

MEMORÁNDUM PARA EL DIAG-
NÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE
LAS ENFERMEDADES DE LOS
ANIMALES DOMÉSTICOS POR
J. BARCELÓ Y J. FARRERAS



MEMORANDUM PARA EL SEÑOR
DIRECTOR GENERAL DE LA
ADMINISTRACION DE LOS
SERVICIOS DOMESTICOS
A BARCELONA Y SU ZONA

ADVERTENCIA

Este trabajo, es una recopilación de las fórmulas y procedimientos más sencillos, más prácticos y ciertos de bacteriología, expuestos en forma clara, para que puedan comprenderlo los no habituados á la práctica del laboratorio, y para que puedan consultarlo con rapidez quienes lo necesiten.

La bacteriología es un poderoso auxiliar de la clínica, y hoy no es perdonable que el clínico desconozca medios de diagnóstico tan útiles como los que le ofrece el laboratorio.

Por lo demás, la única pretensión que tiene este trabajo, es sólo la de ser de utilidad.





LOS MICROBIOS

Son gérmenes monocelulares sin núcleo, formados por un protoplasma contráctil y una envoltura. La composición de los microbios es la de todas las células vivas, á saber: materias orgánicas nitrogenadas y no nitrogenadas, y sales minerales.

Como seres que poseen vitalidad, los microbios nacen, crecen, se reproducen, se nutren, segregan, escretan y mueren. Todas estas funciones están sujetas á grandes variaciones, susceptibles de ser modificadas á voluntad del experimentador.

Por la forma de los microbios no siempre puede precisarse la especificidad del germen, porque el aspecto morfológico de un microorganismo no es un carácter absoluto ni constante ya que está en condiciones de sufrir modificaciones, en su forma y dimensiones.

No obstante, es conveniente hacer una clasificación de las formas microbianas basada en los caracteres objetivos:

Se conocen con el nombre de *cocus* cuando se presentan en forma de granitos sueltos ó aislados;

diplococcus, cuando uno de estos granitos está unido á otro; *estreptococos*, si se unen varios y forman como una cadenilla; *estafilococos*, cuando estos granitos se unen afectando la forma de un racimo; *bacterias* si ofrecen el aspecto de un bastoncito corto ovoideo; *bacilos*, si son cilíndricos; *vibriones* si tienen el aspecto de una virgula ó de una S., *espirilos*, cuando se presentan en forma *espiral* con pocas vueltas y muy próximas, y *espiroquetas*, cuando no obstante de afectar la forma espiral, las vueltas son menos numerosas y más separadas.

ESTERILIZACIÓN

Del aire, del suelo, del polvo, etc., se desprenden continuamente gérmenes que infectan los objetos, y hay que procurar, á todo trance, la destrucción de los gérmenes que podrían contener los utensilios que han de servir para cultivar los microbios. Si no fuera así, nos expondríamos á cultivar, en un mismo medio, gérmenes diferentes que podrían motivar dudas é inexactitudes con perjuicio de la precisión del diagnóstico bacteriológico. Por lo tanto, es necesario esterilizar todo lo que debe servir para el cultivo de los microbios.

Esterilizar quiere decir destruir los microbios. La esterilización se consigue por procedimientos físicos (calor, filtración), ó químicos (empleo de antisépticos).

Los procedimientos más sencillos de esterilización son: 1.º por el calor seco, y 2.º por el calor húmedo. Para esterilizar los objetos por el calor seco, cuando su naturaleza lo consiente, lo mejor es calentarlos al rojo, pasándolos por la llama del gas de un mechero Bunsen,

La esterilización de los utensilios de cristal, vidrio, porcelana, etcétera, se consigue sometién-dolos, por espacio de treinta minutos, á la tempe-ratura de 180°, en el horno de Pasteur ó en el de Chantemesse. El primero de estos aparatos esteri-lizadores es el más usado, y consiste en un cilindro de plancha, de doble pared, calentado por un mechero grande de gas colocado en la parte infe-rior del horno. En el interior del cilindro hay un cesto para recibir los objetos que tengamos que esterilizar. La parte superior, se cubre con una tapadera, en la que hay un agujero por el que sale un termómetro de los de mercurio, que puede marcar hasta 200°. De la parte lateral é inferior sale un tubo que sirve de chimenea para dar salida al aire caliente. Antes de esterilizar los objetos, hay que lavarlos con agua abundante, porque de no hacerlo así, quedarían en ellos substancias orgánicas que, carbonizándose, los ensuciarían.

Para evitar que el aumento brusco de tempera-tura rompa los objetos, es necesario que antes de colocarlos en el horno estén bien secos. Los tubos, frascos, matraces, etc., se tapan con papel ó algo-dón por sus bocas, y en esta disposición es como se llevan al esterilizador. Es buena costumbre la de colocar uno ó dos ladrillos refractarios en el fondo del horno, porque así se evita la carboniza-ción del papel y del algodón. La práctica en el ma-nejo del horno de Pasteur enseña, que cuando estas substancias adquieren un color moreno obs-curo, la temperatura llega á 180°. Del esterilizador, no deben sacarse los objetos hasta que se hayan

enfriado, pues de lo contrario, la diferencia de temperatura del horno con la del ambiente, haría que se rompieran. El esterilizador de Chantemesse tiene la forma de un armario y funciona como el horno de Pasteur.

Para esterilizar los objetos por el calor húmedo pueden usarse tres procedimientos: 1.º Calentamiento en el agua ó vapor á 100°. 2.º Calentamiento en el vapor á presión. 3.º Calentamiento discontinuo á baja temperatura. El primero de estos procedimientos no es muy bueno porque no mata todos los gérmenes, aun cuando la temperatura obre algún tiempo sobre ellos.

La esterilización por el vapor á presión, se emplea para el agua, substancias de cultivo, jeringas, objetos de cauchú, etc., y basta que los objetos permanezcan veinte minutos en el vapor á 115° para que casi siempre queden del todo esterilizados.

Para la aplicación de este procedimiento se usa un aparato especial conocido con el nombre de *autoclave de Chamberland*. No es otra cosa que una marmita de cobre en cuyo fondo se deposita agua destilada que ha de generar el vapor. Dentro de la marmita hay un cesto de alambre en el que se colocan los objetos que queremos esterilizar, sin que el agua llegue á tocar la cesta. La marmita se tapa con una tapadera móvil de bronce que se ajusta á las paredes de la boca del aparato por medio de varios tornillos. En la tapadera va montado un manómetro que indica la presión del vapor, una válvula de seguridad y un tubo provisto

de una llave para dar salida al vapor. Debajo de la marmita va un mechero compuesto de diez ó doce tubos para calentar el autoclave.

Para hacer funcionar el aparato, se comienza por quitar la tapadera y echar agua, colocando á continuación el cesto con las vasijas, tubos, etc., que hayan de esterilizarse. Se atornilla la tapadera, se abre la llave que ha de dar salida al vapor, y se enciende el mechero. Al poco rato comienza á salir el vapor por la llave abierta, siendo necesario cerrarla, porque, de lo contrario, la temperatura no pasaría de 100°, y el autoclave funcionaría como una estufa de vapor. Cerrando la llave aumenta la presión á 110° y á 120°. Al cabo de una hora, como máximo, se apaga el mechero y se da salida al vapor poco á poco y de tiempo en tiempo. Téngase la precaución de no quitar la tapadera antes de haber abierto la llave de escape del vapor, porque, de lo contrario, el operador podría quemarse. No prolongar la operación de esterilizar más de una hora, porque el autoclave quedaría sin agua.

El calentamiento discontinuo á baja temperatura, llamado método de Tyndall, está basado en someter los objetos á una misma temperatura en varias horas de intervalo (24 horas) y durante algunos días. Por la influencia repetida del calor, los gérmenes atenúan progresivamente su resistencia y se consigue la esterilización.

Este procedimiento sólo es aplicable á determinados medios que no pueden ser sometidos á temperaturas muy altas, porque se alterarían.

Tal ocurre con el suero. La temperatura del método de esterilización discontinua es de 55 á 60°.

Si tratamos de obtener la esterilización de algunos líquidos, por filtración, tendremos que servirnos de unos aparatos que tienen unos poros muy pequeños, y que se conocen con el nombre de *bujías* porque afectan esta forma. Hay dos modelos de bujías de Chamberland: uno es el modelo F que se utiliza para filtraciones corrientes y por aspiración, el otro es el modelo B, usado para filtrar á presión. Este último es menos permeable y se usa para impedir el paso á los microbios muy tenues, tales como los de la peripneumonía, fiebre aftosa y horse-sickners, pertenecientes al grupo de los llamados invisibles ó ultra microscópicos.

LOS MEDIOS DE CULTIVO

Ya se ha dicho que los microbios, como todas las células vivas, están compuestos de materias orgánicas nitrogenadas y no nitrogenadas y sales minerales. Por lo mismo, para que puedan vivir, nutrirse y crecer, hay que proporcionarles estas tres clases de sustancias, las que podemos obtener de los tejidos animales ó vegetales, por medio de maceraciones, infusiones, caldos, ó soluciones alcalinas á las que se añade un cuerpo hidrocarbonado.

Los medios de cultivo de los microbios, pueden ser líquidos y sólidos.

Entre los primeros el más importante es el caldo de buey peptonizado, y es el que con mayor frecuencia se emplea en los laboratorios. Se prepara del modo siguiente :

Tómense 500 gramos de carne de buey magra, desprovista de las partes tendinosas y aponeuróticas, hágase picadillo y póngase en maceración en 1,000 gramos de agua fría durante seis ó doce horas. Al cabo de este tiempo, se pone á fuego lento

en una cacerola esmaltada y se remueve constantemente con una espátula. Procúrese que hierva despacio, y que la ebullición dure diez minutos. Échese en una rodilla recia y limpia con objeto de filtrarlo y exprímase el residuo que queda, aprovechando el líquido que de ella resulta. Filtrese con un papel de filtro recio previamente mojado con objeto de retener en él la grasa. Una vez filtrado, echarlo en otra cacerola esmaltada y añadir un gramo ó gramo y medio de peptona, medio de sal común y uno de fosfato de sosa por cada 100 centímetros cúbicos de caldo. Hágase hervir y agítese para facilitar la disolución de la peptona.

Como quiera que el caldo resulta muy ácido, hay que neutralizarlo, pues no debe olvidarse que las bacterias se desarrollan mejor en un medio neutro ó ligeramente alcalino y que la acidez dificulta la germinación. Para conseguir la neutralización, se usa una solución concentrada de sosa cáustica ó de bicarbonato de sosa, que va echándose en el caldo por medio de una pipeta, teniendo cuidado de comprobar á menudo con el papel de tornasol, la reacción del líquido. Así que el papel enrojecido antes por la acidez adquiere un color ligeramente azulado al echar sobre él una gota de caldo, no debe añadirse más solución alcalina. No se olvide que la alcalinización del caldo, es el tiempo más delicado de su preparación, puesto que la cantidad de solución alcalina que hay que añadir varía según las diferentes clases de carne que se emplea y, por lo mismo, hay que proceder por tanteo.

Una vez conseguido la neutralización del caldo, se echa éste en un matraz de vidrio y se lleva al autoclave á una temperatura de 115° durante cinco minutos. Después se retira del autoclave y en caliente se filtra otra vez con papel de filtro mojado para que retenga los gramos de fosatos térreos y resulte el caldo absolutamente limpio. Terminada esta operación se reparte en los matraces que han de servir para los cultivos y se lleva al esterilizador.

Cuando se quiere conservar el caldo por mucho tiempo, se pone en un matraz grande tapado con huata ó cerrado á la lámpara. Para repartir el caldo en los matraces ó en los tubos, conviene utilizar un embudo con objeto de no mojar el cuello de estos recipientes, pues de lo contrario el algodón ó huata, que sirve para tapar los frascos ó tubos, se adhiere fuertemente y dificulta la apertura.

La preparación del caldo de ternera se hace igual que la descrita para el caldo de buey, y lo mismo hay que decir para la del caldo de gallina.

El caldo glicerinado no es otra cosa que caldo de buey, al que se añade, antes de repartirlo en los tubos, un 5 por 100 de glicerina pura.

El caldosuero se obtiene añadiendo a los tubos de caldo ordinario, la mitad, el tercio ó el cuarto de suero sanguíneo ó de líquido arístico recogidos puros.

La leche figura también entre los medios líquidos de cultivo pero no se utiliza con mucha frecuencia y lo mismo podemos decir de la orina.

Los medios de cultivo sólidos se preparan añadiendo al caldo de buey sustancias transparentes que se solidifican á la temperatura ordinaria. Pueden ser á base de gelatina, de agar-agar, ó albuminosos (suero sanguíneo, clara de huevo).

Si se utiliza la gelatina, es preferible que sea de la llamada extrafina, que se expende en los comercios en forma de placas muy delgadas. La gelatina ordinaria pierde la propiedad de solidificarse cuando ha sido sometida á la temperatura de 102 á 105°. Como quiera que la gelatina es muy ácida, conviene neutralizarla, no pasando de una reacción neutra ó débilmente alcalina, porque la gelatina que ha sido calentada en contacto de un álcali no vuelve á solidificarse.

Los medios de cultivo á base de gelatina se licuan á 25° y sólo pueden utilizarse para cultivos que no rebasen una temperatura de 20 á 23°.

He aquí el modo de preparar la gelatina para los cultivos: Macerar 500 gramos de carne magra de buey en 1,000 de agua, cocerla, exprimirla y filtrarla en caliente. Añadir á este caldo :

Peptona Chapoteaut.	10 gramos
Sal común	5 »
Gelatina extra.	80 ó 100 gramos.

Según la temperatura de la estación conviene añadir al caldo más ó menos gelatina (8 por 100 en invierno, 15 por 100 en verano).

Caliéntese todo en una cacerola y agítese continuamente para evitar que la gelatina se coagule en el fondo, haciéndolo hervir una vez disuelta, por es-

pacio de tres minutos. Llévase el autoclave á 115° cinco minutos y filtrese al sacarla de él en caliente por medio de un embudo de los llamados para filtrar en caliente. Del filtro se coloca en los tubos en una cantidad de 10 á 15 centímetros cúbicos por cada tubo. Si el medio resulta perfectamente transparente es prueba de que ha sido bien preparado. Conviene conservar los tubos de gelatina en un paraje lo más fresco posible, una vez esterilizados y tãpados con huata ó algodón.

El agar-agar ó cola del Japón es una substancia que procede de una alga que se cría en el Océano indio y se presenta en el comercio en forma de láminas secas y fibrilares, y tiene la propiedad de formar cuando se cuece en el agua, coágulos que soportan temperaturas inferiores á 60° y superiores á 25°. Se prepara del modo siguiente :

A 100 gramos de caldo de buey se añaden 2 de agar-agar cortado en pequeños trozos. Pero antes, hay que remojarlo en agua fría durante una ó dos horas y exprimirlo en un paño. Cuando se pone en el caldo, se lleva todo (caldo y agar-agar) á una temperatura de 100° removiéndolo hasta que el agar se disuelva del todo. Comprobar la reacción y procurar que sea neutra ó ligeramente alcalina, porque si se calienta en un medio ácido el agar-agar se convierte en azúcar. Déjese enfriar á 55 ó 60° y añádese una clara de huevo batida y diluída en 100 gramos de agua, y mezclarlo bien. Llévase esta mezcla al autoclave á 120° durante una hora. Con esto conseguimos que la albúmina de la clara del huevo se coagule y precipite con ella las impure-

zas que el agar-agar lleva. Sáquese del autoclave, échese sobre un papel de filtro puesto en un embudo y mojado previamente.

La filtración debe hacerse en caliente y es muy lenta. El agar filtrado se recoge en un recipiente caliente y desde éste, se reparte á los tubos en cantidad de 8 á 10 centímetros cúbicos por cada tubo operando aprisa para que no se solidifique.

Para la distribución del agar-agar en los tubos hay que utilizar un embudo, pues no haciéndolo así, es fácil mojar la boca de los mismos y hacer que el algodón se pegue y dificulte el poderlos destapar cuando hayamos de servirnos de ellos. Mientras los tubos permanecen calientes, hay que ponerlos en un plano inclinado con objeto de que el agar-agar quede solidificado oblicuamente. Los tubos deben permanecer inclinados durante treinta y seis horas.

La dificultad mayor que se observa en la preparación de agar-agar, consiste en la filtración, en extremo lenta.

Para facilitarla antes de añadirlo al caldo se aconseja la maceración del agar-agar en una solución de ácido clorhídrico al 6 por 100, por espacio de veinticuatro horas. Al cabo de este tiempo se lava el agar-agar en agua abundante y se le baña con una solución de amoníaco al 5 por 100. Preparado así, tiene la desventaja de que no se adhiere mucho á los tubos que han de contenerlo.

El suero sanguíneo es otro medio utilizado en los laboratorios para el cultivo de ciertos microbios que sólo crecen en él, tal ocurre por ejemplo

con el bacilo de la tuberculosis. Veamos el modo de prepararlo: Recójase, en un vaso ancho, sangre de buey, y, sin agitarla, déjese coagular. Déjese en un paraje fresco ó cámara frigorífica durante veinticuatro horas. Se aspira por medio de una pipeta el suero en que nada el coágulo y se reparte en tubos ó matraces esterilizados y tapados con algodón.

La esterilización del suero debe hacerse por el método discontinuo sometiendo los tubos á la temperatura de 56 á 58° durante una hora cada día y por espacio de ocho ó diez días. Para que se solidifique el suero, se dejan los tubos en posición inclinada durante varias horas á la temperatura de 65 ó 68°. Téngase cuidado de que no llegue nunca á 70° porque en este caso la albúmina se coagularía y el suero adquiriría un color lechoso en vez del ambarino que debe tener para el uso de los cultivos.

SIEMBRA DE LOS MICROBIOS AEROBIOS

Todos los utensilios destinados para la siembra y cultivo de los microbios aerobios deben estar al abrigo de lo que pudiera infectarlos. Para sembrar, hay que tomar la semilla con un instrumento estéril con objeto de llevarla pura al medio de cultivo. Conviene, pues, que los instrumentos que nos han de servir para sembrar (pipetas, agujas de platino, capilares), hayan sido pasados por la llama del gas, cuidando de no introducirlos en el cultivo inmediatamente, sino hasta que se enfrien y no olvidando de volverlos á pasar por la misma llama después de habernos servido de ellos, para destruir los gérmenes que llevan adheridos y que podrían ser peligrosos para el manipulador.

Los instrumentos de siembra se hacen por lo general en el mismo laboratorio.

La pipeta de Pasteur consiste en un tubo de vidrio de 20 á 25 centímetros de largo, y de 6 ó 7 milímetros de diámetro, afilado y cerrado por un extremo y abierto por el otro que acostumbra á cerrarse con un tapón de huata ó algodón.

Cuando tengamos que servirnos de una pipeta, romperemos la punta con los dedos ó con unas pinzas, y acto seguido la pasaremos por la llama del gas para esterilizarla. Hecho esto, la introduciremos en el matraz (si el medio de donde tomamos que tomar la semilla es líquido), y por capilaridad irá ascendiendo el líquido, ó sino aspiraremos con la boca, teniendo la precaución de que el líquido del cultivo no llegue nunca á tocar el tapón de la pipeta.

Acto seguido la llevaremos al medio que queramos sembrar y dejaremos caer una ó algunas gotas de líquido.

De todos los hilos metálicos, el de platino debe ser el preferido, porque no se oxida ni se altera. Se acostumbra á clavarlo en un mango de vidrio que de antemano se calienta al rojo, y en esta disposición podemos servirnos de él sin peligro de quemarnos al pasarlo por la llama del gas ó de la lámpara. No obstante, el hilo de platino tiene el inconveniente de ser muy flexible y de torcerse, cosa inconveniente, cuando haya de tomarse semilla de los cultivos resistentes ó duros.

Los capilares son tubos de vidrio muy delgados que se hacen en el mismo laboratorio calentando por el centro un pedazo de tubo de vidrio, y estirándolo moderadamente por los extremos con las dos manos hasta conseguir tubos tan delgados como queramos.

Las siembras pueden hacerse tomando la semilla de un cultivo que ya tengamos de antemano, ó bien de una gota de sangre, pus, agua, polvo, etcé-

tera. El modo de efectuar la siembra de los microbios varía según el medio de cultivo en que tenga de hacerse. Si se trata de un medio líquido se toman con la mano izquierda el matraz ó tubo que contiene la semilla y otro esterilizado, se pasa la abertura de ambos por la llama y se quitan los tapones no tirando de ellos con los dedos, sino por medio de un movimiento de rotación. Conviene dar á los matraces ó tubos una posición horizontal ó inclinada con objeto de evitar que caigan en ellos partículas de polvo que á veces se desprenden del techo y que los infectarían con gérmenes extraños á los que nos proponemos cultivar.

Con los dedos índice y medio de la mano derecha se toma el capilar, pipeta ó hilo de platino y se pasa por la llama.

Así que está frío, se introduce rápidamente en el matraz ó tubo que contiene la semilla, procurando que no toque los bordes de dichos recipientes, se toma una gota y se sumerge en el otro y se retira aprisa. Se tapa la boca del matraz ó tubo sembrado y se pone una etiqueta que indica la clase de cultivo y la fecha en que se ha hecho la siembra. Si la siembra ha de hacerse en medios sólidos puede ser por *estria* y por *picadura*.

Para hacer la primera se siguen iguales indicaciones que para la siembra en medio líquido, con la diferencia de que en lugar de sumergir el instrumento que lleva la semilla y sacarlo rápidamente hay que frotar ligeramente la superficie del medio de cultivo.

La siembra por *picadura* se hace tomando culti-

vo con el hilo de platino é introduciéndolo en el medio, hasta que llegue á tocar el fondo del tubo en posición invertida.

Sembrados ya los medios de cultivo deberemos colocarlos á una temperatura constante y al abrigo de la luz para que en ellos germinen los microbios. Los hay que para su desarrollo necesitan temperaturas superiores á 30° y otros que sólo se cultivan bien á menos de 30°.

Para que el grado de calor sea siempre el mismo se utilizan las estufas provistas de unos aparatos llamados reguladores. Las estufas son unas cajas metálicas de diferentes formas que se cierran mediante una puerta y que se calientan por el gas ó electricidad. No conviene que las estufas estén cerradas herméticamente, porque de lo contrario, el aire caliente se acumula en la parte superior y la temperatura no es igual dentro de la estufa.

Cada día deberán examinarse los cultivos una ó varias veces para ver si germinan y apreciar los caracteres de su desarrollo.

Al cabo de algún tiempo el cultivo pierde su vitalidad hasta desaparecer, y entonces no puede servir para fertilizar ningún medio de cultivo. Para conservarla hay que sembrar los microbios con frecuencia ó bien impedir que el aire obre sobre ellos.

Si se quiere conseguir esto último, opérese del modo siguiente:

Tómese un cultivo en caldo en buenas condiciones de germinación, y con una pipeta de Pasteur se aspira hasta que llegue el líquido á la estrangula-

lación de la misma. En esta disposición se lleva á la llama del mechero, y así que se enrojece se estira de modo que quede cerrado por sus dos extremos, y en esta forma se lleva á un sitio obscuro.

Hemos dicho que las siembras se hacen con objeto de cultivar los gérmenes puros, y para conseguir esto, es preciso aislarlos. El aislamiento de los microbios se hace por dilución y diseminación ó aprovechando las propiedades biológicas del microbio que queremos aislar.

Antes de practicar el aislamiento debe distinguirse si los microbios son aerobios ó anaerobios. Entretanto, veamos como se procede para aislar los gérmenes aerobios.

El procedimiento mecánico de la dilución se usa hoy muy poco y consiste en lo siguiente: Si pretendemos por ejemplo, aislar los microbios que contiene una gota de agua, la llevaremos á un tubo que contenga diez centímetros cúbicos de caldo estéril y lo agitaremos para que se mezcle bien. Los gérmenes de la gota de agua se han diluido con los diez centímetros de caldo, de manera, que cada gota de caldo llevará doscientas veces menos gérmenes que la primitiva. Si echamos de esta dilución una gota á otro tubo y luego á otro, llegaremos hasta la pureza del cultivo. Este procedimiento es muy largo y pesado.

Koch lo hizo más sencillo por medio de la diseminación, con la ventaja de que puede utilizarse, ora sembrando en un medio previamente licuado ó en la superficie de un medio sólido.

Supongamos que tratamos de aislar los gérmenes contenidos en una gota de agua. Para ello, llevamos dicha gota á un tubo cuyo medio de cultivo es la gelatina y la licuamos al baño de maría, mezclándola á ella íntimamente. A continuación echamos la gelatina del tubo en una placa de vidrio y la dejamos enfriar.

Los microbios se hallan diseminados en la gelatina de tal modo, que si llevamos la placa á la estufa, cada microbio formará una colonia aislada de las demás y constituida por individuos procedentes del germen único inicial y por lo tanto puro. De esta suerte será muy fácil poderlos tomar directamente de cada colonia y llevarlos á los otros medios de cultivo que necesitemos.

No deben olvidarse las reglas siguientes :

1.^a Antes de sembrar la gelatina licuada hay que dejarla enfriar para no destruir los gérmenes.

2.^a Colocar las placas de abrigo del polvo atmosférico.

Las placas de Petri son las que más se usan en el laboratorio para la diseminación de los microbios en medios sólidos.

Hay que observar las placas cada día y fijarse en el desarrollo de las colonias, así como en los caracteres de las mismas.

En cuanto á los métodos de aislamiento fundados en las propiedades biológicas de los microbios, hay que decir que, únicamente echaremos mano de ellos cuando se trate de investigar y aislar un germen dado, aprovechando las propiedades biológicas conocidas de antemano para colocarle en las

condiciones más favorables para su germinación y crecimiento. Así, por ejemplo, si se trata de microbios aerobios le privaremos del oxígeno que necesita y de esta suerte los eliminaremos de los anaerobios.

También por el calor podemos librar á los gérmenes de su coexistencia con otros.

Las bacterias no esporuladas mueren muy aprisa cuando se las pone en un medio líquido que tenga una temperatura de 60°, mientras que los microbios esporulados toleran durante muchos minutos temperaturas de 80, 100 y hasta 105°.

Para separar una bacteria esporulada de un medio que contenga otras con esporos, hasta someter la mezcla por espacio de algunos minutos á una temperatura comprendida entre 80 y 105° y sembrar en un tubo de caldo.

CULTIVO DE LOS GÉRMENES ANAEROBIOS

Algunos microbios son indiferentemente aerobios ó anaerobios, otros sólo germinan en un medio privado de oxígeno.

Los procedimientos para privar de aire los medios de cultivo son : la ebullición, la expulsión del aire por un gas inerte, la absorción del oxígeno por un cuerpo oxidable, absorción del oxígeno por un cultivo aerobio y el empleo de máquinas neumáticas.

La ebullición expulsa el gas en disolución en los líquidos, bastando que dure veinte ó treinta minutos, enfriarlo aprisa y preservar el medio del contacto del aire atmosférico.

También puede privarse de aire á un líquido, haciendo pasar por él una corriente de gas inerte, tal como el anhídrido carbónico, hidrógeno, nitrógeno, etc. El más preferible es el hidrógeno, porque se prepara fácilmente y no perjudica á los microbios.

Cuando queramos privar el oxígeno de en medio por absorción podemos aprovechar la afinidad que

para él tienen algunas sustancias. Se introduce el tubo del cultivo dentro de otro mayor y en el fondo de este último se echa la solución compuesta de:

Acido pirogálico	1 gramo
Potasa al alcohol	1 »
Agua	10 cént. cúb.

Se tapa el tubo grande con un tapón de caucho y se lleva á la estufa.

El profesor Dr. Turró ha ideado un tubo universalmente conocido en los laboratorios de bacteriología, que tiene la ventaja de acelerar la absorción del oxígeno y al mismo tiempo de poder observar directamente el cultivo.

Legros recomienda que se eche en los medios de cultivo una capa de aceite de vaselina, con el cual se preserva á los cultivos del contacto del aire. En el tubo que contiene el cultivo se vierte el aceite de vaselina de manera que forme una capa de 5 á 10 milímetros de espesor. La siembra se hace á través de la capa de grasa que sobrenada.

En los medios sólidos la siembra de los microbios anaerobios puede hacerse tomando un tubo de gelatina esterilizada y llevarla á la ebullición por espacio de varios minutos. Antes de la ebullición puede añadirse una solución de sulfoindigotato de potasa, que se decolora así que los microbios se desarrollan. Déjese enfriar la gelatina, y cuando se haya solidificado, hágase la siembra por picadura con el hilo de platino. Practicada la siembra se sumerge el tubo de gelatina en agua fría y con una pipeta de Pasteur se vierte en la superficie de la gelatina un poco de agar licuado para que

así se forme encima del cultivo un tapón que impida el contacto del aire.

El tapón de agar puede substituirse añadiendo al medio de cultivo una substancia muy oxidable, susceptible de absorber el oxígeno. He aquí la fórmula de Liborius:

Agar ordinario	1,000	gramos
Glucosa	20	»
Sulfoindigotato de potasa	1	»

Se llenan los tubos de este medio y se siembra por picadura.

COLORACIÓN DE LOS MICROBIOS

La coloración de los microbios tiene gran importancia, no sólo porque con ella podemos estudiar las formas de los microbios sino también para diagnosticar las especies.

Pero no todos los gérmenes se dejan impresionar del mismo modo por las materias colorantes, pues los hay que se dejan teñir fácilmente y retienen el color aun después de tratados por el alcohol, hay otros que lo pierden fácilmente después de sufrir los efectos de esta última substancia, y hay, en fin, otros que se les puede teñir con mucha dificultad. Estos, en cambio, son muy difíciles de desteñir.

Las materias colorantes de que nos servimos para el teñido de los microbios, han sido divididas por Ehrlich en *básicas* y en *ácidas*.

Las primeras son aquellas cuyo principio colorante es una base combinada con un ácido incoloro. Constituyen los verdaderos colorantes de los microbios, siendo los más frecuentemente usados el cristal violeta, el violeta de genciana, la fucsina, el violeta de metilo, el azul de metilo, etc.

En las materias colorantes ácidas, el principio colorante es un ácido combinado con una base. Se

diferencian de los colorantes básicos en que no tienen elección por los elementos que tiñen, sino que lo coloran todo indistintamente. De esta clase son : la eosina, la fluorescina, la fucsina ácida, el picrocarmin, etc.

Para fijar y hacer más rápida la coloración de los microbios, se emplean además los *mordentes*, que á la vez se combinan con la materia colorante y con el tejido ó microbio que se quiera colorear. Los mordentes que de ordinario se usan son : el ácido fénico, acético, tanino, yodo, bromo, bicloruro de mercurio, potasa cáustica, amoniaco, borato de sosa, carbonato de amoniaco, etc., ó bien una mezcla de dos materias colorantes, de las que una de ellas juega el papel de mordente.

En bacteriología, las soluciones mordentes que más se usan son :

FUCSINA FENICADA DE ZIEHL

Fucsina rubina.	1 gramo
Agua fenicada	5 »
Alcohol absoluto	10 cc.
Agua destilada	100 »

VIOLETA DE GENCIANA FENICADO

Violeta de genciana	1 gramo
Ácido fénico	2 »
Alcohol absoluto	10 cc.
Agua destilada	100 »

THIONINA FENICADA (Nicolle)

Thionina	0'50 á 1 gramo
Ácido fénico.	1 »
Alcohol de 90°	10 cc
Agua destilada,	100 »

AZUL DE METILENO FENICADO (Kuhne)

Azul de metileno	1.5 á 2 gramos
Ácido fénico.	2 »
Alcohol absoluto	10 cc.
Agua destilada	100 »

La coloración de los microbios puede hacerse *en vivo* ó bien en preparaciones desecadas. Por el primero de estos dos modos se observa la movilidad de los gérmenes, y ello se consigue empleando soluciones acuosas de vesubina, azul de quinoleína, verde de metilo, etc.

Para este examen se pone sobre el portaobjetos una gota de cultivo, se coloca el cubreobjetos, y en uno de sus bordes se echa una gota de la solución acuosa colorante, que va penetrando por capilaridad hasta teñir los microbios.

Las preparaciones desecadas tienen la ventaja de poder ser conservadas por mucho tiempo. He aquí la manera de hacer el teñido de una de dichas preparaciones: echar una gota de cultivo sobre el portaobjetos sujetado por su extremo con una pinza de Cornet ó de madera y distender la gota con una varilla de vidrio ó con un capilar. Desecar la preparación pasando con rapidez dos ó tres veces el portaobjetos por la llama de un mechero Bunsen. Viértase sobre el portaobjetos tres ó cuatro gotas de una mezcla de alcohol y éter (alcohol 50 cént. cúb. y éter rectificado 50 cént. cúb.) y déjese evaporar. Echar dos ó tres gotas de la solución colorante y dejarla en contacto un minuto. Lavar la preparación en agua, dejarla secar y llevarla al microscopio para su examen.

COLORACIÓN POR EL MÉTODO DE GRAM. — Hay microbios que si se tiñen con un color básico de paraosanilina en solución en anilina, ó fenicada, y acto seguido se hace obrar sobre la preparación un mordente especial á base de iodo, no se decoloran por la acción de los disolventes, tales como el alcohol absoluto. En cambio, hay otros que tratados por el mismo procedimiento, se decoloran fácilmente.

De los gérmenes que se colorean se dice que toman el *Gram*, y cuando se decoloran se dice *que no lo toman*. El método de Gram sirve, además, para diagnosticar las bacterias.

La fórmula del líquido de Gram es la siguiente;

Iodo	1 gramo
Ioduro potásico.	2 »
Agua destilada	300 cent. cúb

Aunque como decolorante, se emplea el alcohol absoluto, puede substituirse no obstante por el aceite de anilina puro ó por el alcohol acetona en esta proporción :

Alcohol absoluto.	5 partes
Acetona	1 »

En resumen, para practicar el método de Gram hay que preparar un portaobjetos, colorear, tratar por la solución iodurada, lavar, secar, tratar por el alcohol, volverla á lavar y examinar la preparación al microscopio.

No obstante de que el método anterior es de uso más corriente, hay otro ideado por Claudius, que ofrece todas las ventajas del Gram. Para el método

de Claudius se necesita : una solución acuosa de violeta de metilo al .1 por 100, ó bien la solución de violeta de genciana fenicada y una solución de ácido picrico en esta proporción:

Solución saturada de ácido picrico	1 vol.
Agua destilada	1 »

COLORACIÓN DE LAS CÁPSULAS
ESPOROS
Y FLAGELOS MICROBIANOS

Hay microbios que están envueltos por una substancia brillante, hialina á la que se ha dado el nombre de *cápsula*. Esta cápsula puede verse si utilizamos ciertos modos de coloración.

He aquí la manera de hacerlo :

Tómese un portaobjetos, extiéndase en él una pequeña porción de cultivo, y después de haber fijado y secado la preparación, colorearla con una gota de la siguiente mezcla :

Acido acético.	1 gramo.
Solución alcohólica de violeta de genciana	5 cc.
Agua destilada	100 gramos.

Déjese obrar sobre la preparación por espacio de un miuto, y después de transcurrido este tiempo, secarla y montarla en bálamo.

En cuanto á la coloración de los esporos, no hay que olvidar que el protoplasma de los mismos no se impregna con tanta facilidad como el de las bacterias. Los esporos se hallan envueltos por una membrana que resiste la penetración de las sustancias colorantes, corrientemente empleadas para teñir los microbios.

Hay métodos de coloración que tiñen el espora y el microbio de una manera uniforme, y hay otros llamados de doble coloración, que dan tinte diferente al espora y al microbio de tal modo, que se distingue mucho mejor que con los primeros.

Para teñir un espora por simple coloración, se prepara una laminilla con cultivo y se pasa ocho ó diez veces por la llama de un mechero Bunsen, teniendo cuidado de hacerlo á distancia para no carbonizar la preparación.

Después de esto se colorea con el violeta fenicado durante 15 ó 30 minutos. Lavar la preparación, secarla y montarla en bálsamo. Los microbios y sus esporos se ven de igual color.

El principio de la coloración doble ó de contraste, se basa en que los esporos se colorean con dificultad, pero una vez teñidos conservan energicamente las sustancias colorantes y resisten á las que decoloran los bacilos.

Según Besson, uno de los procedimientos muy recomendables consiste en hacer una preparación, secarla y fijarla, pasándola dos ó tres veces por la llama, y echar sobre dicha preparación una gota de fucsina de Ziehl, calentándola hasta que produzca vapores y procurando que dure la acción

del líquido caliente cinco minutos. Los esporos se tiñen de color rojo muy intenso. Lavar la preparación con agua y depositar una solución de :

Acido nítrico puro.	Una parte.
Agua destilada	Tres »

Con esta solución los bacilos se destiñen, pero no los esporos.

Lavar la preparación con agua abundante y echar sobre la misma una gota de solución hidroalcohólica de azul de metileno, dejándola en contacto por espacio de medio á un minuto.

De este modo los microbios, que antes fueron desteñidos por el ácido nítrico, se colorean en azul y los esporos conservan el color rojo, con lo cual pueden distinguirse perfectamente.

El mismo autor aconseja que, para la bacteridia carbuncosa, se use como decolorante el alcohol absoluto.

Si pretendemos colorear los flagelos ú órganos locomotores de algunos microbios, deberemos utilizar ciertos procedimientos de coloración algo complicados. Esta operación puede hacerse en bacterias vivas y en bacterias desecadas.

Para las primeras, tomaremos una gota de cultivo en caldo y la pondremos sobre un portaobjetos, añadiendo acto seguido una gota de solución de Ziehl diluida en tres ó cuatro partes de agua, y mezclando el cultivo con la gota de materia colorante.

Colocar un cubreobjetos y examinar la preparación con el objetivo de inmersión.

En esta disposición se ve, que los bacilos se han coloreado en rojo y los flagelos en rosa pálido.

Si los flagelos que tengamos que teñir son de bacterias desecadas, operaremos de la manera siguiente:

Tómese una pequeña cantidad de cultivo en agar y diluirla en un vidrio de reloj en agua destilada hasta que resulte una disolución absolutamente homogénea.

Con una pipeta se deposita una gota de esta emulsión sobre una laminilla perfectamente limpia, previamente pasada por la llama y sostenida con una pinza. Es necesaria la limpieza de la laminilla, porque de no ser así, el líquido no se esparce bien por la superficie de la misma. Mover la laminilla en varios sentidos, para que la disposición del líquido resulte uniforme. No fijar la preparación y dejarla secar á la temperatura ordinaria. En esta disposición, la preparación está á punto de soportar la acción de los líquidos colorantes.

Para la coloración de los flagelos pueden seguirse varios procedimientos. Uno de los más recomendables es el de Nicolle y Morax, que se practica como sigue:

Se echa una gota de fucsina y se calienta en la llama del mechero durante ocho ó diez segundos. En cuanto aparecen los vapores, se retira la preparación y se lava, repitiendo la operación de teñido y lavado de la misma dos ó tres veces. Echar sobre la laminilla una gota de Ziehl y calentarla hasta que se produzca vapor. A continuación se lava con agua y ya está en disposición de poder examinarse.

ANIMALES QUE SE UTILIZAN EN BACTERIOLOGÍA

La comprobación de ciertas enfermedades microbianas, exige muchas veces la inoculación á otros animales de microbios ó de productos patológicos que los contienen.

Empero los animales que se utilizan en los laboratorios para las inoculaciones, deben reunir algunas cualidades que hay que tener en cuenta.

La receptividad á las enfermedades que deseamos comprobar, nos hace echar mano de un animal que la posea.

Por lo general, son animales pequeños los que se utilizan, porque no son muy caros, se encuentran con facilidad y no es grande el coste de su manutención.

La docilidad es otra de las condiciones que deben tener los animales de experimentación. En este concepto, los roedores pequeños como el conejo, rata blanca y el cobayo, sirven perfectamente.

Téngase en cuenta que los animales de laboratorio necesitan ciertos cuidados. Así los locales donde los tengamos deberán ser espaciosos, aireados

y de fácil acceso á la limpieza cuando convenga lavarlos.

Es preferible que las cajas que los contengan sean metálicas y que estén sueltas.

Es mala costumbre la de poner una jaula sobre otra, porque los líquidos ó deyecciones de las jaulas superiores ensucian las inferiores. La calefacción del local donde tengamos á los animales es importante, especialmente en invierno. Cada día habrá que limpiar las jaulas, y después de hecha la limpieza se lavarán con una solución fuerte de un antiséptico, que puede ser el ácido fénico, la creolina, etc., ó bien mojarlas con alcohol y quemarlo, ó pasarlas por lo llama del mechero. A los inoculados se les aísla, y en la puerta de la jaula se pone una etiqueta que indique la fecha y naturaleza de la inoculación.

Los conejos, cobayos y ratas blancas se reproducen con facilidad en el laboratorio, y por esto conviene separar los machos de las hembras en gestación porque con frecuencia se destruyen las crias.

Las ratas grises y los ratones domésticos hay que tenerlos separados, pues de lo contrario se matan unos á otros.

Los animales de laboratorio están expuestos á padecer algunas enfermedades contagiosas, que á veces los diezman por completo. En los conejos se presentan á veces abscesos voluminosos que se desarrollan en diferentes regiones del cuerpo y están formados por un pus fétido. Dichos abscesos producen un estado de caquexia y la muerte.

Otra enfermedad del conejo es la acariasis de la oreja, que invade rápidamente este órgano y ocasiona trastornos nerviosos graves, que consisten en crisis epileptiformes.

Las septicemias producen, á veces, estragos en los conejares. Como síntomas de estas afecciones, se observa deyección nasal y diarrea. A la autopsia se ven lesiones de bronconeumonía. La pasteurelisis, que produce muchas bajas entre los conejos, se caracteriza por diarrea, colecciones en las pleuras, pericardio y peritoneo, y congestión del pulmón é intestino.

El coccidium oviforme ataca á los conejos y hace que sea una enfermedad temible por la mortalidad que ocasiona.

Aun cuando la docilidad de los animales que tengamos que utilizar sea propia de ellos, no hay que fiarse mucho porque se defienden é intentan agredir á quien los maneja. Los mordiscos ú otras heridas que pueden ocasionar al manipulador, no siempre están exentas de peligro, ya que en algunas ocasiones pueden ser causa de transmisión de enfermedades de los animales al hombre.

Para evitar, pues, que ocurran estos accidentes, hay que echar mano de ciertos medios de contención que puede hacerse con las manos ó bien mediante algunos aparatos. Según sean las operaciones que se hayan de practicar, el operador es suficiente para la sujeción de los animales. Si las inóculaciones tienen que hacerse en las meninges, venas ó en el peritoneo, se necesita el auxilio de una persona que los sujete.

Para sujetar al conejo, por ejemplo, se le coge por la piel del dorso ó bien por una oreja, y de este modo evitaremos que nos arañe ó nos muerda.

La contención instrumental se practica por medio de ciertos aparatos apropiados para cada especie animal.

En los casos en que se crea conveniente, puede recurrirse á la anestesia, á cuyos efectos es muy sensible el conejo. No es conveniente practicarla lentamente y á pequeñas dosis, porque mataríamos seguramente al animal. Es mejor hacerle inhalar una dosis grande y suspender la inhalación á los pocos instantes, evitando de esta suerte los accidentes que pudieran ocurrir.

El cobayo es de más fácil manejo que el conejo, bastando de ordinario sujetarlo con la mano izquierda y hacer la inoculación con la derecha. No es tan sensible á los anestésicos como el conejo, y si se quisiera practicar la anestesia, hay que proceder del mismo modo que para dicho animal.

La contención de las ratas se hace cogiéndolas por la cola con unas pinzas y tirándola fuera de la jaula. La inoculación se hace en la base de la cola. Si pretendemos hacerlo en un miembro posterior, lo sujetaremos con las pinzas del mismo modo como hemos dicho para la cola.

La rata gris es la que se defiende con mayor energía y muerde más que las otras, por cuya razón no debe intentarse su sujeción si no es con las pinzas, por la piel de la nuca y del dorso.

Para las inoculaciones difíciles y peligrosas, es preferible siempre emplear los anestésicos.

El procedimiento consiste en introducir una compresa de algodón empapada en éter (el cloroformo suele matarlas) en la jaula.

El perro es uno de los animales que no debemos operar sin ponerle antes un bozal, que á falta de uno *ad hoc* podemos improvisarlo con un cordel, que se pasa por los colmillos, se da la vuelta por el hocico y se ata en el cuello.

En muchos casos basta la contención manual, pero para las operaciones de larga duración es preciso sujetarlo con aparatos especiales.

Para practicar las inoculaciones se necesitan instrumentos variados, tales como bisturís, pinzas, tijeras, erinas, agujas para sutura, agujas de Deschamps, etc., cuyos instrumentos deben esterilizarse previamente en horno de Chautemesse, ó bien sumergirlos en agua hirviendo por espacio de diez minutos y colocarlos luego en una solución de oxicianuro de mercurio al 1 por 1,000.

Las jeringuillas para inoculaciones son los instrumentos que con mayor frecuencia se usan en los laboratorios. Su mejor disposición debe consistir en ser de fácil esterilización, ya por el agua hirviendo ya por el vapor á presión, en que el émbolo tenga resistencia, sea de duración y que esté bien dosificada la capacidad. Entre las más recomendables hay la de Roux, que es de una capacidad de 20 centímetros cúbicos, y la aguja se une al pitón por medio de un tubo de cauchú, de 10 centímetros de longitud, merced al cual puede hacerse la inyección sin peligro de que se mueva la aguja.

A pesar de lo mucho que se usa la jeringuilla de

Roux, hoy son preferibles las de vidrio por su baturata y fácil esterilización.

Las agujas que corrientemente se usan en los laboratorios son de acero, y aun cuando tienen el inconveniente de oxidarse con facilidad, es cosa que se evita lavándolas después de haberlas usado y poniéndolas después de haberlas hervido en un frasquito de alcohol absoluto ó de borato de sosa. El calibre y la longitud de las agujas es variable con arreglo al uso que se les tenga destinado.

Conviene tener presente, que antes de practicar las inoculaciones es preciso cortar el pelo de la región con unas tijeras y desinfectarla. Sin embargo, con la pasta depilatoria, compuesta de tres partes de sulfuro de sodio, diez de cal viva en polvo y diez de almidón, mezcladas en el acto en que deba usarse, y diluidas en un poco de agua para que forme una pasta blanda que se aplica sobre la piel, se produce la depilación á los tres minutos.

La desinfección de la piel se hace frotándola con huata mojada en una solución de oxicianuro de mercurio ó de sublimado al 1 por 1,000, lavando antes la piel con alcohol y jabón por medio de una brocha ó cepillo y secándola con un papel estéril.

Cuando queramos inocular por vía intradérmica, conviene afeitar la región sin usar antisépticos y hacer escarificaciones superficiales con un bisturí, ó bien levantar la epidermis rascando con la hoja del bisturí sujeta entre los dedos. Hecho lo que antecede, se fricciona la parte con un poco de huata esterilizada é impregnada de virus, sujeta por medio de unas pinzas.

En ciertos casos basta frotar la piel con algodón impregnado de virus, sin que haya necesidad de escarificar la parte.

Debe procurarse que la inoculación se haga en una región que no esté al acceso del animal inoculado, y para conseguirlo deben elegirse la cara dorsal de las orejas, la piel del dorso ó base de la cola.

Las inoculaciones en las mucosas se practican haciendo una escoriación, raspando con el bisturí y aplicando el virus sobre ella. Hay ocasiones en que conviene cauterizar la mucosa con objeto de producir una escara superficial.

La técnica de las inoculaciones subcutáneas, se hace tomando un pliegue de la piel é introduciendo la aguja sin picar los músculos. Acto seguido se inyecta el líquido que se quiere inocular, y procurando que no refluya por la picadura.

Cuando las sustancias que sirven para la inoculación son sólidas, después de haber rasurado la región se hace una incisión pequeña con el bisturí, guiado por la sonda acanalada, y en la cavidad que resulta se introduce la sustancia que se quiere inocular.

Si la inoculación ha de ser intramuscular, basta clavar la aguja profundamente, inyectar y retirarla. Los músculos en que se inocular con más frecuencia son los del muslo en los animales mamíferos y los pectorales en las aves.

Las inoculaciones intravenosas se hacen en las venas superficiales, sin que sea necesario incidir la piel de la región, bastando para ello atravesar

piel y vaso con la aguja. Estas inoculaciones sólo pueden hacerse en animales que tengan bien ostensibles las venas. A los conejos se practica en la vena dorsal de la oreja ó en la marginal externa, puesto que las venas medianas, por hallarse rodeadas de tejido conjuntivo, resbalan por la punta de la aguja.

En los cobayos la vena de elección es la yugular. Las auriculares tienen un calibre muy pequeño, y la yugular externa tiene la ventaja de que, además de ser de suficiente calibre, es superficial. Para la inoculación intravenosa yugular, hay que incidir antes la piel y el panículo carnoso. Los otros tiempos de la operación se reducen á clavar la aguja, inyectar y lavar la herida con agua fenicada.

La inoculación en las arterias se practica en la arteria femoral y en la carótida. Si la hacemos en la primera, hay que colocar al animal en posición dorsal y apartar hacia fuera el miembro en que queremos operar. Acto seguido se procede á desinfectar la región y á buscar el vaso. Este se encuentra con facilidad por los latidos ó pulsaciones que da al aplicar los dedos en medio del pliegue de la ingle.

Inmediatamente se procede á incidir la piel y tejido conjuntivo siguiendo la dirección del vaso, y á seccionar la aponeurosis con la sonda, que permite observar el paquete vásculo nervioso. Una vez reconocida la arteria femoral, se clava en ella la aguja en dirección oblicua, se inyecta el contenido de la jeringuilla y se retira.

La herida que hemos ocasionado para poner al

descubierto el vaso, se sutura y encima se aplica una capa de colodión.

Cuando tengamos que operar en la arteria carótida, colocaremos al animal en posición dorsal, y esquilada y desinfectada la región pondremos en extensión la cabeza é incindiremos la piel en la línea media por delante de la tráquea. Con la sonda acanalada destruiremos la aponeurosis que une á los músculos externomastoideos, así como el tejido celular que destruiremos con la punta de dicha sonda.

El tamaño del vaso y las pulsaciones permitirán la distinción de la vena, de la arteria. La inyección se hace del mismo modo como se ha dicho para la arteria femoral.

El peritoneo es otra de las partes de los animales que se utiliza para las inoculaciones y cultivo de microbios.

La posición que se da al animal es como las anteriores, es decir, la dorsal. Desinfectada la región y afeitada, se toma con las pinzas un pliegue de piel y músculos del abdomen.

Se clava la aguja en la base del pliegue, de manera que la punta salga por el lado opuesto, y en esta disposición se retira dirigiendo la punta hacia el vientre, atravesándolo é inyectando el contenido en la cavidad del abdomen.

El peligro que existe al practicar la inoculación intraperitoneal, es de perforar un intestino, cosa que hay que evitar siempre.

Para que esto no ocurra con tanta facilidad, podemos servirnos de una aguja curvada que lleva un agujero en su parte media.

Con dicha aguja se atraviesa la base del pliegue de la piel del abdomen, sale la punta hacia la parte opuesta del pliegue cutáneo, y el agujero de la aguja se halla colocado en la cavidad del vientre. Como quiera que la punta de la aguja se halla fuera, por esta razón no hay que temer la perforación del intestino.

Para inocular sustancias sólidas, se incide la piel en extensión que varía según el tamaño que tengan las que hayan de servir para ello.

Se corta la aponeurosis á nivel de la línea blanca, sirviéndonos de la sonda acanalada, y con una pinza de forcipresión se tira hacia arriba el labio de la herida, con objeto de evitar la salida del intestino, introduciendo dentro del vientre la sustancia que queremos inocular.

En seguida se sutura con seda la aponeurosis primero, y luego la piel, y, sobre la sutura, se aplica una capa de colodión.

La inoculación intraperitoneal requiere una delicada asepsia y una gran pureza del producto que se inocular, porque de no ser así, el animal sucumbe con rapidez por peritonitis.

CULTIVO DE LOS MICROBIOS EN SACOS DE COLODIÓN

Por medio de los sacos de colodión se consigue cultivar los microbios sin que sean atacados por los leucocitos. Este procedimiento fué ideado por Metchnikoff, Roux y Salimbeni, en las investigaciones que hicieron acerca de la toxina del vibrión del cólera. Tiene la ventaja de que el colodión no deja pasar los microbios ni las células, y no impide los fenómenos de ósmosis, que modifican la composición del medio de cultivo en los sacos y permite que por el organismo se difundan las toxinas elaboradas por los microbios.

Sin embargo, no todas las toxinas pasan del todo los sacos de colodión, siendo las que más fácilmente lo atraviesan, según Crendisopoulo y A. Ruffer, las materias inunizantes.

Para preparar los saquitos es necesario disponer, en un frasco de boca ancha, de colodión que

tenga consistencia algo parecida á la del jarabe resinado, ó no, tubos de vidrio de 6 milímetros de diámetro, un tubo de ensayo, hebra de seda y tapones cónicos de caucho.

Teniendo á nuestra disposición lo que antecede, se comienza por pasar por la superficie inclinada del colodión, la parte interior del tubo de ensayo, dándole movimiento de rotación no rápido y procurando que el contacto dure un tiempo variable, según se quiera obtener sacos de paredes recias ó delgadas. Se retira el tubo del contacto del colodión y se le dan vueltas por los dedos durante un minuto y se deja secar el colodión hasta que adquiera consistencia semiblanda. La capa próxima al extremo superior del tubo se corta circularmente, se despega despacio con la uña del dedo pulgar y se invierte luego á modo del dedo de un guante. El saco se distiende, insuflando aire en su interior. En la abertura del saco se introduce un tubito de vidrio que se sujeta con algunas vueltas de hilo de seda, y por el tubito se pone agua en el saco.

Como quiera que la preparación de los saquitos de colodión es bastante entretenida, es más práctico adquirirlos de los que comercialmente se expenden ya preparados.

Los sacos de colodión se conservan prendidos de un hilo y dentro de un frasco ó de tubos de ensayo, tapados con huata y con un poco de agua en el interior.

Para sacar los sacos del frasco ó tubo en que están contenidos, se usa una pinza pasada por la

llama. Con una pipeta se aspira el agua del saco y se la substituye por el caldo de cultivo, sembrado con los gérmenes que convenga estudiar.

El orificio del tubo de los sacos de colodión se tapa con un tapón de cauchú y la parte que sobresale se corta y se recubre con colodión.

Además de las vías de inoculación de que hemos hablado, hay otras, tales como las de las vías biliares del cobayo, conejo y perro, la inoculación en la vena porta, riñón, etc., que no describimos porque este *memorándum* no tiene la pretensión de ser un tratado de técnica bacteriológica. Empero, no podemos dejar olvidadas las inoculaciones intraoculares, que tienen gran importancia para el diagnóstico de la rabia, para el estudio de la tuberculosis ó para los fenómenos de la fagocitosis.

Si queremos inocular sustancias líquidas en la cámara anterior del ojo hay que hacer lo siguiente: Sujetar al animal por el abdomen é inmovilizar la cabeza, echar algunas gotas de solución de clorhidrato de cocaína al 1 por 50, con objeto de anestesiar el ojo, cosa que se consigue á los diez minutos.

Con los dedos pulgar é índice de la mano izquierda se separan los párpados y se clava la aguja perpendicularmente al eje del ojo, en el borde de la córnea, punto de unión con la esclerótica. Se inyectan algunas gotas del líquido y se retira la aguja.

Cuando se trata de inocular sustancias sólidas, después de haber practicado previamente la anestesia ocular, se hace una incisión de algunos mili-

metros con un escalpelo fino ó con un cuchillo de operar cataratas, en el borde superior de la córnea. A través de esta incisión, con una aguja acodada se introduce la porción de substancia que queremos inocular, hundiéndola lo más que se pueda en la cámara anterior del ojo y friccionando ligeramente la córnea para que penetre con más facilidad.

Las vías respiratorias se utilizan también para las inoculaciones.

Para la inoculación intrapulmonar se afeita la piel del tórax, y una vez aseptizada, se introduce perpendicularmente la aguja á nivel de uno de los primeros espacios intercostales, se inyecta el líquido de la jeringa y se retira la aguja.

Si la inoculación es intratraqueal y se practica en animales pequeños, hay que sujetarlos en posición dorsal, colocando la cabeza en extensión.

Desinfectada la región, se incide la piel por delante de la línea media del cuello, se separa la aponeurosis, y una vez la tráquea al descubierto, se clava oblicuamente la aguja de arriba abajo por el espacio de dos anillos traqueales y se inyecta lo que se quiera inocular. Una vez terminada la inyección, se retira la aguja y se lava la herida con algodón mojado en agua fenicada.

En las inoculaciones intratraqueales debe evitarse inocular el tejido celular, para lo cual se aconseja operar de la manera siguiente:

Con un trocar delgado provisto de su cánula y más corto que la aguja de la jeringa, se atraviesa un espacio interanular de la tráquea previamente

puesta al descubierto. Así que la cánula está clavada, se retira el trocar y por ella se introduce la aguja de la jeringa y se inyecta, cuidando, una vez terminada la operación, de quitar primero la aguja y luego la cánula.

El último tiempo de la práctica de las inoculaciones intratraqueales se reduce á la sutura de la herida, que se cubre con una capa de colodión.

Para la inoculación intrapleural hay que colocar al animal en posición lateral izquierda, afeitar y desinfectar la región del lado derecho, como es de rigor en todas las inoculaciones. En la parte media del sexto espacio intercostal se hace una incisión de tres centímetros de largo, paralela á la costilla y que debe interesar la piel, el tejido conjuntivo subcutáneo y el músculo intercostal externo.

Con una aguja de punta roma previamente esterilizada, que está perforada por un lado y se une á la jeringa por medio de un tubo de cauchú, se perfora el espacio intercostal en dirección ligeramente oblicua, y con ello la pleura parietal. La pleura visceral es impelida, junto con el pulmón, por la punta roma de la aguja, y en este momento es cuando se hace la inyección.

Así que se ha retirado la aguja, se sutura la piel y se aplica una capa de colodión sobre la sutura.

Si se quiere inocular por inhalación y pulverización, debe colocarse en el primer caso el animal en un cajón de metal que lleva en una de sus partes un vidrio para poderlo observar y en otro lado dos agujeros tapados con huata no muy apretada

que permita la renovación del aire. Por otro agujero se introduce el tubo del pulverizador, que lleva la substancia á inhalar. La pulverización puede hacerse con un aparato de Richardson, siempre que el virus sea susceptible de tolerar la desecación sin atenuar su actividad.

Sin embargo, se aconseja derramar el líquido de cultivo sobre polvo de carbón muy fino ó de lycopodio y mezclarlo intimamente. En esta disposición, se deja secar en una campana de las de hacer el vacío y cuando está seco se insufla en la caja por medio de un fuelle ú otro aparato de insuflación.

Como quiera que esta operación no está exenta de peligros, conviene que el operador la practique al aire libre, para evitar el que pueda inspirar el polvo contaminado.

Las inoculaciones intracraneanas se hacen en el perro, conejo y cobayo.

El *modus operandi* es el siguiente: Sujetar al animal en posición abdominal y mantener la cabeza con el auxilio de un ayudante.

Afeitada y desinfectada la piel del cráneo, se practica una incisión en la línea media que divida la piel y la aponeurosis. Separar los labios de la herida y con un trépano de corona pequeña (cinco milímetros), perforar la caja craneana teniendo gran cuidado de no herir el cerebro. Vencida la resistencia del hueso, levantar el disco hecho con el trépano, con el elevador y extraerlo con una pinza. En el fondo de la herida aparece la duramadre, que se atraviesa con la aguja en dirección

oblicua para no lesionar el encéfalo y en esta disposición se inyecta el líquido. Se retira la aguja, se lava la herida con agua fenicada, se sutura la piel y se cubre con colodión.

También puede practicarse la inoculación intracraneal sin el trépano, sirviéndonos de un estilete para perforar el cráneo, inyectar por el orificio hecho la toxina, lavar la herida y suturarla.

Cuando se quiere inocular á los animales por las vías digestivas, se mezcla el cultivo microbiano con los alimentos, ó bien, si se trata de animales pequeños se les echa en la boca por medio de una pipeta de Pasteur procurando que tengan la cabeza en posición elevada.

Otras veces se recurre á la sonda que se introduce por la vía esofágica y por dicha sonda se vierte el líquido. El calibre de las sondas esofágicas ha de estar en relación con el tamaño de los animales.

A las aves se las hace ingerir las sustancias virulentas mezcladas con harina en forma de bolitas, que se colocan en la base de la lengua y cerrando el pico con los dedos, para que sean deglutidas.

Las inyecciones intestinales exigen la abertura de la cavidad abdominal. Con unas pinzas, se coge una asa y con la aguja de la jeringa se atraviesa en dirección oblicua y se inyecta. Limpiar el asa con agua fenicada y suturar la aponeurosis y la piel.

Como complemento de las inoculaciones, viene la observación de los animales inoculados, cosa que no debe pasar inadvertida, sobre todo cuando se estudia una enfermedad experimental. Las le-

siones locales, la temperatura, la pérdida de peso, el aspecto exterior, etc., son cosas que reclaman la atención del experimentador.

Siendo practicadas muchas veces las inoculaciones como medios de comprobación de enfermedades que sirven para aclarar diagnósticos, es natural pensar que, en muchas ocasiones, determinan la muerte de los animales en quienes se experimenta. Y, para conocer las lesiones que en ellos ha producido la muerte, es preciso hacer la autopsia. Por otra parte, las autopsias permiten poder recoger los productos patológicos como la sangre pulpa de los órganos en los que se puede observar los gérmenes inóculados y recogerlos para cultivarlos.

La práctica de las autopsias debe hacerse teniendo en cuenta algunas reglas.

No debe ensuciarse la mesa donde se hagan, con los productos procedentes de los cadáveres, colocándoles, para evitarlo, en unos recipientes metálicos, de cobre ó de zinc. Procurar no tocar el cadáver con las manos, sirviéndonos de pinzas de disección.

Esterilizar los instrumentos antes de utilizarlos para la autopsia, por que si no podrían contaminar los órganos que con ellos estuvieran en contacto.

Las autopsias se practican inmediatamente de haber muerto el animal, y en cuanto se hayan acabado de hacer, debe quemarse el papel, algodón, etcétera, y sumergir los recipientes en agua hirviendo.

El instrumental que sirve para las autopsias con-

siste en : escalpelos, bisturís, pinzas de disección, tijeras, pipetas, hilos de platino enmangados, lámparas de alcohol ó mecheros de Bunsen, y matraces con caldo, ó tubos con agar para las siembras.

La técnica seguida para las autopsias varía según los animales, y los cadáveres se sujetan por medio de hilos atados en los miembros ó por medio de agujas.

Antes de abrir los cadáveres conviene cortarles el pelo ó las plumas y es muy buena costumbre la de mojarlos, con lo cual se evita que se diseminen. El líquido que se usa para mojar la región es un antiséptico de los ordinarios.

Generalmente, el orden seguido en la abertura de cavidades, al practicar las autopsias, es comenzando por el tórax y continuando luego por la cavidad abdominal. De no hacerlo así, nos expondríamos á ensuciar la cavidad torácica si empezáramos primero por aquélla.

Para abrir el tórax, se coge el apéndice xifoides del esternón con una pinza resistente, se tira hacia arriba y por la abertura se introducen las puntas de las tijeras, cortando primero los cartilagos esternales de un lado y luego los del otro. Levantada esta coraza, que resulta de la sección, quedan visibles el pulmón y el corazón. Si se quiere recoger líquido del pericardio, se coge la serosa con unas pinzas pasadas por la llama y con una pipeta muy caliente se perfora dicha membrana, con lo cual se consigue cauterizar la serosa evitando la contaminación, y en esta forma se aspira el líquido del pericardio.

Si conviene recoger sangre del interior del corazón, no hay más que calentar al rojo la varilla de hierro, hacerla penetrar é introducir por la escara la punta de una pipeta y aspirar la sangre. Igual manipulación se hace cuando se quiere recoger jugo pulmonar.

Para tomar líquido peritoneal, después de haber levantado con una pinza la pared muscular, se practica una pequeña abertura con la lámina de un bisturí muy calentado y por ella se introduce la pipeta y se aspira el líquido.

Para la autopsia de los centros nerviosos hay que colocar el cadáver en posición abdominal y practicar una incisión desde la nariz hasta el sacro, siguiendo la línea marcada por las apófisis espinosas separando las masas musculares de modo que queden bien descubiertas las láminas vertebrales.

El encéfalo se pone al descubierto, levantando el hueso frontal. Si existe líquido en las meninges, antes de recogerlo se cauteriza la superficie de dichas membranas y por el centro de la escara se introduce la punta de la pipeta.

La pulpa de la substancia nerviosa hay que tomarla rasgando con dos pinzas las membranas que envuelven el encéfalo, cauterizar é introducir una pipeta y aspirar con fuerza. En vez de la pipeta podemos servirnos de la punta del bisturí, ó del hilo de platino.

Inmediatamente de haber recogido el material en los cadáveres, se procede á su examen.

Si el líquido que vamos á examinar es sangre,

depositaremos una gota en un portaobjetos y lo recubriremos con un cubreobjetos, apretando suavemente ambos para que se extienda el líquido, y acto seguido se hace la inspección microscópica.

Empero el examen de los líquidos, previa coloración exige una técnica algo diferente de la precedente, sobre todo en lo que á la fijación se refiere. El calor altera la morfología de las células y hay que utilizar un medio para evitarlo. Para ello, la mezcla de alcohol y éter es muy á propósito. Sobre el portaobjetos en que hayamos puesto la gota de sangre ú otro líquido, se vierten dos ó tres gotas de la mezcla alcohol-éter y se deja evaporar al aire libre. Fijada la preparación se procede á colocarla usando la doble coloración que permite distinguir los gérmenes de los elementos celulares. Esto es fácil de conseguir para los microbios que toman el Gram, pero cuando no es así, hay que recurrir á procedimientos más delicados.

El de Gram se hace de la manera siguiente;

Se echa sobre la preparación una gota de violeta de genciana, y se deja en contacto con ella por espacio de tres ó cuatro minutos. Sin lavar la preparación se echan algunas gotas de líquido de Gram, que se deja en contacto durante un minuto hasta que la preparación adquiera una coloración negruzca.

Acto seguido se lava la preparación con agua destilada, se decolora por el alcohol absoluto hasta que ofrezca un color gris pálido.

Después de esto, se vierte en la preparación una

gota de solución de eosina en la siguiente proporción :

Eosina soluble en el agua 1 gramo.
Agua destilada. 200 cc.

Lavar, secar la preparación y examinarla al microscopio.

En las preparaciones así obtenidas, el fondo aparece teñido en rosa y los microbios en violeta.

COLORACIÓN DE LOS MICROBIOS EN LOS TEJIDOS QUE LOS CONTIENEN

Para esto es necesario hacer cortes muy finos en los tejidos, y como que los que pudiéramos hacer con la mano armada de un instrumento cortante no serían muy regulares, necesitamos servirnos de instrumentos especiales que se conocen con el nombre de microtomos. Los de uso más corriente son los de Minot.

El empleo del micrótopo para cortar los tejidos hace necesaria cierta preparación de los mismos. Muchos de ellos no tienen la consistencia necesaria para poderlos cortar bien, y hay que endurecerlos haciendo penetrar en ellos ciertas sustancias. Á esta operación es á lo que se llama inclusión.

El modo de hacer las inclusiones es como sigue: Primero se deshidrata la pieza que tengamos que cortar, sometiéndola durante veinticuatro horas en

alcohol absoluto ó en acetona. A continuación se somete la pieza á un baño de xilol, que varía, según el espesor de los cortes, desde un minuto hasta cinco ó seis horas. Luego se lleva á una mezcla de parafina y xilol en proporción de :

Parafina fusible á 35°	15 gramos.
Xilol	20 »

El tejido á indurar se coloca en un frasco bien tapado que contiene la solución y se lleva á la estufa á la temperatura de 37 á 38°.

Se saca la pieza que se quiere indurar á la solución parafina xilol, y se coloca en otro frasco sin tapar que contiene parafina fusible á 50° y se calienta á 53°.

Para enfriar con rapidez la parafina se lleva en el agua fría, cuidando de no sumergir la pieza del todo hasta que se forme una capa resistente en la superficie de la pieza que se indura. Una vez conseguida ésta, se lleva al micrótopo para proceder á los cortes.

La coloración de los cortes se hace quitando antes de los mismos la parafina que llevan. Véase la manera de hacerlo ; hechos los cortes, se someten en un recipiente que contiene éter, con lo que se consigue la disolución rápida de la parafina. La inmersión en el éter es de algunos minutos á algunas horas, y varía según las dimensiones y el número de los cortes.

Una vez quitada la parafina se llevan los cortes á un cristalizador que contiene alcohol absoluto, y al cabo de algunos minutos se ponen en otro cris-

talizador con agua destilada y de éste á la laminilla para su coloración.

Los métodos de teñido preferibles para los cortes, son los de triple coloración. No obstante, no todos los microbios se colorean por estos métodos.

Para los microbios que no toman el Gram hay procedimientos modernos de doble coloración.

El procedimiento de Weigert, aplicable á la mayoría de los microbios, consiste en echar sobre el corte algunas gotas de violeta de genciana con anilina y dejarlo en contacto la substancia colorante durante media hora. Sumergir el corte durante algunos segundos en un cristizador que contiene una solución de ácido acético al 1 por 200. Lavarlo con agua destilada, deshidratar por medio del alcohol absoluto, aclarar la preparación con la esencia de clavo y el xilol y montarla en el bálsamo del Canadá.

Kühne aconseja un procedimiento, que consiste en colocar los cortes con el azul fenicado ó el azul amoniacal por espacio de quince minutos, lavarlos con agua destilada, someterlos por algunos segundos en el ácido clorhídrico diluido y llevarlos con rapidez en

Solución acuosa saturada de carbonato de litina.	5 cc.
Agua destilada.	100 cc.

Volver otra vez los cortes en el agua destilada, lavarlos con cuidado y dejar que se des sequen en el aire casi por completo. Deshidratar con alcohol

absoluto, aclarar con la esencia de clavo y el xilol y montar la preparación con el bálsamo.

También se recomienda el procedimiento llamado de la tiónina que es como sigue :

Colocar con la solución de tiónina fenicada y dejarla en contacto con los cortes durante varios minutos. Lavar el corte con agua destilada, deshidratar con el alcohol absoluto, aclarar con la esencia de clavo y montar la preparación en el bálsamo.

Para la doble coloración, los técnicos aconsejan tratar el corte con una solución débil de eosina durante unos treinta segundos, hasta que adquiera un color de rosa, lavar con agua destilada, tratar el corte sobre la laminable con el cristal violeta fenicado, echar sobre éste el licor de Gram, que se deja accionar treinta segundos, cambiándolo dos ó tres veces hasta que el corte adquiera color negruzco. Tratar por el alcohol absoluto, aclarar con la esencia de clavo y xilol y montar con el bálsamo.

Únicamente quedan coloreados en violeta los gérmenes que toman el Gram.

EL MICROSCOPIO Y SUS ACCESORIOS

Únicamente á modo de recordatorio, señalaremos en breves líneas, lo que hay que saber de un instrumento tan indispensable para las investigaciones bacteriológicas.

El microscopio consta de una parte mecánica y una parte óptica. La primera comprende el pie, la columna, la platina, la pinza y el tubo principal. El pie, es la parte del instrumento que sirve de apoyo, y la forma es variada, aunque lo que más importa es que sea pesado para que el aparato tenga más estabilidad y permita la inclinación horizontal del tubo.

La columna puede ser simple ó doble y se fija por abajo, en la porción posterior del pie y por arriba soporta el tubo del tornillo micrométrico y la platina.

Esta, consiste en una ménsula horizontal, metálica, de ebonita ó de vidrio, en la que, por medio de unas pinzas, se sujetan las preparaciones que hayan de examinarse. En el centro lleva un agu-

jero por donde asoma el concentrador de la luz ó el diafragma cilindrico y sirve para dar paso á los rayos que emanan del espejo.

Según los modelos, la platina es giratoria y movable en varios sentidos, con lo cual, puede hacerse correr la preparación si así conviene.

La columna es un cilindro que arranca de la parte posterior de la platina y sople ta la pinza ó tubo corto provisto de hendiduras, en la que se desliza el tubo principal del microscopio. En dicha columna, se hallan los mecanismos que permiten el descenso rápido ó lento del tubo y, por tanto, del objetivo, verificándose este descenso por medio de un piñón y una cremallera. El movimiento lento, se efectúa haciendo girar el botón que corona la columna y el cual actúa sobre un tornillo micrométrico. El tubo del microscopio es de latón, ennegrecido en su interior y consta de dos cilindros enchufados, de los cuales el interior puede sacarse para alargar la extensión total del tubo. En el extremo superior, entra el ocular por deslizamiento y en el inferior se coloca el objetivo, ora por atornillamiento, ora por medio del revólver portaobjetivo.

La parte óptica del microscopio la constituyen el espejo, los diafragmas, el aparato concentrador de la luz, el objetivo y el ocular.

El espejo suele ser doble, y en una cara posee un vidrio plano y en la otra cóncavo. Mediante su articulación á la columna, el espejo puede moverse en todas direcciones, lo que permite iluminar la preparación directa ó indirectamente.

Los diafragmas que hoy poseen los microscopios forman parte del aparato iluminador, siendo uno de los más usados el conocido con el nombre de *diafragma iris*, que, merced á una manecilla, permite aumentar ó disminuir el pincel luminoso que ha de iluminar la preparación.

De los aparatos concentradores de la luz, el más usado es el de Abbe, que consiste en dos ó tres lentes de gran abertura, sujetas á una misma montura, y las que á la manera de un objetivo fotográfico de foco muy corto, proyectan en el centro de la platiana, una imagen real muy brillante de la luz que sirve para la iluminación.

Los objetivos, son las partes más importantes del microscopio y en bacteriología se emplean los conocidos con el nombre de objetivos de inmersión. Se llaman así, porque entre la lente frontal y la preparación, se interpone un líquido que en los objetivos ordinarios es el agua destilada, pero que en los llamados de inmersión homogénea es el aceite de cedro ó el monobromuro de naftalina.

Los objetivos de inmersión son á igualdad de aumento, mucho más luminosos que los ordinarios, porque el líquido interpuesto modera la desviación que los rayos periféricos ó más oblicuos experimentan al emerger de la preparación permitiendo que sean recogidos por la lente frontal. Además, los objetivos de inmersión, poseen una distancia frontal mayor que los objetivos en seco, lo que permite trabajar con mayor comodidad.

Los objetivos deben poseer ciertas propiedades, entre las cuales tienen gran importancia el poder

definidor del objetivo que es la cualidad que tienen de traducir con limpieza y corrección, el contorno de los objetos microscópicos. No hay que olvidar tampoco el ángulo de abertura, puesto que en la amplitud de este ángulo, se relaciona el poder resolvente, que no es otra cosa que la cualidad de que gozan los objetivos de hacer ver detalles delicados de los objetos microscópicos.

El ocular es un tubo corto que consta de dos lentes y un diafragma intermedio. Estas lentes son plano convexas, con la convexidad vuelta al objetivo. La lente más próxima al observador se llama *ocular* y la inferior *lente del campo*. Esta última, sirve para concentrar la luz destinada á formar la imagen real del objetivo, para que la lente superior ejerza su acción sobre todo el campo luminoso.

La lente del campo no coadyuva al aumento, únicamente actúa dilatando la extensión observable de la imagen. Para las investigaciones bacteriológicas se necesita un buen microscopio que posea un aumento de 600 á 1,200 diámetros.

El microscopio debe tenerse en un sitio en que la temperatura no sea alta y al abrigo de los rayos directos del sol, pues una temperatura muy elevada fundiría el bálsamo del Canadá e inutilizaría los objetivos. También es preciso evitar que el polvo se deposite en el microscopio y para evitar esto, lo mejor es taparlo con una campana de cristal. La limpieza de objetivos y oculares es indispensable, y hay que acostumbrarse á limpiarlos con un lienzo fino antes de hacerlos servir.

Cuando en el campo del microscopio se ven partículas de polvo, hay que saber si éstas se encuentran en el ocular ó en el objetivo. Para ello se hace rodar el ocular, y si las partículas de polvo se mueven, es que el ocular es sucio, si no se mueven, hay que buscarlas en el objetivo.

La lente frontal del objetivo se limpia frotándola suavemente con un lienzo limpio y fino, y si así no se consiguiera limpiarla bien, se toma un trozo de médula de saúco y en su superficie se aplica el objetivo al que se imprime un movimiento de rotación para que frote la lente y quede limpia.

Cuando la lente está sucia de aceite de cedro, bálsamo del Canadá, resina Dammar, etc., se echa una gota de xilol en un trapito fino y se frota la lente con suavidad, cuidando de que el trapo no esté muy mojado de xilol porque este reactivo podría penetrar en la montura de la lente y disolver el bálsamo que sujeta los cristales del objetivo y los inutilizaría.

Cuando se examina las preparaciones en reactivos químicos, debe evitarse que no toquen las lentes y si esto ocurriera, se lava al momento el objetivo con agua destilada y se seca con un lienzo fino.

La limpieza del ocular y del condensador Abbe, se hace del mismo modo que la del objetivo. Después de habernos servido del microscopio y antes de colocarlo dentro de la campana, hay que limpiar los oculares y los objetivos, y á los de inmersión deberá quitárseles el aceite de cedro que pudieran llevar.

Las demás partes del microscopio, se limpiarán con una piel de gamuza y de vez en cuando se engrasarán los tornillos con un poco de vaseína.

El manejo del microscopio, necesita algunas ligeras indicaciones.

Para practicar observaciones microscópicas, se coloca el instrumento en una mesa, delante de una ventana, aprovechando la luz zenital ó ante una pared blanca, sin aprovechar directamente los rayos solares.

A falta de luz natural, se emplea la iluminación artificial obtenida por medio de una lámpara de petróleo ó de gas provista de un mechero Aüer.

Póngase el microscopio delante de la lámpara, cójase el espejo por sus partes laterales é inclinarlo en diferentes direcciones hasta que el ojo aplicado en el ocular vea el campo del microscopio bien iluminado.

Para el uso de los objetivos de inmersión hay que colocar debajo de la platina el condensador de Abbe, que transforma en un manojó convergente, cuyo foco se halla en el espejo, los rayos paralelos que emanan de un espejo plano. Hay que colocar siempre un diafragma debajo de la platina, dependiendo la elección de dicho diafragma, del aumento que tengamos que utilizar. Cuanto mayor aumento tenga el objetivo, más pequeña deberá ser la abertura del diafragma. Este corrige la aberración de esfericidad y da imágenes más claras.

Para examinar un objeto hay que colocarlo en una lámina del vidrio delgado, transparente, sin burbujas, que se llama *portaobjetos*, que se recu-

bre con otra laminilla de vidrio llamada *cubre-objetos*, de forma cuadrada, de 18 á 25 milímetros de lado y de un espesor de 0'15 á 0'20 mm.

Los rayos luminosos que emanan del objeto, al atravesar el cubreobjeto sufren una desviación mayor ó menor según el espesor de esta laminilla. Esto se evita, en cierto modo, alargando el tubo del microscopio.

El funcionamiento del microscopio comprende dos tiempos, ó sea la investigación del foco próximo y la del foco exacto.

La distancia focal, varía con los diferentes objetivos y es tanto menor cuanto mayor es el aumento.

Cuando se usan grandes aumentos, el objetivo se halla muy cerca del cubreobjeto y un movimiento brusco, imprimido de arriba abajo al tubo del microscopio, rompería la preparación, y para evitar este accidente debe operarse de la manera siguiente: Antes de aplicar el ojo en el microscopio, hay que hacer descender lentamente el tubo por medio de la cremallera, hasta que la lente frontal contacte con el cubreobjeto y entonces mirar directamente la preparación.

En este momento y aplicado el ojo en el ocular se da vuelta á la cremallera en sentido contrario, (hacia atrás) hasta que se vea en el campo una sombra ó algo obscuro y á continuación se hace rodar ligeramente el tornillo micrométrico hasta que se perciba lo que tratemos de ver en la preparación.

Mientras dure la observación, los dedos pulgar é índice de la mano derecha deberán estar aplica-

dos al tornillo micrométrico, imprimiéndole constantemente movimientos muy lentos, pues de este modo llegaremos á ver los relieves del objeto que examinemos y, por tanto, nos daremos cuenta de su forma. Al examinar una preparación, la mano izquierda debe estar aplicada en el portaobjetos haciéndolo resbalar por la platina para que podamos observar según convenga el campo de la preparación. Si tratáramos de determinar el poder amplificante de un microscopio, habremos de utilizar un *micrómetro objetivo*, una *cámara clara* y una regla dividida en milímetros.

El micrómetro objetivo es un disco de cristal que lleva grabadas varias rayas, cuyos intervalos son de una centésima de milímetro. Este disco está fijo sobre un portaobjetos metálico, en uno de cuyos lados se lee el valor de las divisiones. He aquí como se procede para determinar la amplificación del microscopio: se comienza por enfocar el micrómetro objetivo lo mismo que si fuera una preparación, de manera que las rayas aparezcan claras, luego se monta la cámara clara sobre el ocular y en la mesa y á una distancia de 25 á 30 centímetros se coloca una regla dividida en milímetros. En estas condiciones se ve al mismo tiempo las rayas de la regla y las del micrómetro. Suponiendo que cada intervalo de las divisiones del micrómetro vale una centésima, la que aumentada por el microscopio se ha hecho tan grande que ocupa tres divisiones de la regla, la amplificación será de 300 veces, puesto que una centésima ocupa la extensión de tres milímetros.

Para determinar el tamaño de un objeto microscópico, es preciso aplicar, además del micrómetro objetivo, otro micrómetro que, por colocarse en el ocular del microscopio, se le da el nombre de *micrómetro ocular*. Consiste en una rodaja de cristal con divisiones, cuyo valor suele ser de una décima de milímetro. Dicha rodaja se coloca encima del diafragma del ocular de modo que las rayas estén enfocadas con la lente superior.

La determinación de la dimensión de un objeto comprende dos operaciones: 1.^a, averiguar el valor de las del micrómetro-ocular por comparación con las del objetivo; 2.^a sustituido el micrómetro objetivo por la preparación, cotejar el objeto mensurable con las divisiones del micrómetro ocular.

Para efectuar la primera operación, no hay más que examinar el micrómetro objetivo, á través del ocular micrométrico y, con un poco de atención, se notará en seguida cuantas rayas del micrómetro ocular igualan una ó varias del micrómetro objetivo. Supongamos que una división del micrómetro objetivo es aumentada de tal suerte, que abarca dos rayas del ocular micrométrico; puesto que conocemos el valor real de las líneas de aquél (una centésima) concluimos que, para tal combinación de ocular y objetivo, cada raya del micrómetro ocular vale media centésima ó sean cinco milésimas.

Hecha esta determinación, pasamos á la operación segunda, que consiste en sustituir el micrómetro objetivo por una preparación, manteniendo en su lugar el ocular micrométrico. Demos ahora

por supuesto, que una de las células, cuya talla deseamos medir, llena dos divisiones del micrómetro ocular; valiendo cada una de éstas (como ya determinamos anteriormente) 5 milésimas, es claro que el corpúsculo, en cuestión, alcanza un diámetro de 10 milésimas.

Por lo expuesto, se ve claramente que el micrómetro ocular desempeña aquí el oficio de un término de comparacion intermedio (cuyo valor se fija por el micrómetro objetivo) pero indispensable, por ser imposible medir directamente el objeto microscópico con el micrómetro objetivo.

No hay necesidad de valorar á cada momento las divisiones del micrómetro ocular con las del objetivo, bastará que esta operación se haya efectuado una sola vez para cada combinación de objetivo y ocular, conservando las cifras halladas y anotando la longitud del tubo.

De este modo sólo será utilizado el micrómetro ocular.

Algunos constructores de microscopios, entregan con sus modelos, una tabla donde figuran los valores que, para cada combinación de objetivo y ocular tienen las rayas del micrómetro ocular.

La unidad de la medida microscópica es la milésima de milímetro, que se designa con la letra μ .

En los trabajos de bacteriología, es de gran necesidad, que los porta y cubreobjetos sean limpios, toda vez que cuando son nuevos son algo exagerados y no se mojan con el agua.

Antes de usarlos hay que lavarlos con alcohol de 95° y enjuagarlos con un paño que no deje hilos

ara enjugar los cubreobjetos no debe hacerse nunca con las dos manos, porque los romperíamos.

Cada laminilla colocada en un pliegue del paño debe sujetarse y frotarse entre los dedos pulgar é indice de la mano derecha.

Sobre la mesa de trabajo debe haber un pequeño recipiente de vidrio con una cobertera, que contenga alcohol á 95°, en el que se sumergen las laminillas que hay que enjugar en el acto de utiliza las.

Los portaobjetos y los cubre pueden servir muchas veces, mientras se les lave convenientemente para quitarles lo que sobre ellos hubiéramos depositado, ya que el olvido de este cuidado nos expondría á graves errores en las observaciones ulteriores. Esta limpieza se hará del modo siguiente:

1.° Los porta y cubreobjetos se echan después de cada manipulación, en un cristizador lleno de alcohol del de quemar, y cuando en él tengamos cierto número de cristales, se procederá á limpiarlos.

2.° Se retiran las lamparillas del alcohol y se colocan en una cápsula de porcelana, cubriéndolos con una solución de carbonato de sosa al 4 por 100 y se hace hervir durante treinta minutos.

3.° Tírese la solución alcalina y lavar en agua abundante las laminillas. A continuación se cubren con la solución siguiente :

Agua	1,000	gramos
Bicromato de potasa.	30	»
Acido sulfúrico	100	»

Hágase hervir durante treinta minutos.

Tírese la solución ácida, lavar en agua abundante primero y con agua destilada después, enjuagar y poner separados los porta de los cubreobjetos, en sus cristalizadores respectivos, llenos de alcohol á 95°, de cuyos recipientes se irán tomando según se necesiten.

Este procedimiento de limpieza es de una seguridad completa.

Para el manejo de las laminillas podemos servirnos de la pinza de Cornet ó de la de Debraud, tomándolas por uno de sus ángulos.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES

DIAGNÓSTICO DE LAS PASTEURELOSIS

Pasteurellosis aviar, (cólera de las gallinas).

La bacteria ovoide de Lignières, se encuentra en la sangre, en la pulpa de diferentes órganos y en el contenido intestinal.

Para hacer el diagnóstico bacteriológico de esta enfermedad hay que hacer preparaciones con sangre, frotar con la pulpa de órganos y buscar en ellos el gérmen productor de la afección. Téngase en cuenta que el microbio productor del cólera de las gallinas, no toma el Gram, y que sus colorantes de elección, son el azul fenicado de Kühne y la thionina fenicada. Como ya se dijo en otra parte de este memorándum, el cultivo de los microbios es de positivo valor para ayudar al diagnóstico de las enfermedades por ellos producidas y por este motivo, indicaremos el aspecto que ofrecen los cultivos de cada gérmen respectivo. El del cólera de las gallinas es un cocobacilo muy pe-

queño, preferentemente aerobio y en los cultivos privados de aire su germinación es muy pobre. Pueden hacerse las siembras en caldo, agar agar, suero coagulado, gelatina y caldo-suero. En el caldo y á la temperatura de 35 á 39° el cultivo crece con rapidez, observándose que, entre diez á doce horas aparece un enturbamiento que va aumentando hasta llegar á formar un sedimento algo abundante.

El cultivo ofrece el máximum de virulencia entre diez y ocho á veinticuatro horas y el crecimiento del cultivo cesa á los cuatro ú ocho días. Si se hace la siembra en agar y se lleva á una temperatura de 37°, el cultivo crece aprisa y ofrece el aspecto de una estría fina y brillante. Cuando en la superficie del agar se siembra con una gota de sangre procedente de una gallina que padece la enfermedad, se forman colonias separadas, transparentes primero, azuladas después y semiopacas más tarde. En el suero coagulado los cultivos ofrecen igual aspecto que en el agar, en la gelatina el desarrollo es lento y las pasteurelias no llegan á licuarla.

Examinado con el microscopio el agente causante del cólera de las gallinas, recogido de la sangre, ó pulpa de otros órganos, se le ve en su forma ovoide característica; coloreado intensamente en sus extremos y con un espacio claro en el centro sin colorear.

El microbio del cólera aviar, es un gérmen de poca resistencia, la desecación lo mata y lo mismo ocurre si se le somete á una temperatura de 45 á

50° por espacio de tres cuartos de hora. La luz y el aire atenúan la virulencia de los cultivos y para conservarla algún tiempo hay que sustraerlos de la acción de estos agentes.

Si después del examen microscópico de los productos recogidos y de los cultivos, quisiéramos corroborar mejor el diagnóstico de la enfermedad, podremos recurrir á las inoculaciones á otros animales. La rata y el ratón son muy receptivos, no lo es tanto el cobayo, puesto que en este animal, la inoculación de una dosis mediana de cultivo virulento en el tejido conjuntivo no le ocasiona la muerte, produciendo únicamente un absceso con pus poco rico en bacilos, pero virulento para la gallina. En cambio, el mismo cobayo morirá, si en vez de inocularle por el tejido conjuntivo lo hacemos por la vía peritoneal con el mismo cultivo. La inoculación en las aves se hace con las precauciones ordinarias, inyectando debajo de la piel, peritones ó músculo pectoral, algunas gotas de cultivo que tenga de veinte á veinticuatro horas, ó bien sangre de un animal muerto recientemente de cólera de las gallinas.

El modo de hacer la coloración de las preparaciones de sangre y de frotis puede ser sencilla y doble. Para la primera no hay más que hacer obrar el azul ó la thionina fenicada sobre la preparación, lavar, secar y montarla. Los glóbulos blancos, los núcleos de los glóbulos rojos y los bacilos aparecen teñidos de color violado intenso.

Para la doble coloración, se echa sobre un porta-objetos, que contenga la sangre que tengamos que

examinar, un poco de solución acuosa de eosina al 1 por 100, y al cabo de dos ó tres minutos, se lava y se echa el azul fenicado, se lava, se seca y se monta. Con la coloración doble se consiguen preparaciones hermosas que permiten distinguir por el color diferente, los glóbulos de los microbios. En ellas se ven los glóbulos rojos teñidos por la eosina y los núcleos y los microbios se colorean en azul.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DEL MAL ROJO DEL CERDO

Puede hacerse con preparaciones de sangre, frotis de pulpa esplénica, medular, ganglionar y ver si en ellas existe el bacilo con sus caracteres morfológicos; sembrar la pulpa del bazo en caldo y gelatina, é inocular el cultivo en caldo á los animales receptivos á la enfermedad.

Visto con el microscopio y previa coloración, el bacilo del mal rojo del cerdo es muy fino, no se mueve, á veces se le ve en la sangre y pulpa de órganos reunidos en dos, ó amontonados. Se les encuentra en mayor abundancia en los ganglios y en el bazo, que en la sangre, á veces se les ve también en los leucocitos.

Los colores básicos de anilina coloran bien al bacilo del mal rojo y también lo hace el Gram. Para los cultivos se aconseja la coloración por la thionina fénica ó la solución de Ziehl diluida y para los frotis y preparaciones de sangre es mejor utilizar el método de Gram.

El microbio del mal rojo es aerobio indiferente y germina con más profusión cuando está al abrigo del aire. La temperatura que mejor conviene para su desarrollo es la de 15 á 40° y las siembras deben hacerse con sangre, médula ósea, ó pulpa de órganos de un cerdo recientemente muerto de mal rojo.

El cultivo en caldo y á la temperatura de 33 á 38°, produce una opalescencia ligera que acaba á los cuatro días formando un precipitado blanco. Cultivado en gelatina es característico, pues se ve que en todo el trayecto de la picadura se desarrolla una línea opaca, delgada, de la que emergen numerosos filamentos pequeños radiados, ramificados y muy finos. En el fondo del tubo el cultivo es más abundante y no licua la gelatina. La siembra del bacilo del mal rojo en el agar, presenta el mismo aspecto que en la gelatina. En los cultivos anaerobios el germen vive varios meses. También se conserva bien, en los cultivos profundos en tubo de gelatina ordinaria. En los cultivos aerobios en caldo, conservados en la estufa á la temperatura de 37 á 39°, la virulencia y la vitalidad desaparecen con mayor rapidez, la virulencia va atenuándose poco á poco y á los veinte días el cultivo es inofensivo.

Para practicar las inoculaciones, se recoge mediante el raspado de un corte fresco de hígado, bazo, ó de un ganglio una pequeña cantidad de pulpa, se tritura en un mortero y se diluye en 3 ó 5 centímetros cúbicos de agua hervida.

La dilución se filtra con un lienzo fino y el líqui-

do filtrado se aspira con una jeringa y se inyecta á la dosis de medio á un centímetro cúbico en los músculos pectorales de un pichón. Si es el mal rojo, el pichón muere entre el tercero y quinto día.

Hay que tener en cuenta, no obstante, que en algunas ocasiones, las bacterias de la peste y las de la pasteurelosis, matan al pichón y podrían hacer formular un diagnóstico equivocado. Por esto es necesario examinar la pulpa del bazo ó del riñón de este animal, previa doble coloración, que permite la distinción del bacilo del mal rojo de las bacterias del cólera de las aves.

En los casos de lesiones crónicas del mal rojo, la pulpa que puede recogerse raspando las válvulas cuando hay endocarditis bacilar, mata á la rata en cuatro ó cinco días.

Los microbios recogidos en cerdos afectados de mal rojo, poseen una virulencia variable. Lorenz ha demostrado que los bacilos procedentes de lesiones crónicas pueden ser utilizados como vacunas. Por las inoculaciones seriadas en el pichón se exalta la virulencia del microbio, de tal suerte, que los animales mueren cada vez más aprisa con inoculaciones de igual cantidad de virus.

Los cultivos viejos, ó que han estado en contacto del aire, se atenúan progresivamente pudiendo, con ellos, preparar virus-vacunas.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DEL CARBUNCO BACTERIDIANO

El microbio causante del carbunco bacteridiano, llamado también *Bacillus Anthracis*, se encuentra en la sangre y en los tejidos de los animales que han padecido la enfermedad.

La visión microscópica lo revela en forma de bacilo rígido, inmóvil, de dimensiones variables según los medios en que se ha cultivado, pero en la sangre se le ve en forma bacilar, ora aislado, ora reunido con otros formando cadenillas de dos ó tres eslabones. A veces éstos, están tan poco separados, que la cadenilla parece un filamento homogéneo. Si se examina la bacteridia carbuncosa sin olo rearla, aparece transparente como el cristal.

Las bacteridias recogidas de un edema gelatiniforme, son algo más largas que las de la sangre, debiendo tenerse en cuenta que la longitud del microbio de la fiebre carbuncosa, varía en los diferentes animales. Los virus atenuados afectan formas largas, y los exaltados ó muy virulentos se presentan en forma corta.

En el organismo vivo, la bacteridia no produce nunca esporos, y se reproduce exclusivamente por excisiparidad.

Todos los colores básicos de anilina colorean la bacteridia, y también toma el Gram. Después de coloreada se observa que sus extremos no se presentan jamás redondeados, afectando, en cambio, una forma cuadrada y sinuosa como si se hubiera quebrado de una manera brusca.

La bacteridia carbuncosa es aerobia y la temperatura óptima para su cultivo es de 35°. No obstante germina en todas las temperaturas comprendidas entre 18 y 42° El medio de cultivo que mejor le conviene es ligeramente alcalino ó neutro.

Sembrada en caldo y á 35° de temperatura, aparecen al cabo de algunas horas ligeros copos, aislados al principio, que más tarde van uniéndose hasta formar una opacidad que cae al fondo del matraz, y queda un sedimento pulverulento, mientras que el líquido de la superficie se conserva claro. El microscopio demuestra que dichos copos están formados de filamentos muy largos amontonados ó retorcidos como si fueran una madeja de cuerdas.

Cultivada en gelatina, licua el medio, y si la siembra ha sido hecha superficialmente, forma colonias redondas de color blanco. Sembrada en el mismo medio de cultivo por picadura, se obtienen colonias blancas de las que irradian filamentos ramificados que dan al cultivo un aspecto arborescente. La licuación del medio empieza por la parte superior del tubo y va invadiendo lentamente toda la gelati-

na, de tal modo, que es total al cabo de diez ó doce días.

Los cultivos hechos en placas aparecen al segundo día, en forma de puntos pequeños de color blanco grisáceo, diseminados en la gelatina.

Estos puntos aumentan de tamaño con rapidez y forman manchas morenas, granulosas, redondeadas, y de bordes sinuosos.

Un aumento no muy grande, permite ver que estas colonias están formadas por filamentos embrollados que les da el aspecto de un pelotón de hilo.

Hacia el cuarto ó quinto día las colonias parecen formadas por mechass onduladas que recuerdan el aspecto de cabellos ondulados en forma de bucles, más tarde la gelatina se licua alrededor de las colonias y éstas se disgregan y forman copos que nadan en el producto de liquefacción.

Sembrada en agar, inclinado y á la temperatura de 35 á 37°, forma una estría blanca que se encrecia rápidamente, se vuelve seca quebradiza y presenta bordes dentellados.

Las temperaturas superiores á 50 ó 51° matan rápidamente la bacteridia.

Para comprobar el diagnóstico por medio de las inoculaciones subcutáneas, hay que operar con las precauciones ordinarias, é inyectar debajo de la piel algunas gotas de sangre carbuncosa, ó de un cultivo de bacteridia.

Al cabo de ocho ó quince horas de haber hecho la inoculación, en el punto por donde penetró la aguja, aparece una tumefacción edematosa gela-

tiniforme, los ganglios próximos se infartan y la temperatura del inoculado aumenta uno ó dos grados.

El estado general de los animales es bueno desde las veinticuatro á treinta y seis horas para el cobayo, y de las treinta á cincuenta para el conejo al cabo de este tiempo el animal está inquieto, la respiración se acelera, orina con frecuencia, luego descende la temperatura á 34 y 30°, cae en un estado comatoso y muere en algunos minutos.

DIAGNÓSTICO DEL CARBUNCO SINTOMÁTICO

En algunas ocasiones el carbunco sintomático afecta la marcha de una verdadera septicemia. Los animales están tristes, febriles, inapetentes, aparecen tumores en los miembros, fauces, tórax, aunque lo más frecuente es que el tumor asiente en los músculos y progrese muy aprisa, adquiriendo dimensiones enormes, con un centro crepitante, doloroso al principio é indoloro luego.

El agente causal del carbunco sintomático es el *Bacillus chauvæi*, descubierto por Arloing, Cornevin y Thomas. Se presenta en forma de bastoncillos largos, aislados ó reunidos de dos en dos, con sus extremos truncados en forma cuadrada. Los bacilos son esporulados ó no, según la evolución de la enfermedad haya sido de mayor ó menor duración.

En los tumores musculares se forman esporos rápidamente, aunque pueden faltar cuando la muerte de los animales ha sido muy pronta. El esporo se presenta como un punto ovoideo, refringente, en el centro ó en un extremo del bacilo,

dándole el aspecto de un badajo de campana. Los bacilos esporulados se encuentran más bien en los músculos y en los cultivos que en el líquido de la serosidad de los edemas.

El *bacilo Chauvaei* se colorea con facilidad por los colores básicos de anilina en soluciones mordientes. También se tiñe por el método de Gram y por el de Claudius. El microbio del carbunco sintomático es absolutamente anaerobio y su cultivo puede hacerse en caldos de cobayo, ternera, conejo, gallina ó en caldo de buey preparado con carne fresca. A una temperatura de 37° aparece al cabo de veinte horas un enturbiamiento, y del cultivo se desprenden gases en abundancia. Al cabo de dos ó tres días se forman copos que precipitan en el fondo del matraz. En los medios albuminoideos, el cultivo es más abundante y conserva su virulencia por más tiempo que en el caldo.

Cultivado el bacilo de Chauveau en la gelatina á la temperatura de 20°, germina con lentitud, y á lo largo de la picadura forma esferas pequeñas irregulares que emiten prolongaciones radiadas, que cuando comienzan á ser confluentes, la gelatina es desituada por los gases y acaba por licuarse. En el agar la siembra hecha por picadura profunda se presenta en forma de línea blanca, que por la fragmentación del agar por los gases llega á invadir las grietas del medio de cultivo.

El *bacilo Chauvaei* es de gran vitalidad y resiste á las causas ordinarias destructoras de los microbios. En la serosidad muscular de un tumor carbuncoso desecado, el bacilo esporulado sólo muere

al cabo de muchas horas si se somete á la temperatura mínima de 110°. Las soluciones antisépticas de uso más corriente, así como la putrefacción, no tienen acción alguna sobre los esporos del bacilo del carbunco sintomático.

En la serosidad de los tumores la virulencia persiste, y desecada á 35° permanece activa durante años.

Los animales receptivos para el carbunco sintomático son el buey, carnero, cabra y cobayo. Las demás especies son refractarias ó muy poco receptivas.

Los métodos de diagnóstico experimental del carbunco sintomático comprenden la inoculación y el examen bacteriológico. La inoculación se practica en los músculos del muslo del cobayo con el producto del raspado de los músculos afectados, del hígado, ganglios, recogidos en cortes frescos en la profundidad de los órganos. He aquí la técnica de la inoculación. Con un bisturí limpio se recogen los productos, se ponen en un mortero y se trituran en seco primero, adicionando después algunas gotas de agua hervida. La pulpa así obtenida se filtra con un lienzo y de este filtrado se inoculara medio centímetro cúbico con la jeringuilla de Pravaz.

Téngase la precaución de hervir previamente por espacio de cinco minutos el mortero, el lienzo, el vidrio que debe contener el líquido y la jeringa.

Esta debe esterilizarse inmediatamente después de la operación por inmersión en agua hirviendo por espacio de veinte minutos.

— Cuando se trata del carbunco sintomático, el animal inoculado ofrece, al cabo de algunas horas, un tumor en el punto de la inoculación y muere á las veinticuatro horas con lesiones musculares características.

— La inoculación permite distinguir el carbunco sintomático de la fiebre carbuncosa. Para ello se inoculan las materias recogidas al cobayo y al conejo; si el primero muere, se trata del carbunco bacteriano; si mueren los dos es á consecuencia del carbunco bacteridiano.

El examen bacteriológico se hace con frotis preparados por medio de partículas del tumor, esparciendo en las laminillas serosidad edematosa ó peritoneal, ó bien frotando ligeramente la superficie del hígado de un cobayo muerto de carbunco, con las laminillas y tiñéndolo por los procedimientos de coloración antes indicados.

El carbunco sintomático tiene bastante semejanza con la septicemia gangrenosa y los gérmenes productores de ambas afecciones poseen caracteres y propiedades parecidas.

No obstante, hay algunas diferencias que permiten distinguir unos de otros.

Así, el vibrión séptico, se presenta en la serosidad del edema y del peritoneo del cobayo, en forma alargada, cosa que no sucede con el microbio del carbunco sintomático. También la aglutinación es específica para ambos gérmenes. El carbunco sintomático y la septicemia son dos afecciones diferentes, aun cuando tengan analogías de evolución y de etiogenia.

Todas las partes del tumor carbuncoso, edemas periféricos y ganglios linfáticos contienen el microbio en abundancia y también se halla en el derrame de las membranas serosas, hígado, bazo, riñones, pulmón, bilis, y el contenido intestinal es casi siempre virulento.

La sangre sólo es invadida por los microbios en los últimos periodos de la enfermedad, y aun en éstos, se les encuentra en muy pequeña cantidad. Pero si se recoge sangre en una pipeta y se deja á la temperatura de 37° por espacio de veinticuatro horas, se observa que la columna formada por la sangre se rompe merced á los gases desarrollados por los microbios.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DEL MUERMO

El bacilo del muermo se presenta en forma de bastoncillos inmóviles, rectos ó encurvados ligeramente y de extremos redondeados.

En los cultivos se le ve aislado ó asociado con otro, en los tejidos y en el pus se halla amontonado. A veces los bacilos son cortos, y toman el aspecto de micrococos, otras veces afectan la forma filamentosa ó ramificada y en los cultivos viejos se observan formas de involución y cadenillas análogas á las de los cocos.

El bacilo del muermo, se tiñe con dificultad por las soluciones acuosas de los colores básicos de anilina, de manera que para obtener buenas preparaciones, debe emplearse soluciones que contengan mordente, tales como el azul de Kühne, de Löffler, tionina fenicada, ó fuchina de Ziehl. No toma el Gram.

En las preparaciones teñidas, el bacilo ofrece un aspecto granuloso, su protoplasma fija irregularmente la materia colorante y presenta espacios no teñidos.

Los cultivos del bacilo del muermo presentan ciertos caracteres. El germen es aerobio, germina á la temperatura de 25°, excepto en el agar glicerinado, que se desarrolla con muy poca exuberancia á la temperatura de 23 á 24°.

La temperatura óptima es de 35 á 38°.

En el caldo y á 37°, se forma al cabo de veinticuatro horas un enturbiamiento, que acaba por convertirse en un precipitado blanco, nada característico. Si el cultivo es en agar glicerinado, al cabo de veinticuatro horas aparece á lo largo de la estria una delgada capa blanquecina semitransparente, que no tarda mucho tiempo en volverse opaca y llega á invadir toda la superficie.

El suero de caballo solidificado es un medio de cultivo muy á propósito para el bacilo del muermo y en la patata presenta un aspecto característico. Para cultivarlo en la patata, hay que escogerlas ricas en almidón y alcalinizarlas previamente. Al cabo de dos días de someter la siembra á la temperatura de 37° aparece un engrudo amarillento recio y viscoso, á lo largo de la estria de inoculación, extendiéndose el cultivo, hasta que adquiere un color de chocolate claro.

El bacilo del muermo no posee gran vitalidad. Los cultivos perecen al cabo de un mes, y son estériles si se les expone durante algunos minutos á una temperatura de 55 á 60°.

En el pus la desecación mata al germen muy aprisa, de tal suerte que una capa delgada de pus muermoso pierde toda su actividad á la temperatura ordinaria.

La virulencia de los cultivos desaparece al cabo de ocho días.

La investigación del muermo por medio del examen bacteriológico, debe hacerse en el pus muermoso, en la saniés de los chancros, en el flujo nasal, etc., y únicamente en las formas muy agudas del muermo se ha podido hallar el bacilo en la sangre.

Sin embargo, la investigación del bacilo microscópicamente, da, con frecuencia, resultados negativos, de tal suerte, que hay que echar mano de la inoculación, para poder hacer el diagnóstico exacto de la enfermedad.

No obstante, he aquí las reglas que deben seguirse para indagar la presencia del bacilo del muermo en un producto patológico. Si el examen se practica en frotis preparados con pus, pulpa de órganos, etc., hay que colorearlos con los colorantes antes indicados, y si tratásemos de verlos en fragmentos de órganos, hay que endurecerlos con alcohol absoluto y hacer inclusiones en parafina.

El aspecto del cultivo del microbio en la patata es un elemento de diagnóstico característico y las inoculaciones de pus ó de flujo nasal constituyen un elemento capital para el diagnóstico de la enfermedad. Estas se hacen en el cobayo, asno y perro. La inoculación de productos sospechosos de muermo al cobayo, aconsejada por Straus como procedimiento más sencillo y cierto para diagnosticar la enfermedad, no está exento de inconvenientes. En efecto, la mitad de los inoculados en el peritoneo

con productos sospechosos, mueren á las veinticuatro ó treinta y seis horas por peritonitis séptica.

Por lo tanto, cuando nos sirvamos de productos impuros, la inoculación debe hacerse debajo de la piel de un cobayo, y luego se toma una porción de ganglio infectado y, con éste, se practican las inoculaciones intraperitoneales. El pus ó flujo nasal, que tenga de inyectarse en el peritoneo, debe diluirse antes en agua esterilizada. Al cabo de dos ó tres días de haber hecho la inyección, aparece el *sarcocele muermoso* y la muerte ocurre entre ocho y quince días. La aparición de este sarcocele fué considerada, durante mucho tiempo, como prueba patognomónica y se la llama signo de Straus. La orquitis que determina la inyección peritoneal de productos suspectos de muermo, no es propia del bacilo de ésta enfermedad, sino que puede ser producida por otros microbios.

Por lo tanto, la inoculación intraperitoneal no es más que un elemento de diagnóstico, que debe ir seguido del examen microscópico del pus del sarcocele, producido por la inyección de sustancias muermosas, y de la prueba reveladora de la malleína.

El asno es un reactivo precioso para el diagnóstico del muermo, merced á lo sensible que es á dicha enfermedad. La práctica de las inoculaciones se hace escarificando la piel, que se impregna de la substancia muermosa. Cuando ésta lo es, el animal ofrece siempre los síntomas característicos de la enfermedad antes de que termine el segundo septenario.

En el asno inoculado, la temperatura aumenta más allá de 40°, cuando aún no existe ninguna lesión local.

La inoculación al perro, constituye un medio de diagnóstico precioso. A los cuatro ó cinco días las heridas exudan un pus líquido, grisáceo, la región ofrece un edema invasor, y luego aparecen úlceras que se extienden hasta unirse unas á otras.

El edema, la supuración y el aspecto ulceroso, permiten á veces afirmar el diagnóstico, al cabo de cuarenta y ocho horas después de la inoculación.

Aun cuando la inyección reveladora del muermo no entre en lo que hace referencia al diagnóstico bacteriológico, queremos recordar la técnica de su uso, pues en cierto modo puede ser considerada como inoculación, y porque, además, constituye una reacción biológica. La malleina es una substancia específica extraída de los cultivos del bacilo del muermo, que, inyectada á los animales muermosos, producê en ellos un conjunto de fenómenos locales y generales, que permite afirmar la existencia del muermo.

La malleina se prepara concentrada (malleina en bruto), ó en estado de dilución, convenientemente dispuesta para la inyección (malleina diluída). La malleina diluída conserva su actividad durante muchos meses, siempre que se la conserve en sitio fresco y obscuro. La malleina en bruto se conserva en las mismas condiciones, durante más de un año; y para emplearla, se diluye en agua fenicada al 5 por 1,000, en la proporción de una par-

te de malleina en bruto por nueve partes de agua fenicada.

El modo de usar la malleina como inyección reveladora, es el siguiente:

Hay que inyectar de una sola vez, debajo de la piel del cuello, previamente lavada y desinfectada, dos centímetros cúbicos y medio de malleina diluída (dosis para el caballo ó mulo).

Los efectos que después de la inyección reveladora se observan, son:

1.º En los caballos muermosos, fórmase en el espacio de unas cuantas horas, á nivel de la inyección, una tumefacción inflamatoria, caliente, tensa, dolorosa, siempre voluminosa, á veces enorme; del circuito del tumor parten unos regueros linfáticos, sinuosos, que se dirigen hacia los ganglios contiguos; ese tumor aumenta de volumen durante veinticuatro ó treinta y seis horas, y persiste dos ó tres días.

Al mismo tiempo que aparece el tumor, el estado general se modifica; el animal se muestra triste, abatido, anheloso; el apetito disminuye ó desaparece, y se observan escalofríos ó temblores musculares. Estos fenómenos locales y generales tienen una intensidad variable, pero nunca dejan en absoluto de presentarse, constituyendo lo que se llama *reacción orgánica*.

La reacción térmica no falta nunca (salvo en algunos casos de muermo agudo); en algunas horas la temperatura se eleva gradualmente á 1'5°, 2°, 2'5° y más por sobre de la normal; notable ya á las ocho horas, la hipertemia alcanza su máximum

hacia la duodécima hora, á veces únicamente hacia la décimasexta, y más raramente hacia la vigésima.

La reacción que produce la malleina dura mucho tiempo; después de veinticuatro y treinta y seis horas, existe aún postración, y la temperatura se mantiene más de un grado superior á la normal.

2.º En los caballos sanos, por el contrario, la inyección de malleina no produce ningún efecto; la temperatura se mantiene normal; el estado general no se modifica; á nivel de la inyección prodúcese un pequeño tumor edematoso, un poco caliente y sensible; però el edema, lejos de crecer, disminuye rápidamente y desaparece en veinticuatro horas.

Es bueno tomar la temperatura mañana y tarde durante dos ó tres días antes de la inyección; el promedio de estas temperaturas constituye la *temperatura inicial* del animal; en rigor cabe contentarse con tomar la temperatura una sola vez, antes de la inyección.

La reacción térmica se mide por la diferencia que existe entre la temperatura *inicial* y la temperatura *más elevada* que haya sido observada después de la inyección.

Cuando la reacción térmica es superior á 1'5º, y existe al mismo tiempo una reacción orgánica marcada, puede afirmarse que el animal está muermoso.

Se le debe considerar como simplemente sospechoso, sea cual fuere su estado de hipertermia, si la reacción orgánica deja de producirse; en tal

caso hay que aislar al animal y someterlo, después de transcurrido un mes por lo menos, á una nueva inyección de malleina. Una hipertermia inferior á un grado no tiene ningún valor diagnóstico.

Puede ocurrir que, en el momento de practicar la inyección, el animal esté con calentura; entonces, si la temperatura inicial excede de 39°, debe aplazarse la operación para más tarde.

Las variaciones atmosféricas (sol, viento, niebla, lluvia), pueden provocar grandes oscilaciones de la temperatura de los animales expuestos á la intemperie. Debe procurarse, pues, no operar si no á los caballos que estuviesen ya en el establo desde veinticuatro horas, por lo menos.

Por último, no hay que olvidar que ciertas afecciones, especialmente el coriza, pueden provocar grandes variaciones cotidianas de temperatura. Pero la hipertermia observada en el coriza no es regular y duradera, como la que provoca la malleina en los caballos muermosos, y, sobre todo, es de notar que la *reacción orgánica* falta en ellas completamente.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA LINFANGITIS EPIZOÓTICA

La linfangitis epizoótica es una enfermedad virulenta, inoculable, que se caracteriza por supuraciones de los linfáticos superficiales, producidas por un germen específico. Es una afección más propia de los solípedos que de los demás animales, y por mucho tiempo se la confundía con el muermo cutáneo.

El microbio de la linfangitis epizoótica, se presenta en los tejidos en forma de un micrococo grande, algo ovoideo, con un contorno formado por una línea muy refringente. A veces, en los cultivos, se hallan células redondas y de formas alargadas, formadas por dos ó tres segmentos.

La coloración es difícil, y para conseguirla hay que emplear el método de Gram-Weigert-Kühne, que permite encontrar el micrococo en los tejidos. El líquido de Ziehl también lo colorea, después de contactar con él largo rato.

El cultivo del microbio de la linfangitis epizoótica se hace muy lentamente. Sembrado en caldo, se ve, á los diez y siete días, un poso de copos blancos que contienen hifas y células, en agar; á los cuarenta y cinco días aparecen algunas colonias que forman granos de color gris blanquecino, en la gelatina se ven, al cabo de cincuenta y seis días, masas blanco-amarillentas, parecidas á granos de arena, irregulares, y el medio no se licua.

En la patata el cultivo es más rápido y da colonias de color moreno claro. Los cultivos se desarrollan mejor en un medio ácido que en un medio alcalino. Marcone ha cultivado el criptococo en el suero de caballo adicionado de glucosa, de glicerina y de azúcar de caña en proporción del 2 por 100. A los quince días y á la temperatura de 32 á 37° se ve, en la superficie sembrada, unas manchas de color gris que van alargándose poco á poco, y al mismo tiempo que el agua de condensación del suero se carga de un precipitado gris sucio, formado por microbios en vías de reproducción.

La transmisión experimental de la linfangitis epizoótica, se ha conseguido muchas veces por inoculación subcutánea é intracutánea en el caballo, asno y mulo.

La inoculación de pus al mulo, por medio de picaduras y escarificaciones, produce al cabo de un tiempo variable (de veinte á sesenta y seis días) la evolución de botones, acompañados de ulceraciones y cuerdas linfáticas.

La inoculación subcutánea, produce en el caballo nódulos pequeños en el sitio de penetración, y

al cabo de un mes los tumores aumentan y se absceden. Los resultados experimentales enseñan que la infección es algo difícil, y que únicamente al cabo de mucho tiempo, se manifiesta en forma de lesiones evidentes. Los tejidos oponen mucha resistencia y la fagocitosis es muy activa, por esto la difusión de la enfermedad es lenta.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA PAPERERA

El estreptococo de la papera, descubierto por Schütz, presenta diferentes aspectos, según los medios en que se cultiva. En el pus de los abscesos que se desarrollan en la papera, se encuentra en forma de cadenillas más ó menos largas, formadas unas por tres ó cuatro granos, otras, muy largas y onduladas; en los parénquimas, las cadenillas, amontonadas, dan á los gérmenes el aspecto de los estafilococos. Cultivados en el caldo, los estreptococos adquieren una longitud considerable y los elementos constitutivos son ovales y de gran diámetro transversal.

Los cocus se reproducen por división transversal, la segmentación se opera en una porción de granos, y, en este momento, las extrangulaciones ofrecen el aspecto de una cadena de diplococos.

El estreptococo de la papera es fácil de colorear, con los métodos de Gram y de Weigert. El micro-

bio es, á la vez, aerobio y anaerobio, se cultiva en los caldos y en el suero, y no se cultiva tan bien en la gelatina y en el agar. En los caldos de carne, simples ó glicerinados, van depositándose pequeños copos blancos más abundantes cada vez y formados por montones de estreptococos precipitados en el fondo del matraz, aunque el líquido conserva su limpidez durante varias semanas. Sembrado en estría en la gelatina, el cultivo es inconstante y muy exiguo y hecha la siembra por picadura, las colonias aisladas se desarrollan en las capas profundas. La siembra por picadura en el agar da, en veinticuatro horas, pequeñas colonias redondeadas, blanco-grisáceas, que permanecen aisladas y no exceden del tamaño de una cabeza de alfiler. El suero es un excelente medio de cultivo, en él se forman manchas grises transparentes, que se extienden y se unen para formar una capa espesa y sólida grisácea de reflejos irisados.

El estreptococo es patógeno para el caballo y especialmente para la rata blanca ó gris, que es el reactivo por excelencia. El conejo y el cobayo pueden ser infectados por inyección intravenosa ó intraperitoneal de grandes cantidades de cultivo que no sea viejo.

Acerca de la especificidad del estreptococo de la papera, hay que decir que los caracteres morfológicos y biológicos de estreptococos no difieren de los del estreptococos piógeno en ningún punto esencial. Para muchos autores, el estreptococo de la papera no es más que una variedad del estreptococo piógeno.

La conclusión que debe sacarse de todo esto, es que el estreptococo piógeno y el de la papera constituyen dos variedades diferentes, al paso que el diplococo de Schütz es idéntico al estreptococo de la papera.

Schütz admite, *à priori*, la existencia saprofítica del estreptococo de la papera. El parásito vive en el suelo de los establos, en las camas, polvo de los forrajes y casi siempre se le encuentra en el contenido intestinal del caballo, en las deyecciones, en las mucosas sanas de las primeras vías respiratorias y en las secreciones de diferente origen.

El estreptococo está siempre dispuesto á invadir los tejidos, así que la defensa de los mismos está comprometida. Así se ve que se sobrepone á las infecciones pasteurélicas del caballo para complicar y hacer más obscura su evolución.

Las propiedades biológicas del estreptococo de la papera y en particular su virulencia, ofrecen considerables diferencias, según el origen de los tipos estudiados. Los cultivos de formas saprofitas que han salido del intestino ó de los suelos, son poco ó nada patógenos, y, por otra parte, hay numerosas modalidades en el modo de acción de las variedades virulentas.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

El agente productor de la tuberculosis es el bacilo de Koch. No obstante de estar conformes con esta afirmación todos los hombres de la ciencia médica, ha habido discusiones acerca de la naturaleza del bacilo de la tuberculosis humana y el de la de los animales, especialmente de los mamíferos. Aun cuando Koch niega que sean iguales, la mayoría de los bacteriólogos, basándose en numerosos hechos experimentales, demuestran que los bacilos de la tuberculosis humana y los de la tuberculosis de los bóvidos son idénticos. Como ha comprobado Arloing, cada bacilo se adapta á la especie animal que se ha acostumbrado á vivir, á pesar de lo cual puede infectar lo mismo al hombre que á los animales. La virulencia del bacilo de la T. bovina parece ser mayor que la del B. de la tuberculosis humana.

Pero si á este último se le hace pasar por la ca-

bra, puede ser tan virulento para los bóvidos, como el mismo B. de la tuberculosis bovina, según ha demostrado el profesor De Jong.

Los caracteres que, al parecer, han permitido distinguir diferentes bacilos de la tuberculosis han hecho que se diera al bacilo de Koch los nombres de *B. de la T. humana*, *B. de la T. bovina*, *B. aviar* y *B. de la T. pisciaria*, según produjera la enfermedad al hombre ó á estos animales.

La transformación del bacilo de la T. humana en aviar fué demostrada por Nocard mediante pases duraderos en sacos de colodión en el peritoneo de la gallina. El experimento consistió en llenar un saquito de colodión con una emulsión espesa de bacilo de la T. humana, obtenido de un cultivo en patata glicerizada. Al cabo de cuatro meses de permanecer el saquito en el peritoneo, contiene bacilos cuya primera siembra produce cultivos pobres; pero que vuelto á sembrar varias veces crece con exuberancia y ofrece los caracteres de los cultivos del B. aviar.

El bacilo obtenido de esta manera no es muy virulento para el cobayo, pero lo es para el conejo, al que mata por tuberculosis miliar generalizada, y al segundo pase por dicho animal, lo mata también del mismo modo, como lo hace el B. aviar, por septicemia tuberculosa sin granulaciones aparentes, pero que, no obstante, se halla en la pulpa de los órganos en cultivos puros.

Esta transformación, conseguida con el B. de la T. humana, la han obtenido Moeller, Sorge y Suess con el bacilo de la tuberculosis de los peces.

Los bacteriólogos admiten que, lo más probable es, que los diferentes bacilos de la tuberculosis tengan un origen único, y que las diferentes razas de los mismos se han formado á consecuencia de acostumbrarse dichos bacilos al parasitismo en los diferentes animales en que han vivido.

La mayor parte de las especies animales padecen la tuberculosis. De todas ellas la especie bovina es la que con mayor frecuencia la padece y casi siempre en forma crónica y con localizaciones variables. No obstante, la localización pulmonar es la más frecuente.

En cuanto á receptividad, además de los bóvidos, la tienen el mono, perro, cerdo, conejo, cabra, carnero, aves y no lo son tanto, el caballo y el gato.

Por lo que hace referencia á los caracteres morfológicos del bacilo de la tuberculosis, ó sea á su aspecto microscópico, se le ve en los cultivos en forma de bastoncitos muy tenues casi siempre inmóviles. Cultivados en medios sólidos, se les ve agrupados en montones sinuosos confundidos entre sí.

El bacilo de Koch se cultiva en medios limitados á base de suero ó glicerina, es aerobio y germina á la temperatura de 30° á 38°. Para sembrar el bacilo de Koch hay que tomar algunas precauciones con objeto de conseguir buenos cultivos. Es preferible tomar la semilla de la materia tuberculosa procedente del conejo ó del cobayo, y después de haberla triturado previamente en un recipiente de vidrio esterilizado, se toma una pequeña cantidad de ma-

teria y se deposita en la superficie del suero solidificado, siendo preferible utilizar suero al que se haya adicionado, antes de solidificarse un 4 por 100 de glicerina.

La germinación del bacilo de Koch es muy lenta, pues comienza á los doce días de someter el cultivo á una temperatura de 37 á 38° y termina al cabo de unas cuatro semanas.

En los cultivos, el bacilo de la tuberculosis resiste poco á los agentes destructores, cosa que hace creer que no esporula. Los cultivos en medios líquidos expuestos diez minutos á 70 ó 75° quedan estériles; en cambio, si se desecan esputos á la temperatura ordinaria la virulencia puede conservarse por algunos meses, según demostró el profesor Galtier.

La luz y la desecación combinadas atenúan la virulencia del agente productor de la tuberculosis. En el agua conserva largo tiempo la vitalidad, y la putrefacción de los órganos tuberculosos sólo destruye la virulencia de los bacilos al cabo de mucho tiempo.

Las antisépticos tienen una acción bastante sensible sobre el bacilo de Koch. El agua fenicada al 5 por 100 los mata, según Yersin, en treinta segundos, y la solución de sublimado al 1 por 1,000, al cabo de diez minutos.

Para ver al bacilo de la tuberculosis en los humores y tejidos, hay que teñirlos antes. La coloración requiere métodos especiales, puesto que el agente productor de la tuberculosis es de difícil colorear por los colores básicos de anilina; pero

una vez impregnado de la materia colorante, la retiene muchísimo, aun sometiéndolo á la acción de los ácidos minerales diluïdos. He aquí los diferentes procedimientos de coloración :

PROCEDIMIENTO DE ZIEHL-NELSEN

Este procedimiento se funda en la acción que los ácidos minerales diluïdos tienen sobre los demás microbios decolorándolos, y es aplicable para el teñido de los frotis. Si después de haber coloreado la preparación con la fuchina fénicada y haberla sometido á la acción de los ácidos, vertemos sobre ella una solución acuosa de azul de metileno, veremos que los bacilos de la tuberculosis quedarán teñidos de rojo y los otros de color azul.

Opérese como sigue: Tómese un portaobjetos en el que haya producto á examinar y sujétese por uno de sus extremos con una pinza de las de Cornet ó de las de madera. Fijado ya el producto de la preparación, se vierte sobre la misma una gota de fuchina de Ziehl, y á continuación se calienta suavemente hasta que se desprendan vapores y procurando que la solución colorante no se seque sobre la preparación.

Substituir la solución colorante antes dicha por unas gotas de ácido nítrico diluido al tercio (dos partes de agua destilada por una de ácido nítrico puro) ó de ácido sulfúrico al cuarto (tres de agua por una de ácido) y dejarla en contacto de la preparación hasta que ésta adquiera un color amarillento. A continuación se lava con agua abundante

y se vierten unas gotas de alcohol absoluto para acabar de decolorar, de manera que ofrezca un tinte rosáceo apenas visible. Lávese otra vez y échense sobre la preparación unas gotas de solución acuosa de azul de metilo, dejándola en contacto poco tiempo. Vuélvase á lavar, secar y montar en el bálsamo.

Todo lo dicho puede hacerse cuando se quiera obtener una preparación con coloración de contraste. En los casos en que únicamente se quiera ver si existe el bacilo de Koch en el producto que se examina, basta teñir la preparación con la fuchina. El color rojo de los bacilos basta para demostrar que son los que pretendemos investigar.

PROCEDIMIENTO DE GABBÉ

Este procedimiento se aplica así: Se colorea la preparación con la fuchina fenicada. Luego se decolora y colora á la vez, sumergiendo la preparación en la solución siguiente:

Azul de metilo.	2 gramos
Acido sulfúrico al $\frac{1}{4}$	100 cént. cúb.

Lavar y secar la preparación y examinarla con el microscopio.

PROCEDIMIENTO DE HERMAN

Hay que preparar dos soluciones. La primera de

Cristal violeta.	1 gramo
Alcohol á 90°	30 cént. cúb.

y la segunda:

Carbonato de amoniaco	1 gramo
Agua destilada	100 cént. cúb.

Cuando tengamos de utilizar estas soluciones, lo haremos vertiendo en una cápsula algunos centímetros cúbicos de la solución segunda, y añadiendo alguna cantidad de la primera, de modo que deje una coloración muy oscura si, de la mezcla, echamos una gota sobre un papel de filtro. Acto seguido se calienta el líquido colorante hasta que empieza la ebullición y se sumergen en él los portaobjetos, impregnados del producto á examinar, por espacio de un minuto. Después de esto se llevan los portaobjetos á una solución de ácido nítrico al décimo durante cinco segundos. Lavar la preparación con alcohol absoluto para acabar de decolorar y someterla á la acción de una solución de :

Eosina	1 gramo
Alcohol de 60°	100 cént. cúb.

Lávese aprisa con alcohol, séquese y móntese.

Por este procedimiento los bacilos se tiñen de color violeta y el fondo de color de la eosina.

Si se quiere colorear los cortes hay que hacerlo en frío. Uno de los procedimientos recomendables es el de Ziehl-Nelsen, que consiste en colorear el corte durante 15 ó 30 minutos en la fuchina de Ziehl fría, hacer obrar la solución ácida por algunos segundos, decolorar por el alcohol absoluto hasta que adquiera un color de rosa pálido, lavar de nuevo, colorear el fondo con la solución acuosa de azul de metilo, volver á lavar, hacer obrar rápidamente el alcohol absoluto y montar la preparación en el bálsamo.

El diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis en los animales no siempre da el resultado que se desea, y por esta razón hay que echar mano del diagnóstico experimental. Generalmente se hacen las inoculaciones en el cobayo y en el conejo, sirviéndonos para ello de cultivo puro diluido en agua esterilizada, ó bien de productos tuberculosos triturados en algunas gotas de agua destilada é incorporados debajo de la piel ó en el peritoneo.

Si la inoculación es subcutánea, al cabo de diez días se forma en el sitio de la inoculación un nódulo indurado, que se reblandece y acaba por abscederse al exterior, transformándose en una úlcera. Los ganglios próximos al punto inoculado, se infartan, el animal enflaquece, y muere del primero al tercer mes. Al hacer la autopsia á un inoculado, se observan lesiones del bazo y del hígado, el primero es voluminoso, lleno de tubérculos caseosos y de granulaciones, y el hígado ofrece lesiones análogas, pero menos acentuadas. Las serosas, la superficie de los pulmones y los riñones presentan también granulaciones miliars. Si antes de que el animal pueda llegar á morir se le sacrifica, se encuentran ya en él lesiones características, especialmente en el bazo é hígado. Únicamente á los dos meses aparecen los tubérculos en los ganglios bronquiales y en los pulmones.

Esta forma de generalización tuberculosa se le llama de tipo Villemín, porque este investigador fué quien primero describió el cuadro sintomático.

La inoculación por la piel puede hacerse frotando la región inguinal de un cobayo, previamente

rasurada, con un poco de algodón impregnado de producto tuberculoso. Al cabo de ocho á quince días se presenta una tumefacción de los ganglios, y á los dos meses. ocurre la muerte con las lesiones características de la enfermedad.

Si la inoculación se hace en el peritoneo, las lesiones de la enfermedad son iguales á las anteriormente descritas; pero la evolución es mucho más rápida. La muerte va precedida de una caquexia progresiva, y ocurre á las dos ó seis semanas.

Por inhalación y por ingestión de bacilos tuberculosos puede tuberculizarse también á los animales.

El conejo no es tan sensible á la tuberculosis como el cobayo, y al inocularle ocurre á veces que la lesión local dura muchos meses antes de que se produzca la generalización de la enfermedad.

Un procedimiento de inoculación que permite observar la evolución de las lesiones es el que se practica en la cámara anterior del ojo. Al tercer septenario se vé el iris cubierto de granulaciones tuberculosas, el ojo se tumefacta, el humor acuoso se enturbia y á veces se produce una supuración del ojo é infartos ganglionares del cuello, con generalización de la enfermedad.

Por las venas la inoculación puede ofrecer dos aspectos: la *granulia* y el tipo *Yersin*. En el primero y según la dosis inyectada, el animal muere á las dos ó tres semanas. y las vísceras y las serosas se hallan cubiertas de granulaciones de color amarillo. En el segundo, el animal muere á los doce ó veinticuatro días; pero antes se pone ca-

quético y la temperatura aumenta. La única lesión que se encuentra á la autopsia consiste en una gran hipertrofia del hígado y del bazo, sin que se vea ningún tubérculo aparente. En cambio el hígado, bazo y médula ósea contienen bacilos tuberculosos en abundancia.

A pesar de que los bóvidos tienen mayor receptividad para el bacilo de la tuberculosis bovina que para el de la humana, pueden, no obstante, ser infectados por éste último.

Fibiger, Jensen y Eber han demostrado que la inoculación subcutánea ó peritoneal de productos tuberculosos humanos puede ocasionar en la ternera una tuberculosis generalizada.

El examen microscópico de los productos tuberculosos, no siempre es positivo. Por esta razón hay que proceder á las inoculaciones de dichos productos, con lo cual podremos formular un diagnóstico más cierto.

Empero aun cuando todo lo consignado sea de gran utilidad para el diagnóstico de la tuberculosis, no queremos terminar este capítulo sin recordar ligeramente el diagnóstico de la enfermedad en los animales vivos, especialmente en los bóvidos, cápridos y suidos.

Nocard demostró que la tuberculina es un reactivo importantísimo y cierto para revelar la tuberculosis. Los bóvidos tuberculosos, por insignificantes que sean sus lesiones, reaccionan si se les inocula una dosis de 0.30 á 40 gr. de tuberculina bruta, elevándose la temperatura de 1.5 á 3°. En cambio, los que no lo son, no reaccionan.

El *modus operandi* es el siguiente: Si se emplea tuberculina bruta, hay que diluir 1 cent. cúb. en 9 de agua hervida y fenicada. Téngase en cuenta que esta solución se altera pronto, y por lo mismo hay que usarla fresca ó recién preparada,

El animal que tenga que someterse á la prueba de la tuberculina debe estar en reposo, tomándole el día antes la temperatura rectal, y lo mismo debe hacerse el día de la inoculación. Debajo de la piel del cuello se inyecta, según la alzada del animal. 3 ó 4 cent. cúb. de tuberculina diluida, haciéndolo con todas las precauciones de la antisepsia.

Al cabo de doce horas de haber hecho la inyección de tuberculina, se toma tres veces la temperatura del animal, no olvidando que todo inoculado que aumente 1'4° de temperatura debe ser considerado como tuberculoso. En cambio, un animal cuya temperatura aumente 0'5° ó 0'8°, debe considerarse sano. Si la temperatura oscila entre 0'8° y 1'4°, el animal es sospechoso de tuberculosis y hay que someterle al cabo de un mes á otra inoculación reveladora.

En los animales muy afectados de tuberculosis la reacción puede ser negativa, y en los afectados de equinocosis del pulmón el aumento de temperatura puede alcanzar hasta 2°.

Hace poco tiempo que los Dres, Moussu y Mantoux han utilizado para el diagnóstico revelador de la tuberculosis, la vía intradérmica. Por esto llaman al procedimiento intradermorreacción.

La intradermorreacción es el resultado de la in-

yección de una cantidad dosificada de tuberculina en el espesor de la piel.

Este procedimiento es de gran certeza, según los experimentos hechos por dichos profesores. En los animales exentos de tuberculosis, la prueba no da ningún resultado; pero si se hace en animales tuberculosos se observa que después de haber hecho la inyección, presentan una reacción local muy sensible, y que se manifiesta por un aumento de sensibilidad de la piel, aumento de espesor del dermis y aparición, después de las cuarenta y ocho horas de la inyección, de una placa circular de edema subcutáneo, cuyas dimensiones varían desde las de un duro á las de la palma de la mano.

En aquellos animales en que la piel está exenta de materia pigmentaria, la reacción va acompañada de la aparición de una plaquita hemorrágica que tiene por centro y punto de partida el punto de la picadura. Empero la dificultad reside en que en los animales en los cuales la piel es pigmentada, la mancha hemorrágica central no se vé.

Para remediar estos inconvenientes, Moussu y Mantoux aconsejan que se haga la inyección en la base de la cola, y en su cara inferior, próximo á las márgenes del ano, porque en esta región la piel es flexible, elástica y desprovista de pelos y forma dos repliegues laterales cuando se levanta la cola. La inyección debe hacerse en uno de estos repliegues, y la reacción se presenta con gran claridad cuando los animales son tuberculosos.

En la especie porcina no se había hasta ahora consignado un medio práctico para descubrir la

tuberculosis, y había, sin embargo, gran interés en que los ganaderos pudieran saber si en sus explotaciones había ó no animales tuberculosos.

Después de algunos ensayos comparativos, los Dres. Moussu y Mantoux eligieron como punto de elección para practicar las inyecciones, la base de la oreja, porque en ella la piel es flexible. La dosis inyectada á cada animal, sin tener en cuenta el peso, es de un décimo de centímetro cúbico de tuberculina bruta diluida á un centésimo. Si los animales son tuberculosos, en el punto de la picadura se forma una mancha hemorrágica que adquiere rápidamente las dimensiones de una lenteja ó de una peseta; esta mancha va acompañada de una infiltración edematosa intradérmica de dimensiones del tamaño de una avellana ó una almendra. Al cabo de treinta y seis horas pueden apreciarse los resultados, los cuales comienzan á desaparecer al cabo de los tres días.

En las cabras y carneros, los resultados obtenidos en la intradermorreacción, han sido idénticos á los de los bóvidos. La inoculación puede hacerse lo mismo en la piel de una parte del tronco, ó bien como en el buey, en un repliegue subcaudal, y la reacción que se obtiene es muy acentuada en los animales tuberculosos, haciéndose evidente por una infiltración edematosa que dé al tacto una sensación característica.

De los resultados del procedimiento, los autores deducen lo siguiente :

1.º La intradermorreacción por la tuberculina es preferentemente sensible para revelar la tuber-

culosis en las especies animales bovina, caprina y porcina.

2.º La intradermorreacción positiva se pone en evidencia por la evolución de una manifestación local, caracterizada por aumento de espesor del dermis, formación de una placa edematosa en el ganado vacuno y á veces aparición de una mancha roja en el centro, en el ganado de cerda.

3.º Esta reacción local no ocasiona, por lo común, ningún trastorno, no produce fiebre, y si lo hace, es muy moderada, no hace perder el apetito y no disminuye la secreción láctea. Evoluciona sin cambiar las condiciones ordinarias de vida de los animales y sin que sea necesario tomar ninguna precaución especial.

4.º No tiene ninguno de los inconvenientes de las oftalmo y cutirreacciones y tiene todas las ventajas de la inyección subcutánea de tuberculina.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA ACTINOMICOSIS

El agente productor de esta enfermedad es una estreptotricea conocida con el nombre de *actinomyces bovis*, por ocasionar en este animal una enfermedad que se caracteriza por la formación de tumores duros, que llegan á supurar en los maxilares y en la lengua.

El *actinomyces* es un germen aerobio indiferente, germina á 20° y lo hace en la mayoría de los medios de cultivo, aunque el medio más favorable es el suero y los medios glicerinados.

Besson dice que es algo difícil obtener cultivo de *actinomyces* con la siembra del pus, porque de ordinario va asociado á los gérmenes de la supuración y éstos invaden el medio de cultivo antes de que el *actinomyces* haya podido desarrollarse.

Un procedimiento bueno para la obtención de cultivos consiste en esparcir pus que contenga granos amarillos (característico de la actinomicosis), en placas de gelatina. Al cabo de dos días apa-

recen colonias alrededor de los granos sembrados; colonias que son producidas por otros microbios que lleva el producto sembrado impuro; al lado de estos granos que representan un cultivo, se ven otros en los que la gelatina permanece estéril. De éstos es de los que hay que recoger la semilla y transportarla á los tubos de suero solidificado y á una temperatura de 37°. A los cinco ó seis días comienzan á germinar los cultivos de actinomices.

La siembra en caldo glicerinado á 37° produce á los cinco ó seis días unos granos hemisféricos blancos, que llegan á alcanzar el tamaño de un guisante y se precipitan en el fondo del recipiente, mientras el caldo no altera su aspecto límpido. En el suero solidificado los granos son blanquecinos ó amarillentos, duros, y no tardan mucho en hacerse confluentes. Si la siembra se ha hecho en agar glicerinado, aparecen al cabo de dos días pequeñas colonias blancoamarillentas, rugosas y secas, que se adhieren al agar y forman una banda amarillenta agrietada y con asperezas.

En la gelatina el cultivo es pobre, y la licuación del medio se hace muy tarde.

A los seis días se observa colonias pequeñas en forma de puntitos, con centro amarillento y de contornos irregulares.

Cultivado en la patata, el actinomices aparece al cabo de ocho días formando colonias pequeñas, incoloras, que acaban por engrosarse y transformarse en una membrana amarillenta, rugosa y mamelonada, rodeada algunas veces por un círculo negro.

La vitalidad del *actinomyces bovis* es bastante grande con respecto á los agentes destructores. Los cultivos en agar ó en gelatina desecados conservan la vitalidad durante más de un año y los antisépticos no tienen, al parecer, grande acción destructora para el parásito.

Liebmann, fundándose en hechos experimentales, ha comprobado que el *actinomyces* se atenúa al pasar por el cuerpo de los animales y que en las gramíneas el parásito se desarrolla al mismo tiempo que los granos, irradiando la planta bajo el aspecto de filamentos cortos que pueden infectar los tejidos animales.

En el organismo el *actinomyces* se encuentra asociado á otros microbios, especialmente con los microbios de la supuración.

En la actinomicosis, el pus y los tejidos invadidos contienen granos pequeños de color amarillo, de tamaño variable entre un espora de licopodio al de un grano de mijo.

Si el pus que se quiere examinar lleva granos muy pequeños, hay que esparcirlo en capa muy delgada sobre el portaobjetos, con lo que se facilita el que se vean los granos para poderlos recoger y examinar mejor.

La operación se hace del siguiente modo: Tóme-se uno de los granos recogidos en el pus y colóquese entre un porta y cubreobjetos, á los que se ha puesto antes una gota de glicerina. En esta disposición se aprietan los dos cristales para que aplanen el grano ó granos del pus. Vistos en esta forma con el microscopio, se presentan constitui-

dos por pequeños cuerpos muriformes compuestos de una masa central filamentososa, de la que parten numerosos radios divergentes, abultados en sus extremos. Los filamentos que forman la masa central parecen ramificados y están mezclados con corpúsculos pequeños hinchados, de los que de vez en cuando emergen algunos filamentos que terminan al lado de las mazas, midiendo los primeros unos 10 ó 12 μ y las segundas de 20 á 30 μ de largo por 8 ó 10 de ancho.

Las *mazas* son formas degeneradas del parásito, motivadas por la influencia de la reacción celular. En los tejidos, al rededor de los parásitos se acumulan células epiteliales con núcleo oval grande que pueden fusionarse para formar una célula gigante, que además de contener el parásito posee varios núcleos.

Por lo que respecta á la coloración, hay que consignar que los filamentos del actinomicetes se tiñen por los colores básicos de anilina y toman el Gram y el Ziehl.

Las *masas* se colorean con el picrocarmin, la safranina y la eosina.

Los granos aplastados entre los dos cristales (porta y cubreobjetos), después de haberlos desecado y fijado, se tratan por el método de Gram con coloración de fondo por la eosina; los filamentos quedan teñidos en color violeta y las mazas (ó abultamientos terminales) se colorean de amarillo ó rosa.

Para colorear los cortes de tejidos se obtienen hermosas preparaciones; sometiéndolos por espacio de treinta ó cincuenta minutos en la fuchina

de Ziëhl, decolorándolos rápidamente con el ácido sulfúrico al 1 por 100, lavándolos con alcohol primero y con agua á continuación y coloreando el fondo con una solución acuosa de azul de metilo.

Una fórmula recomendada por Morel y Dulaus consiste en lo siguiente: Primero se colorean los cortes durante algunos minutos con la hematoxilina de Delafield acetificada (se adiciona ácido acético hasta que la solución adquiere un color rojizo), luego se lava con agua y se someten los cortes durante tres minutos en esta solución:

Azul Victoria	1 gramo
Alcohol	10 cent. cúb.
Agua	90 »

Se vuelve á lavar la preparación y se somete á la acción del liquido de Gram durante algunos instantes, se lava con alcohol y durante algunos minutos se colorea con la solución siguiente:

Violeta de rosanilina	1 gramo
Alcohol	10 cent. cúb.
Agua	90 »

Después de haber lavado con agua la preparación y haberla pasado por el alcohol absoluto puede decolorarse muy aprisa si se hace con una mezcla de partes iguales de esencia de canela y alcohol absoluto. Así que los cortes adquieren un color rojo, hay que lavarlos con alcohol, aclararlos con el xilol y montarlos en el bálsamo.

En estas preparaciones se ven los núcleos de las células colorados en violeta, el micelio en azul y los abultamientos en rojo.

Para la coloración del pus se recomienda utilizar el procedimiento de Lemière y Becue, que consiste en esparcir el pus sobre un portaobjetos, desecarlo y lavarlo con éter. Luego se hace obrar por algunos minutos una solución de sosa al 30 por 100, se colorea con una solución acuosa de eosina al 5 por 100 y se lava con una solución acuosa saturada de acetato de sosa. La masa central de los actinomicés es roja y los abultamientos aparecen coloreados en rosa pálido.

DIAGNÓSTICO BACTERIÓLOGO DE LA ACTINOBACILOSIS

Con este nombre, los profesores Lignières y Spitz han dado á conocer una enfermedad de los bóvidos, tan parecida á la actinomicosis, que por mucho tiempo se la confundía con dicha afección.

El agente causante de la enfermedad es un actinobacilo que, en los cultivos, afecta la forma de bacilo, cocobacilo ó diplococo.

No posee movilidad, ni esporula.

Se colorea fácilmente por los colores de anilina, especialmente por la fuchina fenicada y se decolora con rapidez por el método de Gram.

En el aire y en el vacío se cultiva á la temperatura de 37°. Sembrado en caldo peptonizado, lo enturbia sin cambiar la reacción del mismo, ni deja sentir ningún olor especial. Añadiendo suero al cultivo, éste germina mejor, y si la siembra se ha hecho en gelatina, la germinación es exigua, porque la temperatura no favorece el medio. En el agar encuentra el actinobacilo un medio favorable,

pues al cabo de veinticuatro horas ya se ven colonias pequeñas, translúcidas, azuladas ó más grandes y opacas.

El bacilo es patógeno para el buey, carnero, cobayo y rata gris.

Las localizaciones de la enfermedad son parecidas á las de la actinomicosis, aunque las lesiones asientan, con preferencia, en el tejido conjuntivo subcutáneo.

En la actinobacilosis cutánea la infección se manifiesta por colecciones purulentas ó por inducciones difusas.

Los abscesos purulentos se forman con mayor frecuencia en la región de las fauces y adquieren el aspecto de tumores redondeados, empastados, del tamaño de una nuez ó de una manzana, indolentes á la presión y adherentes á la piel, sin que en ella se vea edema periférico.

Al cabo de algunas semanas ó de varios meses se absceden los tumores y dan salida á un pus viscoso, de color blanco ó algo verdoso, inodoro, que si se examina con detención se ve en él unos grumos pequeños blancogrisáceos, del tamaño de una cabeza de alfiler.

A veces la actinobacilosis afecta la forma ganglionar, ocasionando adenitis superficiales ó profundas que pueden ocasionar en este último caso trastornos respiratorios ó digestivos, enflaquecimiento y muerte por inanición.

Si la localización es en la lengua, el aspecto clínico de la enfermedad es el de la actinomicosis.

Por lo que respecta al diagnóstico de esta enfer-

medad, es fácil hacerlo clínicamente, si se tiene en cuenta que las manifestaciones de la afección suelen ser siempre en la piel y raras veces en los maxilares. Además, la infección de los ganglios próximos al órgano invadido es otra manifestación de valor clínico.

Para confirmar el diagnóstico, hay que hacer el examen microscópico del pus.

La glicerina picrocarminada colorea las masas en amarillo, mientras que los glóbulos del pus adquieren un color rosáceo. Además no se ven nunca formas filamentosas y el método de Gram es siempre negativo.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA BOTRIOMICOSIS

El botriomices se presenta en los tejidos en montones muriformes de medio milímetro de diámetro. Se tiñe bien con los colores de anilina, y también por el método de Gram.

El cultivo se consigue en todos los medios.

La siembra en el caldo produce un enturbiamiento al cabo de veinticuatro horas y acaba por formar un precipitado amarillento.

En la gelatina en placas las colonias redondeadas, brillantes, de aspecto metálico, pasan del blanco plateado al amarillo gris y acaban por producir la licuación.

La siembra en agar produce una capa blanca al principio, que después adquiere un color de oro ó anaranjado.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA MAMITIS DE LAS VACAS LECHERAS

La mamitis contagiosa de las vacas lecheras es una enfermedad que se caracteriza clínicamente por una induración de la glándula, que puede invadir parte ó todo el órgano mamario.

El agente productor de esta afección, es un *coccus* de forma ovoidea, que, asociado con otros, presenta el aspecto de cadenillas y que en los cultivos, suelen aparecer muy largas.

Los colores básicos de anilina lo colorean bien y se tiñe mal por el método de Gram.

El estreptococo de la mamitis es aerobio indiferente, suele cultivarse en los medios más corrientes y la temperatura mejor para la germinación es la de 35° á 37°.

Sembrado el estreptococo en la leche, crece muy aprisa, la coagula á las 24 horas y el medio de cultivo adquiere una reacción ácida.

En el caldo, con adición del 2 al 4 por 100 de lactosa ó glucosa, y á la temperatura de 37°, se forma muy pronto un precipitado blanquecino formado

por largas cadenillas. También este medio de cultivo se acidifica con rapidez.

Los tubos de gelatina sembrados por picadura dejan ver á los tres ó cuatro días, colonias blancuecinas, opacas, redondas que, á no tardar, se vuelven confluentes. La gelatina no se licúa nunca.

El diagnóstico bacteriológico de la mamitis estreptocócica de las vacas lecheras, puede hacerse depositando una gota de leche sobre un portaobjetos, dejándola desecar y coloreándola con la tianina ó azul fenicados.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA MAMITIS GANGRENOSA

Esta enfermedad es causada por un coccus pequeño, que se coloca bien por los colores básicos de anilina y por el método de Gram.

El coccus de Nocard es aerobio indiferente, se desarrolla en los medios de cultivo neutros ó alcalinos más corrientes, y la temperatura mejor para su germinación es entre 35° y 39°.

Lo mismo que el estreptococo de la mamitis de la vaca, conserva por mucho más tiempo su vitalidad en el caldo carbonatado que en el caldo ordinario.

El coccus se desarrolla en la leche coagulándola en veinticuatro horas, y comunicándola una reacción fuertemente ácida. La siembra en caldo ordinario ó glucosado se enturbia y produce un poso blanco abundante y el cultivo adquiere una acidez fuerte.

DIAGNOSTICO BACTERIOLÓGICO DEL ABORTO EPIZOÓTICO DE LAS VACAS

El agente específico del aborto epizoótico fué descubierto por Bang, en 1837, quien consiguió aislarlo de los exudados de la superficie interna del útero, de las envolturas fetales, de la sangre y de las vísceras de los fetos abortados. Dicho germen sólo se desarrolla en presencia de una determinada cantidad de oxígeno.

Crece en todos los medios de cultivo. En agar puede hacerse la siembra superficialmente, en tubos inclinados, ó en placas de Petri, ó bien por picadura profunda en tubos verticales, ó repartiéndolo la semilla en el medio líquido á temperatura prudencial y luego dejarlo enfriar. La adición de suero en el agar no es indispensable si la siembra del germen se hace en la superficie del medio de cultivo. Pero si éste es profundo, la adición de suero favorece el crecimiento. En los tubos inclinados de agar ordinario, sembrado en estria, el bacilo de Bang se desarrolla desde el tercer día á la temperatura de 37°.

Las colonias se muestran como manchas transparentes que simulan una gota de rocío con reflejos verdosos, y van creciendo si se conserva los tubos á la temperatura de la estufa.

En los tubos de agar, cuyo medio de cultivo se halla en sentido vertical, y en los que se ha hecho la siembra por picadura, el desarrollo comienza á los cuatro días y á 10 milímetros por debajo de la superficie en forma de reguero.

Cultivado el bacilo de Bang en gelatina se desarrolla con mucha más lentitud que en el agar á 37°. Á las cuatro ó seis semanas aparecen colonias, algunos milímetros por debajo de la superficie, que luego se reproducen á mayor profundidad, sin duda, á medida que el aire penetra en el medio.

En el caldo alcalino ordinario y á la temperatura de 37°, se desarrolla el bacilo del aborto epizootico, lo mismo al aire libre que en el vacío. Unas veces se hace su desarrollo en todo el espesor del líquido, otras se hace algunos milímetros debajo de la superficie, quedando claro el resto del caldo.

Si se agita el tubo el desarrollo continúa en toda la masa y pronto se depositan copos en el fondo del tubo ó matraz.

El bacilo de Bang se encuentra, sobre todo, en el exudado uterino, y en el flujo vaginal de las vacas que han abortado.

El diagnóstico bacteriológico puede hacerse aislando el bacilo específico del feto expulsado, de sus envolturas, ó bien del flujo vaginal.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DEL TÉTANOS

Aun cuando esta enfermedad no necesita de investigaciones bacteriológicas para su diagnóstico, porque tiene un aspecto clínico característico, no queremos dejar de recordar algo que puede convenir en alguna ocasión.

El bacilo causante del tétanos fué descubierto por Nicolaïer. Se le encuentra en el suelo, en el barro, en el contenido intestinal, excrementos, etc., en forma de esporos.

El bacilo de Nicolaïer se presenta en forma esporulada ó sin esporos. En el primer caso se le ve en su aspecto de bastoncito fino, con un abultamiento en su extremo, que le da parecido á un paillo de tambor, ó á un alfiler.

Los colores básicos de anilina lo tiñen con facilidad y toma el Gram.

El bacilo del tétanos es anaerobio, pero puede germinar en medios en que haya pequeñas cantidades de oxígeno. Empero, en los cultivos, hay que someterlo á las condiciones exigidas por los anaerobios absolutos.

La germinación y desarrollo se hace entre los 14° y 43° de temperatura. Sin embargo, la más conveniente es la de 38°, pues, si bien es cierto que á 43° los bacilos crecen con rapidez, en cambio, no todos esporulan.

Los medios de cultivo para el bacilo del tétanos son los usuales, á base de caldo, neutros, ligeramente alcalinos, ó débilmente ácidos. Los líquidos orgánicos tales como la albúmina de huevo, suero fresco, dan cultivos poco abundantes.

En el caldo, al abrigo del aire y á la temperatura de 37° á 39° el cultivo es rápido. Al cabo de veinticuatro horas aparece un enturbiamiento y se ven burbujas de aire que suben á la superficie del líquido. Al cabo de quince días se forma un precipitado en el fondo del tubo y el caldo adquiere su transparencia.

Los cultivos del bacilo del tétanos desprenden un olor á *cuerno quemado*, debido al desarrollo de gases de hidrógeno carbonado.

Si se hace la siembra en gelatina, por picadura profunda, en un tubo al abrigo del aire, sometido á una temperatura de unos 20°, se observa á los 4 ó 6 días un desarrollo de puntos parecidos á pequeños copos, que van extendiéndose hasta comenzar la licuación de la gelatina, al cabo de diez días, formándose entonces en el fondo del tubo un precipitado algo abundante.

Cuando se trata de encontrar y aislar el bacilo del tétanos, de la tierra, hay que inocular un cobayo con una parte de la misma y del cadáver del animal inoculado, se aísla el germen causante del tétanos.

Si la investigación recae en un tetánico que tenga una herida que se supone ha sido la puerta de entrada ó punto de inoculación, entonces se procede del modo siguiente :

Recoger en portaobjetos limpios, pus ó productos de la herida, y coloreados con cristal violeta fenicado ó fuchina de Ziehl diluida. No siempre es fácil hallar el bacilo del tétanos en las preparaciones que se hagan. En este caso, conviene hacer siembras de pus en los medios de cultivo indicados.

Para obtener puro el bacilo del tétanos puede utilizarse el procedimiento de Kitasato, modificado por Vaillard y Vincent, que se funda en la resistencia del esporo al calor y en la propiedad anaerobia del bacilo. He aquí como se procede:

Se siembra pus ó otro producto tetánico en caldo de buey y se lleva á una temperatura de 38° en el vacío. Al cabo de cinco días el caldo se ha enturbiado y contiene abundantes bacilos en forma de alfiler y mezclados con otros microbios anaerobios.

En este caso, es ya algo fácil poder hacer el diagnóstico bacteriológico, pero, para aislar el bacilo, hay que aspirar un poco de cultivo con un tubo muy delgado, ó con la punta de una pipeta, la que, una vez llena, se cierra por sus dos extremos con la llama del mechero. Este tubo cerrado, se lleva á una temperatura de 100°, con la cual se destruye los gérmenes, pero no los esporos. Luego se siembra en caldo y en el vacío, el contenido del tubo, y si esta operación se repite dos ó tres veces

pueden obtenerse bacilos tetánicos en estado de pureza.

Los esporos del bacilo del tétanos resisten muchísimo á los agentes destructores, llegando á soportar durante seis horas una temperatura de 80°, y, por más de dos horas la temperatura de 90°. También resisten la ebullición durante tres ó cuatro minutos.

Los esporos desecados, mezclados con tierra y al abrigo de la luz, conservan su vitalidad y virulencia durante varios meses; pero si se someten á la acción de la luz la pierden muy aprisa.

DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR PROTOZOARIOS

PIROPLASMOSIS

Con este nombre se conocen las enfermedades ocasionadas por los piroplasmas hemosporidias ó parásitos endoglobulares, que se encuentran en la sangre de los bóvidos, óvidos, equidos y cánidos.

La piroplasmosis bovina, conocida también con los nombres de *hemoglobinuria*, *fiebre del Texas*, *tristeza*, *malaria de los bóvidos* es causada por el *piroplasma bigeminum*.

Además de los síntomas que presentan los animales afectados de piroplasmosis, el examen microscópico de la sangre aclara y afirma el diagnóstico de la enfermedad.

En la sangre de la grande circulación casi siempre se encuentra el parásito en estado endoglobular, ofreciendo dos aspectos principales:

1.º Elementos esféricos ú ovals, midiendo los más pequeños cerca de $1\ \mu$, que después de coloreados, dejan ver un karyosoma redondeado ú oval situado en la periferia. También pueden

hallarse dos parásitos dentro de un mismo hematíe.

En los elementos más voluminosos el karyosoma se alarga y se divide en dos partes.

2.º Elementos piriformes gemminados, que miden 2'5 ó 3'5 μ de longitud.

Generalmente los extremos puntiagudos de los dos elementos alojados en el mismo hematíe son continuos ó contiguos, pudiendo observar los elementos completamente separados, cuyas puntas están vueltas en sentido contrario.

Después de haber coloreado la preparación, se ve en el extremo abultado, un karyosoma redondeado ú oval, rodeado á veces de una zona clara y en la parte de la punta afilada se observa una aglomeración de granulaciones. A veces un solo glóbulo rojo contiene cuatro elementos piriformes, lo que se explica ora por la invasión de un glóbulo por dos parásitos que se han dividido en otros dos, ó bien por la división de un solo parásito en cuatro.

Los elementos piriformes son más numerosos que las formas redondas ú ovals.

Para el diagnóstico de la piroplasmosis podemos valernos del examen de la sangre, fresca ó desecada, de los cultivos y de las inoculaciones.

El examen de la sangre es, según Laverán y Nicolle, como sigue:

1.º Fijación de la preparación á 110º durante algunos minutos y por espacio de uno, con la solución acuosa saturada de sublimado.

2.º Colorear en una mezcla de eosina y azul de

Laverán durante una ó dos horas, lavar y tratarla por el tanino.

Si la coloración fuera muy intensa, hay que decolorarla con el alcohol absoluto.

El cultivo artificial del piroplasma se consigue sembrando sangre abundante en parásitos, en suero muy cargado de hemoglobina, mantenido á la temperatura de 37°. Al cabo de unas dos semanas los piroplasmas salen de los glóbulos y pierden el núcleo. Más tarde el núcleo vuelve á formarse y se divide en 2 ó 5 cuerpos esféricos, que se rodean de un protoplasma y constituyen los esporos, los cuales á su vez reproducen cuerpos esféricos. En los cultivos no se ven nunca los cuerpos piriformes.

Para las inoculaciones comprobatorias de la piroplasmosis bovina, únicamente el buey es animal receptivo. El éxito de la inoculación depende de la abundancia de los parásitos en la sangre que se inoculara, cuando en ella abundan, las dosis de un décimo ó un vigésimo de centímetro cúbico son suficientes para infectar al animal inoculado. No obstante, en muchas ocasiones hay que inyectar en la piel, sistema circulatorio ó en los músculos, 1, 2 y hasta 10 centímetros cúbicos. La inoculación por las vías digestivas no da ningún resultado.

Además de la piroplasmosis bovina, ocasionada por el *piroplasma bigeminum*, hay otra piroplasmosis baciliforme, que se conoce con el nombre de fiebre de Rhodesia ó piroplasmosis tropical. Es producida por el *piroplasma parvum*.

Afecta, según Theiler, dos tipos clínicos: uno con fiebre, diarrea sanguinolenta, ictericia intensa,

temblores musculares y la muerte; otro caquéctico, que evoluciona lentamente con fiebre pasajera, á la que sigue una apirexia completa y una ictericia crónica.

En la sangre de los bóvidos infectados de esta enfermedad, se encuentran tres formas parasitarias. En la forma aguda se hallan elementos bacilares y elementos anulares; en el plasma de estos elementos existe una mancha cromática, los parásitos poseen movimientos amiboides y con frecuencia se observa un cambio de transformación.

En la piroptasmosis caquéctica se observa únicamente formas puntiformes, constituidas por montones de cromatina inmóviles. Los parásitos abundan en la sangre en la forma aguda de la enfermedad y en la misma sangre, además de verse el *piroplasma parvum* se halla también en número reducido el *piroplasma bigeminum*, cosa que se explica por la existencia de ambas infecciones.

La piroplasmosis de los carneros ha sido descrita antes que nadie por Babés en Rumanía. Esta enfermedad ofrece una forma grave mortal, que se caracteriza por anemia, postración y hemoglobiuria, y otra forma benigna que á menudo pasa inadvertida y se cura.

En la sangre de los óvidos infectados se ven los parásitos endoglobulares, que contienen un karyosoma colocado en la periferia. Los elementos bigeminados y piriformes raras veces asientan en los hematíes, suelen estar libres y lo más frecuente es ver un parásito en cada glóbulo.

En los frotis del bazo los elementos son más

abundantes que en la sangre de la grande circulación, aunque ofrecen el mismo aspecto.

En el perro afectado de piroplasmosis la sangre contiene numerosos parásitos en la forma aguda de la enfermedad, y muy raros en la forma crónica.

Los parásitos endoglobulares, son ora redondeados, ora piriformes y gemminados, pudiéndose hallar hematíes que contienen hasta ocho piroplasmas.

Los cultivos hechos *in vitro* por Kleine han demostrado que los parásitos se modifican, sin que haya verdadera multiplicación. Se toma sangre de perros inyectados, se desfibrina y se diluye antes de que muera el animal y se mezcla á un volumen igual de solución fisiológica, sometida á la temperatura de 25 á 27°.

DIAGNÓSTICO DE LAS TRIPANOSOMIASIS

Los tripanosomas, son protozoarios libres, flagelados, sin pestañas vibrátiles, provistos á veces de una membrana ondulante, que viven en la sangre y ocasionan enfermedades á varios de nuestros animales domésticos.

Entre los tripanosomas, parásitos de la sangre, debe señalarse, en primer término, el causante de la *durina* de los équidos, conocido con el nombre de *Trypanosoma equiperdum*, descubierto por Rouget.

El tripanosoma de la durina es fusiforme, mide de 25 á 28 μ de largo por 2 μ de ancho, su protoplasma no ofrece granulaciones y posee una membrana ondulante, cuyo borde libre se continúa hacia delante por el flagelo y va desapareciendo hacia atrás en el centrosoma. La movilidad de los parásitos dura bastantes horas en las preparaciones hechas con sangre fría.

Las tentativas de cultivo del parásito de la durina, hechas en sangre de animales receptivos, no

han dado resultado, puesto que fuera de los vasos la virulencia de los tripanosomas desaparece en menos de veinticuatro horas.

Hay que echar mano, pues, de las inoculaciones á los animales receptivos. Los animales de sangre fría, las aves, los bóvidos, el mono y el cobayo son refractarios á las inoculaciones y no lo son la rata, conejo, perro y los équidos.

La inoculación es fácil de hacer, inyectando un poco de serosidad sanguinolenta ó bien algunos centímetros cúbicos de sangre que contenga parásitos, debajo de la piel, en el peritoneo, en las venas, ó también depositando una gota de dicha serosidad sobre una escoriación hecha en la piel ó sobre una mucosa intacta.

Inoculado el parásito á la rata, se generaliza con rapidez ocasionando la muerte al cabo de cinco ó seis días.

En el caballo, á los cuatro días de inoculado por la piel, se produce una infiltración del tejido conjuntivo en el punto de la inoculación, cuyo exudado contiene leucocitos y tripanosomas. Al cabo de ocho días de la inoculación los parásitos disminuyen hasta que desaparecen. Schneider y Buffard, han observado que los parásitos que se encuentran en la serosidad del edema, afectan formas diferentes ó sean: tripanosomas adultos, cuerpos voluminosos, piriformes inmóviles provistos de apéndices y tripanosomas agrupados que convergen hacia un punto central, formado por la confluencia de sus partes posteriores. Los mismos autores creen que las placas observadas en los

animales enfermos de durina se producen por hallarse detenidos los parásitos en los capilares del dermis y lo mismo ocurre con los focos hemorrágicos y de reblandecimiento que se ven en los centros nerviosos, producidos por la emigración de los tripanosomas en los vasos medulares que obturan y perforan.

En orden de receptividad, el asno lo es menos que el caballo, lo es mucho el perro y en él dominan los trastornos oculares.

La enfermedad conocida con el nombre de *Nagana* ó de la mosca *Tsetse* (*Glossina morsitans*), es ocasionada por un tripanosoma descubierto por D. Bruce y transmitida á los animales por la referida mosca.

Sin embargo, hay otros modos de transmisión, tales como las mordeduras de animales infestados á otros sanos, erosiones de las encías é inoculación de saliva que contenga sangre del animal afectado de la enfermedad.

El *tripanosoma Brucei* se presenta en forma de vermes pequeños movibles, provistos de una membrana ondulante y de un flagelo anterior. Cuando los parásitos están en vías de división poseen dos membranas ondulantes y su protoplasma posee en su parte anterior, granulaciones grandes que fijan muy bien la substancia colorante.

Algunos autores, han conseguido cultivar el *T. Brucei* en agar y sangre, en la proporción de dos partes de sangre por una de agar. Las siembras fracasan muchas veces y para alcanzar algún resultado hay que sembrar en muchos tubos.

La mayor parte de las especies mamíferas son inoculables y la inoculación responde, sea cual sea, la vía que se utilice. El período de incubación es variable y depende de la cantidad de parásitos que contiene la sangre que se inyecta. Para la rata, perro y mono, la enfermedad es siempre aguda y mortal, no lo es tanto para el conejo, cobayo, caballo, asno y cerdo, y en el buey, carnero y cabra, afecta una marcha crónica que puede llegar á curar.

Entre las enfermedades tropicales producidas por protozoarios, hay la conocida con el nombre de *Surra* que padecen los caballos, bueyes, elefantes y camellos de las Indias. La causa de esta enfermedad es un tripanosoma diferente del productor del *Nagana*, descubierto por G. Evans, morfológicamente es igual al *T. Brucei*, aunque existen diferencias entre las enfermedades que ocasionan. También los cultivos de este parásito son difíciles de conseguir y también en la transmisión de la enfermedad juega, al parecer, un papel importante una mosca del género *Tabanus*. Otra enfermedad causada por tripanosomas, es la llamada *mal de caderas*, que padeceden los équidos en la América del Sud, y que consiste en fiebre, enflaquecimiento, anemia y paresia del tercio posterior. El tripanosoma productor *del mal de caderas* (*Tripanosoma equinum*), fué descubierto por Elmassian y aun cuando en las preparaciones de sangre fresca es idéntico al *T. Brucei* y al *T. Evansi*, se diferencia de estos por los caracteres de su centrosoma, que es mucho más pequeño y se colorea como el

flagelo. Son sensibles á la inoculación de esta enfermedad, el caballo, mulo, asno, mono, rata, rata blanca, cobayo, conejo y perro. No obstante de que en el carnero, buey y cerdo, los síntomas son nulos, la sangre se infesta y llega á ser contagiosa para la rata por espacio de dos meses.

Los bóvidos del Transwaal, padecen una tripanosomiasis que se caracteriza por anemia y fiebre (no constante), que á veces afecta una forma perniciosa y ocasiona la muerte. El agente que produce la enfermedad es un tripanosoma descubierto por Theiler, y ofrece una forma grande y otra pequeña. La primera mide de 60 á 70 μ de largo por 3 á 4 de ancho, la segunda de 25 á 30 μ de largo por 2 á 3 de ancho. Es el tripanosoma más grande que se encuentra en los mamíferos y sólo es inoculable á los bóvidos. Su núcleo es ovalado, ; el centrosoma es redondeado y está situado bastante lejos del extremo posterior del cuerpo. La transmisión de la enfermedad la hacen los *Hippobosca rufipes* y *H. maculata*.

Las aves padecen tripanosomiasis. Danilewsky, fué quien primero describió la enfermedad y su agente productor. El *Trypanosoma avium*. es un vermiculo que posee una membrana ondulante y un flagelo en su parte anterior, siendo las dimensiones del tripanosoma (comprendido el flagelo) de 33 á 45 μ de largo. La coloración del protoplasma es tan intensa, que, á veces el núcleo y el centrosoma se ven con dificultad.

Por lo que respecta al diagnóstico microscópico

de las tripanosomiasis, he aquí las indicaciones más sencillas:

Si se trata de investigar la presencia de los tripanosomas en la sangre fresca, se deposita una gota de sangre sobre un porta-objetos y junto á esta gota, se deposita otra de solución de azul de metilo en solución acuosa de cloruro de sodio á 0'75 gr. por 100. Hecho esto, se aplica el cubre-objetos, con lo cual, se consigue que se mezclen ambas gotas y los parásitos absorban la substancia colorante.

Los tripanosomas pueden colorearse con diferentes reactivos, pero más especialmente con el azul de metileno, violeta de genciana, violeta de dalia y la hematoxilina de Boehmer. Si se emplea el primero de estos colorantes, ha de ser en solución acuosa saturada, haciéndolo obrar sobre el portaobjetos por espacio de treinta segundos. Con este procedimiento sólo fijan el color, los núcleos de los leucocitos y los parásitos.

Laverán recomienda el empleo de una solución de eosina al 0'5 por 100 y luego colorear con la solución acuosa de azul, con lo cual se consigue una coloración doble; los glóbulos rojos se tiñen de color rojo y los núcleos de los leucocitos y los parásitos lo hacen en azul.

Para el estudio de la estructura y coloración del núcleo de los parásitos hematozoarios, el mejor procedimiento de coloración es el de Laverán, basado en el empleo del azul de Borrel. Este colorante se prepara echando algunos cristales de nitrato de plata en un frasco de 150 centímetros

cúbicos de capacidad y 50 de agua destilada y una vez disuelto se acaba de llenar el frasco con lejía de sosa y se agita. El precipitado negro de óxido de plata que resulta, se lava varias veces en agua destilada y la última agua del lavado se decanta y substituye por una solución acuosa saturada de azul de metileno medicinal de Höchst, se agita varias veces, se deja en contacto quince días y luego se decanta el líquido que constituye el azul de Borrel.

Para colorear la sangre desecada, se fija previamente la preparación por espacio de cinco ó diez minutos en alcohol absoluto y luego se coloca en la preparación de la solución siguiente:

Azul de Borrel	1 cent. cúb.
Solución acuosa de eosina al 1p. 1,000	5 »
Agua destilada	4 »

Mézclense con cuidado las soluciones de eosina y azul y filtrense en el momento de hacer la mezcla. Esta, se echa en una cápsula de Petri y en ella se coloca la preparación de manera que la cara de la misma que contacta con el líquido, no toque al fondo y, por tanto, en el precipitado que en él se acumula ordinariamente.

DIAGNÓSTICO DE LA COCCIDIOSIS

Las coccideas están formadas por pequeños cuerpos amiboides, esféricos ú ovoides, de protoplasma granuloso y provistos de un núcleo. Son parásitos de los vertebrados é invertebrados y tienen un papel patológico de bastante consideración.

El conejo padece la enfermedad y con alguna frecuencia se ven en el hígado de este animal unas masas blanquecinas ó amarillentas que tienen el aspecto de pequeños abscesos reblandecidos y se hallan en los canaliculos del hígado ó en el parénquima hepático.

El diagnóstico es sumamente sencillo, pues basta diluir el contenido de un quiste en un poco de agua ó en solución fisiológica y examinar con el microscopio. Si se tiñe la preparación con una gota de solución acuosa de eosina, se destacan más las coccideas, porque el fondo queda teñido en rosa y los parásitos no se colorean.

FIN

ÍNDICE

	<u>Págs.</u>
Advertencia	5
Los microbios	7
Esterilización	9
Los medios de cultivo	14
Siembra de los microbios aerobios	21
Cultivo de los gérmenes anaerobios	28
Coloración de los microbios	31
Coloración de las cápsulas, esporos y flagelos microbianos.	36
Animales que se utilizan en Bacteriología	40
Cultivo de los microbios en sacos de colodión	50
Coloración de los microbios en los tejidos que los contienen.	62
El microscopio y sus accesorios	66
Diagnóstico bacteriológico de las enfermedades. — Diagnós- tico de las pasteurelosis.	78
Diagnóstico bacteriológico del mal rojo del cerdo.	82
Diagnóstico bacteriológico del carbunco bacteridiano	85
Diagnóstico del carbunco sintomático.	89
Diagnóstico bacteriológico del muermo	94
Diagnóstico bacteriológico de la linfagitis epizoótica	102
Diagnóstico bacteriológico de la papera	105
Diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis	108
Diagnóstico bacteriológico de la actinomicosis.	122
Diagnóstico bacteriológico de la actinobacilosis	128
Diagnóstico bacteriológico de la botriomicosis.	131

	<u>Págs.</u>
Diagnóstico bacteriológico de la mamitis de las vacas lecheras	132
Diagnóstico bacteriológico de la mamitis gangrenosa	134
Diagnóstico bacteriológico del aborto epizoótico de las vacas	135
Diagnóstico bacteriológico del tétanos.	137
Diagnóstico de las enfermedades producidas por protozoarios	141
Diagnóstico de las tripanosomiasis	146
Diagnóstico de la coccidiosis	153

ERRATAS MÁS IMPORTANTES

<u>Pág.</u>	<u>Línea</u>	<u>Dice</u>	<u>Debe decir</u>
16	28	arístico	ascítico
65	15	laminable	laminilla
75	29	exagerados	engrasados