year Study of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in a Beef Herd. J.A.V.M.A. (1970), 157: 443-451.
- 30.— Hughes, D.E. & Pugh, G.W. Jr. - Experimental Bovine Infectious Keratoconjunctivitis: Effectiveness of Intramuscular vaccination with viable Moraxella bovis culture. Am. J. Vet. Res. (1971), 32: 879-886.
- 31.— Hughes, D.E. & Pugh, G.W. Jr. - Experimentally induced Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: Vaccination with nonviable Moraxella Culture. Am. J. Vet. Res. (1972); 33: 2475-2479.
- 32.— Jackson, F.C. - Infectious Keratoconjunctivitis of Cattle. Am. J. Vet. Res. (1953), 14: 19-25.
- 33.— Jones, F.S. & Little, R.B. - An Infectious ophthalmia of Cattle. J. Exp. Med. (1923), 38: 139-148.
- 34.— Joyeux. Ophthalmie du boeuf a l'état enzootique. J. Vet. du Midi (1857): 567.
- 35.— Leclainche, E. - Histoire de la Médecine Vétérinaire. Office du Livre - Toulouse (1936).
- 36.— López Shannon, H. - Comunicación verbal (1974).
- 37.— Lwoff, A. - Revisión et démembrément des Hemophilae. Le genre Moraxella. Nov. Gen. Ann. Inst. Pasteur (1939), 62: 168-176.
- 38.— Mitter, S.N. & Satyandram N.M. - Contagious ophthalmia among Cattle. Vet. J. (1915), 71: 28.
- 39.— Morax, V. - Note sur un diplobacille pathogène pour la conjonctivite humaine. Ann. Inst. Pasteur (1896), 10: 337-345.
- 40.— Penberthy, J. - J. Comp. Path. (1897), 10: 263-264.
- 41.— Pilz, T. - La querato conjuntivitis. Rev. Med. Vet. Bs. As. (1944), 26: 409-412.
- 42.— Poels, J. - Keratitis infectiosa der runderen (Keratitis pyobacillosa). Tijdschr. Vecartsekunde (1911), 38: 758-766.
- 43.— Pugh, G.W. Jr., Hughes, D.E. & McDonald, T.J. - The Isolation and Characterization of Moraxella bovis. Am. J. Vet. Res. (1966), 27: 957-962.
- 44.— Pugh, G.W. Jr., & Hughes, D.E. - Experimental bovine infectious keratoconjunctivitis caused by sunlamp irradiation and Moraxella bovis infection: Correlation of hemolytic ability and pathogenicity. Am. J. Vet. Res. (1968), 29: 835.
- 45.— Pugh, G.W. Jr., Hughes, D.E. & Packer, R.A. - Bovine Infectious Keratoconjunctivitis: Interactions of Moraxella bovis and Infectious Bovine Rhinotracheitis virus. Am. M. Vet. Res. (1970), 31, 653-662.
- 46.— Pugh, G.W. Jr. & Hughes, D.E. - Infectious Bovine Keratoconjunctivitis Induced by Different Experimental Methods. Cornell Vet. (1971), 61: 23-45.
- 47.— Pugh, G.W. Jr., Hughes D.E. & McDonald, T.J. - Bovine Infectious Keratoconjunctivitis: Serological aspects of Moraxella bovis Infection. Canad. J. Comp. Med. (1971), 35: 161-166.
- 48.— Pugh, G.W. Jr., & Hughes D.E. - Bovine Infectious Keratoconjunctivitis: Moraxella bovis as the Sole Etiologic Agent in a Winter Epizootic. J.A.V.M.A. (1972), 161: 481-486.
- 49.— Reid, J.J. & Anigstein, L. - Investigations on Kerato-Conjunctivitis in Cattle on the Gulf Coast of Texas. Tex. Rpts. Biol. and Med. (1945), 3: 187-203.
- 50.— Saint Aubert de G. & Toma, B. - Isolement de M. bovis chez l'animal. Bull. Acad. Vet. (1971), Vigot Frères, 44: 97-106.
- 51.— Saravia, L.A. - (1973). Comunicación verbal.
- 52.— Seth, R.N. & Chandrasekariah, P. - Ind. Vet. J. (1957), 34: 248.
- 53.— Schimmel, W.C. - Tijdschr. Vecartsenijkunde (1894), 21: 1-6 (citado por Poels 1911).
- 54.— Spradbrow, P.B. - Aust. vet. J. (1967), 43: 55-58.
- 55.— Studdert, M.J., Radostits, O.M. & Savan, M. - Can. vet. J. (1961) 2: 201-206.
- 56.— Supparo, A. - (1974). Comunicación verbal.
- 57.— Sykes, J.A., Dmochowski, L., Grey, C.E. & Russell, W.O. - Proc. Soc. exp. Biol. Med. (1962a), 111: 51-57.
- 58.— Sykes, J.A., Grey, C.E. Russell, W.O. & Dmochowski, L. - Proc. Am. Ass. Cancer Res. (1962b), 3: 366.
- 59.— Sykes, J.A., Scanlon, M., Russell, W.O. & Dmochowski, L. - Tex. Rep. Biol. Med. (1964), 22: 741-755.
- 60.— Viera, O. & Castelo, M. - Conjuntivitis contagiosa por Bickettsia conjuntivae en los ovinos y bovinos del Uruguay. Revta. Med. vet. Bs. As. (1940), 22: 30-43.
- 61.— Watt, J.A. - Vet. Rec. (1951), 63: 98.
- 62.— Wilcox, G.E. - Infectious Bovine Kerato-Conjunctivitis: A Review. The Vet. Bull (1968), 38: 349-360.
- 63.— Wilcox, G.E. - Bacterial flora of the bovine eye with special reference to the Moraxella and Neisseria. Aus. Vet. J. (1970), 46: 253-257.