

TRABAJOS ORIGINALES

Lister y sus precursores

POR EL

DR. PEDRO FARRERAS

Ningún genio, ningún rey, de la presente ni de las pasadas generaciones, ha hecho una conquista tan directamente beneficiosa para la humanidad como José Lister, y, sin embargo, este hombre acaba de morir sin que la inmensa mayoría de los periódicos, médicos y no médicos, le haya consagrado recuerdo. Es más: las rivalidades nacionales han contribuido a este olvido general, con una relativa conspiración de silencio. Aunque nada valga nuestro pésame, no queremos dejar pasar esta ocasión sin tributar este humilde homenaje al más grande de los bienhechores humanos.

Como la que ha inmortalizado a Darwin, la salvadora doctrina que ha hecho imperecedero el nombre de Lister estaba en el ambiente. Desde tiempo inmemorial existía la idea de la purificación del aire y, en general, de las cosas y aun de las personas por medio de los perfumes, de los humos, del incienso, del fuego, y se conocía la eficacia purificadora del oro, y se conservaba las carnes ahumándolas o salándolas y los cadáveres embalsamándolos, y se sabía curar las heridas con antisépticos, como el vino, el vinagre, diversos bálsamos, el aceite hirviendo, el hierro candente...

Pero, sobre todo, desde hacia un siglo, el secreto de la pureza del aire preocupaba hondamente a los médicos, cirujanos, higienistas y químicos. En 1769, por ejemplo, Boissieu, Bordenave y Godart estudiaban ya los antisépticos

y Guyton de Morveau enseñaba un procedimiento nuevo de desinfección. A fines del siglo XVIII se había observado principalmente por John Hunter, que las heridas curaban tanto más pronto y bien cuanto mejor se las protegía contra el contacto atmosférico. Y los ingleses Smyth y Johnstone, los franceses Desgenettes y Labarraque, los alemanes Wetzler, Weitenhiller y Schweinsberg, enseñaban diversas maneras de desinfectar el aire. Y con motivo de la peste, del tifus, del cólera y de la fiebre amarilla, se fumigaba todo de modo inexorable.

Luego Schwann hacía sus notabilísimos experimentos acerca de la putrefacción y la generación espontánea, demostrando que, cuando se había hervido líquidos putrescibles, éstos no daban origen a seres vivos ni se descomponían, si se les conservaba en matraces cerrados a la lámpara. Y Schröder y Dusch probaban que si se renovaba el aire del interior de los matraces, tampoco sobrevenía la putrefacción, con tal de hacer pasar el aire nuevo por un tubo calentado al rojo antes de dejarlo entrar en el matraz. En fin, Pasteur multiplicaba y perfeccionaba estos experimentos, y con ellos apasionaba intensamente por utilizarlos para destruir de modo decisivo el error de la generación espontánea, que se discutía entonces extraordinariamente, sobre todo desde puntos de vista religiosos.

Las ideas de Lister estaban, pues, en el ambiente. Pero sólo un hombre como él, concreto, preciso, irreprochable, «notabilísimo — como ha dicho L. Championnière — por la nitidez de su pensamiento», familiarizado con el mundo microscópico (su padre fué ya un perfeccionador del microscopio y él había empezado sus trabajos originales con el estudio estructural del tejido muscular), sólo un cirujano así, podía concebir con absoluta claridad la intervención de los microorganismos en las infecciones quirúrgicas.

Acaso exageró la importancia del aire como vehículo de los mismos, pero esto en aquella época y sobre todo en Inglaterra no podía ser de otro modo. Dominaba la idea de los *miasmas* flotantes en el aire, y en el país de la niebla y del humo; de los deportes y tratamientos al aire libre; donde antes y más han preocupado los problemas relativos a la purificación del aire y a la ventilación; donde nacieron el *block-system* para la construcción de cuarteles y la idea

feliz de la supresión de las alcobas; en el país, en fin, en donde Tyndall, poco después de Pasteur y de Lister, estudiaba los microbios y polvos del aire desde un punto de vista físico, la exageración de Lister era inevitable.

Esta exageración, empero, no le impidió ver, con admirable sagacidad, no sólo la enorme importancia de la pulcritud más extremada de las manos, de las curas, del campo quirúrgico, del instrumental, etc., sino también la trascendencia de dañar lo menos posible a las heridas con las curas y con los antisépticos excesivos. Por esto tendió siempre a disminuirlos. Suyo es el aforismo, *to be let alone*, que Cardenal, el principal introductor del método de Lister en España, tradujo por: «dejad a la herida sola y tranquila». Y el método antiséptico listeriano fué, por último, lo que más contribuyó a la creación de los actuales métodos asépticos.

Los beneficios alcanzados han sido incomparables. La erisipela, la podredumbre hospitalaria, la gangrena, las piemias y septicemias, que tanto complicaban a las heridas operatorias, han desaparecido. La mortalidad que, antes de Lister, era de 100 por 100 para ciertas operaciones, descendió a $\frac{1}{2}$ por 100. Lo que antes no era operable, lo fué. Las heridas de las guerras perdieron gran parte de su horror. Y, gracias a los métodos antisépticos, aplicados a la obstetricia, el número de madres, víctimas de la septicemia puerperal, y el de niños víctimas de la muerte de sus madres y de las infecciones umbilicales, han disminuido de modo asombroso. En fin, la misma medicina y especialmente la fisiología, deben a Lister un enorme progreso por lo que ha facilitado el éxito de las vivisecciones.

Por esto, Virchow y Pasteur, hicieron de Lister los mayores elogios. «Mylord, no es una profesión ni una nación, sino la humanidad entera, quien os saluda y se inclina ante vos», le dijo M. Bayard, embajador de los Estados Unidos de América en Inglaterra. Y en el banquete que dió en su honor la conferencia *Scientia*, en 1900, Carlos Richet, se dirigió a él en estos términos: «Si todos los que habéis salvado estuviesen aquí, lord Lister, no habría local suficiente para contenerlos en esta vasta exposición, ni en este inmenso París.» Y por esto, *The Lancet*, le ha llamado, con razón, «el inglés más grande del siglo XIX».

*
* *

Con esta ocasión de la muerte de Lister, quiero tributar también mi pobre recuerdo a sus precursores, en particular a los españoles. Ya he dicho que, desde tiempos muy remotos, las ideas antisépticas existían en estado rudimentario. Con el progreso de la química se fueron desarrollando, especialmente hacia mediados del siglo XVIII. En las obras de cirugía de aquel tiempo, al tratar de las heridas quirúrgicas, por ejemplo, se habla mucho de los remedios antipútridos, de los balsámicos, de los espirituosos, y se recomienda la limpieza de los trapos, hilas, vendas y heridas, el afeitar el vello, etc.

Más tarde, Koeberlé (de Estrasburgo) y Guérin, habían preconizado una especie de asepsia. Según el Dr. Pulido (*La emoción oratoria*, pág. 9), la practicaban ya de antiguo los Argumosa, Toca y Velasco. Y en Francia, Bataillé recomendaba las curas de alcohol, Lecoeur las de alcoholados compuestos, Declat y Lemaire las de ácido fénico, Demarquay las de glicerina, Boinet las de tintura de yodo, etc., etc. Y en España, el marqués de Guadalergas, cuando era médico militar, curaba con gran éxito «llagas inmensas procedentes de bubones terminados por gangrena, de muchísimos centímetros de la piel del vientre, mandando no tocarlas y lavarlas simplemente con chorros de agua clorurada, cubriéndolas luego con polvos antisépticos y cuidando de evitar el contacto hasta del aire (V. Nieto Serrano, *Vejece*, pág. 146).

Pero el antecesor español más notable de Lister es, quizá, el médico militar D. Pedro Laplana, quien, en diciembre de 1794, escribió un *Ensayo sobre el método nuevo de curar las heridas por armas de fuego*, en el que decía cosas tan sesudas como éstas: «Deben desterrarse del tratamiento de las heridas de armas de fuego las dilataciones, sajas o escarificaciones como inútiles, nocivas y peligrosas, substituyendo un simple tratamiento, como un plan de hilas en la herida, sin interponer cuerpo alguno en sus labios». «El cirujano aquí no debe quasi ser más que un mero observador de esta madre (la naturaleza), que se contenta con poco; y como no debemos perturbarla en sus obras, dexamos en

cierto modo a ella sola la curación de tales heridas, no descubriéndolas sino de tarde en tarde, y satisfaciéndonos con unos fomentos del bálsamo samaritano u otro equivalente, quando se establece la supuración, pues las curaciones raras son seguidas de felices efectos, señaladamente en los hospitales, cuya atmósfera se halla infecta por la corrupción animal». ¿No es todo esto casi el *to be let alone* de Lister?

Esta práctica era la que se seguía en los hospitales de sangre de Cataluña y de Navarra. «De ella, decía Laplana, resultan los felices sucesos que publican tantos hechos y comprueban tantas observaciones». Luego se lamentaba del imperio de la preocupación, el hábito y la rutina sobre la razón, que, «a pesar de la experiencia y de la observación, no puede desengañarse». «No faltarán cirujanos, añadía, que adictos y acostumbrados al que se intenta desterrar... mirarán éste como insuficiente y defectuoso, hasta que la observación, libre y desnuda de toda rutina, les desengañe del error en que viven». Se ve, pues, que Laplana tenía noción clara de la inmensa importancia de su modo de tratamiento de las heridas de bala.

A este trabajo sigue otro, en el que Laplana refiere la historia clínica de un caso de perforación del intestino por bala de fusil, curado por su método, que casi no difiere del que se aconseja hoy para las heridas del abdomen en los campos de batalla: reposo, dieta, calmantes, no dilatar las heridas, etc. Como vemos, Laplana fué, para gloria nuestra, uno de los primeros y más grandas precursores de Lister.

TRABAJOS TRADUCIDOS

Diagnóstico del muermo por la fijación del complemento

POR

JOHN R. MOHLER V. M. D. Y ADOLPH EICHHORND D. V. S.
Jefe de la División de Patología Bacteriólogo

Introducción

El diagnóstico precoz del muermo constituye una de las tareas más importantes y difíciles con que tropieza el Veterinario que se ocupa en trabajos sanitarios. Esto, por supuesto, no es aplicable a los casos clínicos de muermo, puesto que en estos casos el diagnóstico se hace generalmente sin gran dificultad por los síntomas característicos y por las lesiones que se presentan. En los casos, sin embargo, en que no hay signos positivos de la enfermedad, es imposible establecer un diagnóstico por el examen físico, y sólo por medio de algún método especial puede obtenerse la seguridad en el diagnóstico. Los caballos afectados de muermo larvado o latente, en los que no se sospecha la presencia de la enfermedad, son, sin duda, importantes factores en la propagación de la infección. Es un hecho que muchos caballos muermosos no presentan signos positivos de la enfermedad sino en los últimos períodos de ella.

Desde el descubrimiento del bacilo del muermo, en 1883, por Loeffler y Schütz, el diagnóstico del muermo ha sido objeto de numerosas investigaciones, que han dado por resultado un progreso notable en estos problemas. Después de haberse aislado el agente infeccioso de la enfermedad, el diagnóstico se limitaba a la demostración y cultivo del organismo o a la reproducción de la enfermedad por la inoculación de exudados o partes de órganos enfermos de los caballos afectados en animales susceptibles.

El primer paso importante que se dió en el diagnóstico de casos oscuros y latentes de muermo consistió en el descubrimiento de la maleína. Por medio de este producto biológico del *Bacillus mallei* pueden diagnosticarse muchos casos oscuros, particularmente si las experiencias se hacen por Veterinarios inteligentes y experimentados. Existe, sin embargo, un número considerable de animales muermosos, en los que no da la maleína una reacción típica, y, por otra parte, la inyección de la maleína puede producir una reacción en animales no muermosos. La maleína, por consiguiente, no es un agente que puede inspirar confianza absoluta en la determinación del muermo, ni se ha considerado nunca tan eficaz en el diagnóstico de esta enfermedad, como la tuberculina en el diagnóstico de la tuberculosis.

El método de la aglutinación, aplicado al muermo, pareció resolver todas las dificultades. El primero en proponer este procedimiento fué Mc. Fadyean, en 1896; pero no tuvo una aplicación general hasta después de los trabajos de Schütz y Miessner, en 1905. Este procedimiento se ha empleado extensamente en todos los países infectados de muermo, ofreciéndose todas las oportunidades necesarias para llegar a una conclusión con respecto a su valor como signo diagnóstico.

Mientras que no queda duda alguna de que la prueba de la aglutinación es de gran valor en todos los casos de infección reciente, puesto que la sangre, en dichos casos, posee un gran poder aglutinante (1 a 1,000 y aun más); sin embargo, la experiencia ha comprobado que los animales afectados de muermo crónico presentan a veces un valor aglutinante muy bajo que, en algunos casos puede ser aún más bajo que el del suero normal (1 a 400 y aun menos). Resulta de aquí que en algunos casos de muermo crónico sólo puede diagnosticarse la enfermedad por medio de pruebas repetidas, verificándose el diagnóstico solamente por la fluctuación del valor aglutinante, es decir, por su aumento y su disminución, mientras que en los caballos normales el poder aglutinante se mantiene estacionario.

Además de esta dificultad, hay que tener en consideración el hecho de que la sangre de los caballos normales presenta algunas veces un elevado poder aglutinante (1 a 800 y aun más) y que también se han observado alteraciones de la aglutinación en animales libres de muermo. Hay que tener en cuenta, además, que las pruebas repetidas de la aglutinación consumen mucho tiempo, y que, por lo menos, dos semanas tienen que pasar de una prueba a otra. La aglutinación, por consiguiente, no constituye un medio completamente satisfactorio de diagnóstico de muermo. Sin embargo, como que se ha comprobado su gran valor en los principios de la infección muermosa, puede muy bien utilizarse como un auxiliar que puede aplicarse en unión de otros medios.

Hutyra comparó los resultados obtenidos por la aglutinación con los obtenidos por la prueba de la maleína, según se ve en las tablas publicadas por Schütz, Miessner y Nevermann y vino a la conclusión de que la prueba de la aglutinación por sí sola no ha disminuido el número de casos de diagnóstico equivocado. Cree Hutyra que la diferencia principal que se descubre en los resultados es que un gran número de caballos, que se clasificaban antes como sospechosos solamente, siguiendo la prueba de la maleína, se consideran hoy, por medio de la aglutinación, como animales seguramente infectados.

Prosiguiendo en los esfuerzos por encontrar un método por el cual pudiese hacerse un diagnóstico precoz del muermo, varios investigadores dirigieron su atención a la reacción de la precipitina. Esta se funda en el hecho de que cuando el suero de la sangre se pone en contacto con un extracto concentrado de bacilos del muermo, las precipitinas o receptores que se forman en la sangre de animales infectados desde el momento en que empieza la infección, se

fijan a los cuerpos en el extracto bacilar, produciendo una precipitación que se manifiesta por un enturbamiento en el punto de contacto de los dos líquidos. Este método de diagnóstico del muermo ha sido recomendado recientemente por Pfeiler en Alemania y por Kownew en Rusia; pero no ha tenido todavía extensa aplicación en la práctica. Esto se debe probablemente a que resulta en algunos casos difícil la apreciación del anillo que se forma en la línea de contacto entre el precipitante y el suero.

En 1909 Schütz y Schubert publicaron los resultados de sus importantes investigaciones para la aplicación del método de la fijación del complemento en el diagnóstico del muermo. Y como que sus experimentos dieron notables resultados que excedían en mucho los obtenidos por las pruebas de la maleína y de la aglutinación, recomendaron que este método de diagnóstico en combinación con la aglutinación se fijase como la prueba oficial en Alemania. Este método, evitando las desventajas de las pruebas de la maleína y de la aglutinación, constituye, sin duda, el método más seguro para el diagnóstico del muermo. La prueba de la fijación del complemento es, sin duda, el mejor método para determinar las infecciones específicas y se acerca a la perfección lo más que puede esperarse de una prueba biológica. Se ha introducido recientemente en la práctica veterinaria y las publicaciones que a este asunto se refieren se encuentran exclusivamente en publicaciones extranjeras. El principio en que descansa este método se presenta en el fenómeno de la hemólisis, que fué descubierto y estudiado primero por Bordet y Gengou y ampliado por Ehrlich, Morgenroth y Sachs.

Hemolisis

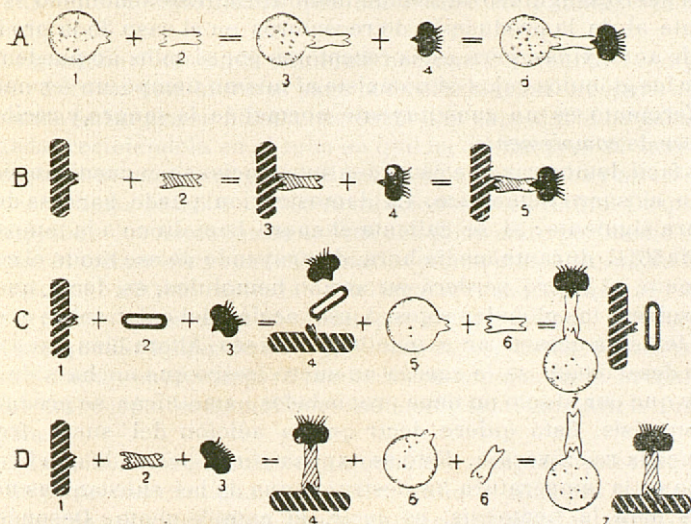
Es un hecho bien conocido que si los glóbulos rojos de la sangre de un animal son introducidos en otro de una especie diferente, la sangre de este último adquiere la facultad de disolver los hematíes del primero si se mezcla con ellos en un tubo de ensayo. A esta reacción llamamos hemólisis, lo que significa la disolución de los glóbulos rojos, dejando libre la hemoglobina en el medio en que están suspendidos los hematíes.

Pondremos un ejemplo de este fenómeno: si inyectamos en un conejo por la vía peritoneal, intravenosa o subcutánea hematíes de un carnero, la sangre del conejo producirá anticuerpos que poseen una acción disolvente sobre los glóbulos rojos del carnero, es decir, la sangre del conejo contendrá hemolisinas específicas.

Esta propiedad hemolítica que adquiere la sangre depende de la presencia de dos sustancias. Una de éstas existe en la sangre de todos los animales y recibe el nombre de *complemento*. Es una sustancia termolábil, es decir, que pierde su actividad si se calienta el suero a la temperatura de 56° C. durante media hora. El otro cuerpo, que se forma por efecto de la inyección de los hematíes es termo-

estabil, es decir, que resiste a temperaturas de 56° C. y aun más altas: este cuerpo recibe los nombres de *cuerpo inmune*, *fixador*, *sensibilizador*, *amboceptor hemolítico*. Se le da el nombre de amboceptor

PLANCH A I



A. — Sistema hemolítico.

B. — Sistema bacteriológico.

C. — Reacción negativa con suero normal de caballo.

D. — Reacción positiva con suero de caballo muermoso.

A. — 1, Glóbulo rojo (carnero). — 2, Amboceptor hemolítico (conejo). — 3, Unión del glóbulo rojo y del amboceptor (no hemólisis). — 4, Complemento (cuerpo 1). — 5, Resultará hemólisis.

B. — 1, Bacteria. — 2, Amboceptor bacteriológico. — 3, Unión de bacteria y amboceptor, (no bacteriolisis). — 4, Complemento. — 5, Resultará bacteriolisis.

C. — 1, Bacteria (antígeno de muermo). — 2, Suero de caballo sin amboceptores de muermo. — 3, Complemento. — 4, No bacteriolisis. — 5, Glóbulo rojo. — 6, Amboceptor hemolítico. — 7, Resultará hemólisis.

D. — 1, Bacteria (antígeno de muermo). — 2, Suero de caballo con amboceptores de muermo. — 3, Complemento. — 4, Bacteriolisis. — 5, Glóbulo rojo. — 6, Amboceptor hemolítico. — 7, No resultará hemólisis.

porque tiene una afinidad doble, por una parte con los hematíes del animal con que ha sido inoculado el otro animal, y, por otra parte con el complemento. Esta última combinación sólo se efectúa después que la otra afinidad que primero mencionamos ha sido satisfecha.

Estas dos substancias, juntamente con los hematíes que han de ser disueltos, comprenden el sistema hemolítico, y la combinación de ellos tiene por resultado la hemólisis. (Véase Pl. I, A.) Esto significa que el líquido opaco, que contiene en suspensión los hematíes, se hace semitransparente por disolución de la hemoglobina «laked». Estrictamente hablando, la hemólisis no representa una

(1) N. de la R. — Con el nombre de *curiel* suele designarse en América y particularmente en Cuba, el conejo de Indias.

solución completa, sino solamente una acción de la hemolisina sobre el estroma de los hematíes, acción que permite el escape de la hemoglobina de los glóbulos rojos.

La inyección de hematíes de un animal en el cuerpo de otro animal de distinta especie, produce el desarrollo de anticuerpos, que le dan al suero sanguíneo la acción hemolítica. Este fenómeno es semejante al de la producción de receptores en el caso de la producción de antitoxinas; pero estos receptores por sí solos no pueden disolver los glóbulos rojos si no existe al mismo tiempo un fermento. Este fermento es un constituyente normal de la sangre y recibe el nombre de *complemento*.

Es fácil demostrar que estas dos sustancias se encuentran siempre en el suero hemolítico. La demostración puede hacerse de la manera siguiente: si se calienta el suero hemolítico a la temperatura de 56° C. durante media hora, destruyendo de ese modo el complemento, el suero perderá su acción hemolítica, es decir, que ya no disolverá los glóbulos rojos. A esta acción del calor sobre el suero se le llama desactivar o inactivar el suero. Ahora bien: si a este suero desactivado se le agrega un suero fresco que no ha sido tratado y que por sí solo no tiene propiedades hemolíticas, se producirá la hemolisis. Esto quiere decir que la adición del suero fresco produce la reactivación. Esto se explica por el hecho de que la elevación de la temperatura ha destruido una de las sustancias necesarias para la hemolisis, es decir, el complemento. Después de destruido el complemento por el calor, puede reemplazarse por la adición de cualquier suero normal, puesto que sabemos que el complemento existe en toda clase de sangre. El suero de la sangre del curiel, sin embargo, parece ser el más satisfactorio en la práctica de las reacciones hemolíticas, por ser muy rico en complemento y necesitarse solamente una muy pequeña cantidad para reactivar un suero desactivado.

Las sustancias necesarias para la hemolisis serán, por consiguiente (1), el amboceptor hemolítico que es el suero de un conejo inyectado previamente con hematíes lavados de carnero (2), el complemento en forma de suero normal de curiel y (3) hematíes lavados de carnero. En la preparación de estas diferentes sustancias es necesario fijar *standards* por medio de procedimientos de antemano cuidadosamente establecidos, como se verá a continuación.

Método para obtener el amboceptor hemolítico

(Suero de conejo)

Se escogen conejos fuertes y vigorosos y se les inyecta por la vía peritoneal solución salina que contiene suspendidos los glóbulos rojos de la sangre del carnero, bien lavados. Se hacen tres inyecciones con intervalos de siete días, de cantidades de 7 cc., de 10 cc. y de 12 cc. de estos hematíes suspendidos en las mismas cantidades respectivamente de solución salina fisiológica. Se entiende, en este

escrito, por solución salina una de cloruro de sodio al 0'85 por 100, si no se especifica otra cosa.

La sangre de carnero se obtiene sangrando por la yugular un carnero vigoroso. Se afeita el lado del cuello y se desinfecta la región yugular con alcohol al 75 por 100. Se introduce después un trocar esterilizado de pequeño calibre en la yugular y se recoge la sangre en una botella esterilizada que contiene unas cuantas bolitas de cristal.

Después de obtenida la cantidad necesaria de sangre se agita el frasco durante diez minutos para la desfibrinación. Después de desfibrinada la sangre se filtra a través de una capa doble de gasa esterilizada, recibiendo en el tubo en que ha de hacerse el lavado. El tubo que contiene la sangre se llena de solución salina y se coloca en una centrífuga de 2,500 a 3,000 revoluciones por minuto. Después de precipitados los hematíes se separa el líquido claro por medio de una pipeta. Mézclase otra vez los hematíes con solución salina en la proporción de 1 a 9 y se repite la centrifugación. Este lavado se repetirá tres o cuatro veces para eliminar por completo todo el suero que pudiera quedar adherido a los glóbulos rojos. Estos hematíes lavados se usarán entonces para inocular los conejos en la preparación de los amboceptores hemolíticos, así como también para la reacción misma.

El lavado de los glóbulos rojos debe ser completo, pues la presencia de pequeñas cantidades de suero, aunque sólo sea en vestigios adherentes a los hematíes, puede causar dificultades para obtener resultados satisfactorios. Si se inyectan conejos con hematíes que contienen pequeñas cantidades de suero, los conejos desarrollarían no sólo los anticuerpos o amboceptores, sino también coagulinas y anticomplementos: la presencia de estas sustancias causaría dificultades en la demostración de la presencia o la ausencia de una hemólisis completa. Además, si en la reacción final se usasen hematíes que contengan trazas de suero, podría producirse una fijación del complemento y los errores consiguientes. Estos errores ocurrirían, especialmente, en los casos en que la acción hemolítica del suero del conejo no fuese muy elevada.

Los hematíes lavados deben usarse para la inyección del conejo en el mismo día que se obtiene la sangre. Para su empleo en las reacciones puede conservarse por dos o tres días en la nevera.

Para la inyección de los conejos se afeita y se lava la parte posterior del abdomen y se desinfecta la piel con alcohol al 75 por 100. Un asistente sujeta al animal con la cabeza inclinada hacia delante para impedir la punción del intestino. Los hematíes que han de inyectarse se mezclan con cantidades iguales de solución salina calentándolos en bañomaria a la temperatura del cuerpo. Algunos investigadores han recomendado las inyecciones intravenosas; pero, en nuestras investigaciones la inyección intraperitoneal nos dió resultados muy satisfactorios, con poco peligro de perder conejos por varias complicaciones.

Después de las tres inyecciones en las cantidades expresadas y

en los intervalos de tiempo que hemos dicho, se toma una pequeña cantidad de sangre del conejo a los cinco o seis días de la última inyección. Se valora entonces esta sangre para determinar si su acción hemolítica es suficiente para las reacciones. Si el suero sanguíneo da una valoración suficientemente alta, puede matarse el animal por la sangría o, lo que es más satisfactorio, pueden extraerse unos 15 cc. de sangre de las venas de la oreja. Por este último método puede usarse el conejo continuadamente para la producción de suero hemolítico. Si se desea obtener todo el líquido sangrando el animal hasta la muerte, se anestesiara primero por una mezcla de cloroformo y de éter, se afeita el pelo del cuello, se desinfecta la piel y se hace una incisión en la región lateral del cuello para abrir a la vez la carótida y la vena yugular. Cuando deje de correr la sangre de este lado, pueden abrirse también el lado opuesto. Se recoge la sangre en tubos de centrifuga, después de completar la sangría se centrifuga la sangre y se separa el suero que sobrenada con una pipeta.

La sangría de las venas de la oreja se practica de la manera siguiente: después de lavarla bien y cortar el pelo sobre las venas del borde exterior, se desinfecta la piel con alcohol al 75 por 100. Se rodea entonces la raíz de la oreja con unas hebras de algodón humedecidas en agua caliente (de 45 a 50° C.) con el objeto de producir una hiperemia de los vasos sanguíneos. Cuando se observa una dilatación suficiente de los vasos se abren las venas auriculares posteriores y medias y se recoge la sangre en tubos de centrifuga. Si deja de correr la sangre se quitará el algodón de la raíz de la oreja para mojarlo de nuevo en agua caliente y reestablecer la hiperemia. En el caso de que la coagulación de la sangre impida su salida en el lugar donde se abrió la vena, se raspará la herida y, generalmente, se obtiene de nuevo la salida del líquido. La sangre que se recoge se trata de la misma manera que antes hemos descrito, es decir, se centrifuga y se separa el suero por pipetas.

Si se emplea este suero hemolítico de conejo en los tres primeros días después de su extracción, debe de inactivarse por el calor a 56° C. durante media hora, antes de usarse. Pasado este tiempo el suero hemolítico de conejo se conserva con la mitad de un uno por ciento de ácido fénico, es decir, que a cada 9 cc. de suero se le agrega 1 cc. de una solución de ácido fénico al 5 por 100. De esta manera puede conservarse el suero por dos o tres meses. Conviene, sin embargo, valorizarlo cada dos o tres semanas, pues, a veces, pierde en parte su acción. El suero hemolítico carbolicado de esta manera no tiene que ser inactivado.

Cuando se prepara suero hemolítico es preferible empezar con varios conejos, puesto que alguno puede morir por efecto de la anafilaxia y otros conejos no se adaptan a la producción de hemolisinas.

El valor hemolítico del suero de un conejo no se mantiene estacionario sino que desciende gradualmente durante dos o tres semanas hasta llegar al valor normal. Sin embargo, si a un conejo en

estas condiciones se le inyectan de nuevo al cabo de algunas semanas los hematíes, lavados, las hemolisinas reaparecen después de corto tiempo. Las hemolisinas se mantienen en reserva en las células de estos animales. La inyección renovada obra como un estimulante y estos cuerpos son lanzados rápidamente a la circulación, mientras que en el animal normal se forman lentamente en las células. De aquí la ventaja de mantener conejos que han sido antes sangrados de las venas de la oreja para la producción repetida de amboceptores hemolíticos.

Valoración del suero hemolítico del conejo

El suero hemolítico se valora con el objeto de establecer cual es la cantidad mínima de suero que producirá la hemólisis en presencia de una cantidad determinada de complementos y de hematíes lavados de carnero. Se denomina unidad de amboceptores a la cantidad de suero hemolítico que produce una hemólisis completa en dos horas a 37° C.

Para el trabajo preliminar de la valoración se toman diez tubos de ensayo y se hacen diluciones del suero hemolítico con solución salina en las proporciones de 1 a 100, a 200, a 400, a 500, etc., hasta 4.000. Para estas diluciones se parte de soluciones fijas al 1 por 100 y al 1 por 1.000, según se ven en la tabla adjunta:

TABLA 1

Valoración del suero de conejo (amboceptor hemolítico)

Tubo	Solución de NaCl (1)	Amboceptor	Complemento (2)	Hematíes (3)	OBSERVACIONES
	cc.	1 cc. de	cc.	cc.	
1	2'5	1: 100	0'5	1	
2	2'5	1: 200	0'5	1	
3	2'5	1: 400	0'5	1	
4	2'5	1: 500	0'5	1	
5	2'5	1: 600	0'5	1	
6	2'5	1: 800	0'5	1	
7	2'5	1: 1.000	0'5	1	
8	2'5	1: 1.500	0'5	1	
9	2'5	1: 2.000	0'5	1	
10	2'5	1: 4.000	0'5	1	
11	3'5	0'5	1	Testigo de complemento, no hay hemólisis
12	3'0	1: 100	1	Testigo de complemento, no hay hemólisis
13	4'0	1	Testigo de complemento, no hay hemólisis

(1) Solución de Na. Cl. al 0'85 %.

(2) 0'5 cc. de una solución del complemento al 10 %.

(3) Suspensión al 5 % de hematíes de carnero lavados en solución salina.

De cada cantidad de suero obtenida del conejo se hacen diluciones en la proporción de 1 a 100, a 200, a 400, etc., hasta 4.000. Por me-

dio de estas diluciones se prepara la tercera columna de la Tabla 1, como se indica a continuación :

Una dilución de 200 se hace añadiendo 1 cc. de la dilución de 1 a 100 a 1 cc. solución NaCl.

Una dilución de 400 se hace añadiendo 1 cc. de la dilución de 1 a 100 a 3 cc. solución NaCl.

Una dilución de 500 se hace añadiendo 1 cc. de la dilución de 1 a 100 a 4 cc. solución NaCl.

Una dilución de 600 se hace añadiendo 1 cc. de la dilución de 1 a 100 a 5 cc. solución NaCl.

Una dilución de 800 se hace añadiendo 1 cc. de la dilución de 1 a 100 a 7 cc. solución NaCl.

Una dilución de 1,000 se hace añadiendo 1 cc. de la dilución de 1 a 100 a 9 cc. solución NaCl.

Una dilución de 1,500 se hace añadiendo 2 cc. de la dilución de 1 a 1,000 a 1 cc. solución NaCl.

Una dilución de 2,000 se hace añadiendo 1 cc. de la dilución de 1 a 1,000 a 1 cc. solución NaCl.

Una dilución de 4,000 se hace añadiendo 1 cc. de la dilución de 1 a 1,000 a 3 cc. solución NaCl.

Se observará que las últimas tres diluciones se preparan con la solución de 1 a 1,000.

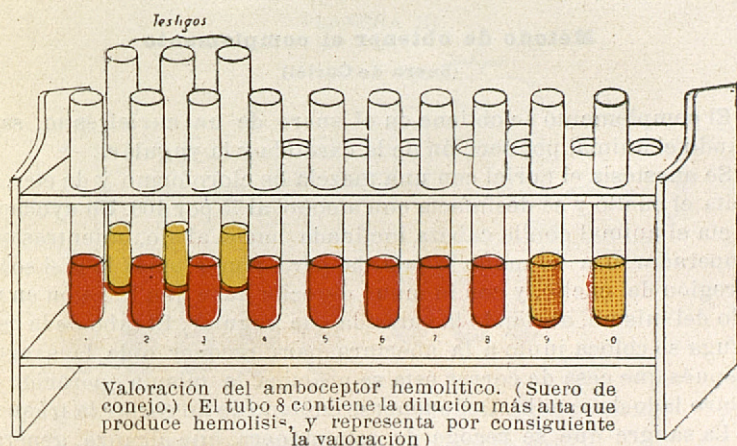
Se procede ahora a la valoración propiamente dicha de la manera siguiente: se llenan diez tubos adicionales cada uno con 2.5 cc. de solución salina, a la cual se añade el suero hemolítico (amboceptor) en la cantidad de 1 cc. de las distintas diluciones para cada tubo. Es decir, que en el primer tubo añadimos 1 cc. de la dilución de 1 a 100; en el segundo tubo, 1 cc. de la dilución de 1 a 200; en el tercer tubo 1 cc. de la dilución de 1 a 400, etc. Después se agrega el complemento en la sangre del curiel en cantidades de 0.5 cc. de una solución al 10 por 100 en cada tubo, agregándose, finalmente, 1 cc. de la suspensión al 5 por 100 de hematíes de carnero en solución salina.

Además de estos diez tubos habrá tres tubos testigos, uno para demostrar que el complemento solo (sin el amboceptor) no produce hemolisis, el segundo para probar que el amboceptor solo, sin el complemento, no produce hemolisis y el tercero para probar que la solución salina sola tampoco produce hemolisis. De modo que en el primer tubo testigo añadimos 3.5 cc. de solución salina, 0.5 cc. de complemento y 1 cc. de la suspensión de hematíes de carnero. En el segundo tubo testigo añadimos 3 cc. de solución salina, 1 cc. de amboceptor en la dilución de 1 a 100 y 1 cc. de la suspensión de hematíes. En el tercer tubo testigo añadimos 4 cc. de solución salina y 1 cc. de hematíes de carnero. Es conveniente colocar los tubos para la valoración en la hilera inferior del estante para tubos de ensayo y los testigos en la hilera superior. Como se verá por las varias cantidades que se introducen en los tubos, el volumen final es siempre de 5 cc. Es decir, que las diferentes cantidades de los derivados de la sangre que se emplean siempre, se completan hasta 5 cc., añadiendo solución salina.

Después de agregar las sustancias mencionadas de la manera que hemos indicado, se agitan los tubos, se colocan en el estante y éste en la incubadora a 37° C. durante dos horas. Se sacan entonces de la incubadora y se anotan los resultados. (Véase la plancha II).

La dilución más elevada que ha producido la hemolisis representa el valor del amboceptor hemolítico. De manera que si la he-

PLANCHA II



molisis completa se ha producido en los tubos en que la dilución del suero fué de 1 a 2,000, el amboceptor hemolítico de ese suero estará representado por 2,000. Este valor, sin embargo, no se emplea en las pruebas del muermo, sino más bien uno de doble valor, que equivale a 1 a 1,000.

La valoración del amboceptor hemolítico que se emplee para el diagnóstico del muermo no debe ser menos de 1 a 1,000, debiendo desecharse el suero de conejo si tiene una valoración menor. Una valoración baja produciría trastornos en el fenómeno, puesto que en diluciones muy bajas habría que añadir demasiado suero, y como el suero contiene otras sustancias además de los amboceptores aquéllas afectarían el fenómeno de la hemolisis.

Es conveniente conservar el amboceptor hemolítico fenicado en pequeños frascos que contengan de 1 a 2 cc. del suero de conejo, cerrándolos con parafina. De esta manera se agota más rápidamente el contenido de un frasco sin exponerlo con frecuencia al aire.

La prueba de la valoración del amboceptor hemolítico aparece ordenadamente en la Tabla n.º 1, y el método y práctica de las pruebas con respecto a la adición de las diversas sustancias también aparecen en su debido orden en todas las tablas. Se indica, por ejemplo, el número de tubos de ensayo que se usan, así como las varias sustancias y las cantidades de ellas que hay que añadir, todo

en su debido orden. Creemos que por este método puede seguirse la descripción sin gran dificultad, y manteniendo a la vista estas tablas, pueden practicarse las diversas pruebas aun por aquellos que tienen poca experiencia en esta clase de trabajo. Naturalmente que la exactitud y la minuciosidad en la técnica son los factores más importantes para el éxito en estos trabajos de suero diagnóstico. No es posible exagerar demasiado la importancia de este hecho.

Método de obtener el complemento

(Suero de Curiel)

El complemento se obtiene en el suero de un curiel sano, sangrando el animal por sección de la carótida y la yugular.

Se anestesia el curiel con una mezcla de cloroformo y de éter, se afeita el cuello y se desinfecta con alcohol al 75 por 100. Un ayudante sujeta el animal con la cabeza inclinada hacia abajo, mientras que el operador usa su mano izquierda para poner tensa la piel sobre la región del cuello, y con la mano derecha hace una incisión en un lado del mismo, abriendo la carótida y la yugular. El tubo de la centrífuga se coloca junto a la abertura para recoger toda la sangre. Después que cesa de correr ésta se practica la misma operación en el otro lado del cuello. Debe tenerse cuidado de no cortar la tráquea.

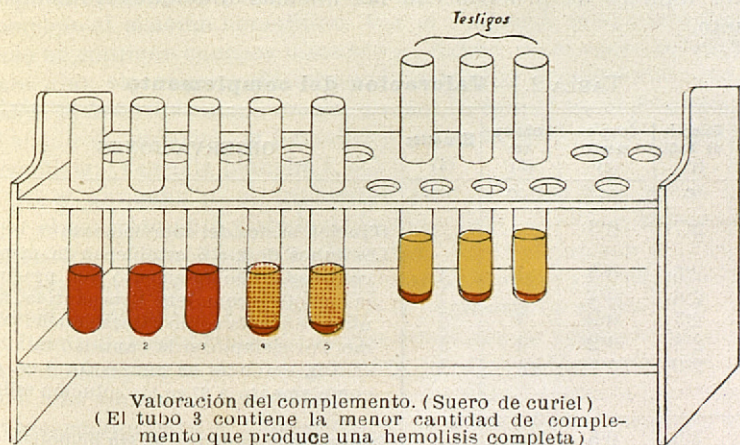
La sangre que se recoge de esta manera, que alcanza, generalmente, a 10 ó 12 cc., se coloca en el refrigerador, y al cabo de una o dos horas el suero se separa del coágulo. Se extrae el suero por medio de una pipeta y se centrifuga lo que queda, para poder obtener la cantidad total de suero que se encuentra en el coágulo. El suero de curiel debe usarse siempre fresco y nunca debe de usarse después del segundo día, puesto que el complemento se reduce considerablemente.

Valoración del complemento

Conviene valorar exactamente el complemento en cada curiel, puesto que esta práctica asegura resultados mejores en las pruebas del muermo. Por la valoración del complemento nos proponemos establecer la unidad de complementos, que es la cantidad menor de complemento necesaria para producir la hemólisis completa en presencia de una unidad de amboceptor y los hematíes del carnero suspendidos en el líquido. Esta cantidad mínima se toma entonces como valoración del complemento. En la práctica de esta valoración se emplean seis tubos además de los tres como testigos. En el primer tubo se hace la dilución primitiva del complemento al 10 por 100; es decir, que 0.3 cc. del complemento se agregan a 2.7 de solución salina. En el segundo tubo añadimos 2.5 cc. En el tercero 2.6 cc., etc., de solución salina. Después que se ha agregado el complemento en las cantidades mencionadas, se añade el amboceptor. Se agrega 1 cc. del amboceptor hemolítico, cuya valoración ha sido antes estimada y,

finalmente, 1 cc. de una emulsión de hematíes al 5 por 100. El objeto de los testigos es establecer, en el primero, que el complemento solo, sin el amboceptor, no produce hemólisis; en el segundo, que el amboceptor, solo sin el complemento, no produce hemólisis; y en el tercero, que la solución salina por sí sola no produce hemólisis. El primer tubo testigo contiene 3'5 cc. de solución salina, 0'5 cc. de la dilución primitiva al 10 por 100 y 1 cc. de hematíes en suspensión;

PLANCH A III



Valoración del complemento. (Suero de curiel)
(El tubo 3 contiene la menor cantidad de complemento que produce una hemólisis completa)

el segundo tubo testigo contiene 3 cc. de solución salina, 1 cc. de la dilución del amboceptor y 1 cc. de los hematíes en suspensión; en el tercer tubo testigo se encuentran 4 cc. de solución salina y 1 cc. de hematíes en suspensión.

Después de agitar todos los tubos se coloca el estante en la incubadora por dos horas y se saca para leer los resultados. (Véase la placha III.) La dilución más alta del complemento en el tubo en que la hemólisis es completa indica la valoración del complemento. Por ejemplo, si la hemólisis es completa en el tubo en que 0'3 cc. de la solución fundamental al 10 por 100 se han empleado, y la hemólisis es incompleta en el tubo en que se emplearon 0'2 cc. de la solución fundamental al 10 por 100, entonces la valoración del complemento será 0'03 cc., puesto que hemos empezado con una solución fundamental al 10 por 100. De manera que en las pruebas en este caso sería necesario usar una solución de complemento al 3 por 100.

En la tabla 2 la valoración del complemento se presenta como en la Tabla 1 para el amboceptor hemolítico y puede seguirse fácilmente. Es preciso, sin embargo, usar exactamente las cantidades que se expresan en la tabla.

Cuando se usa el amboceptor en estado fresco debe desactivarse; es decir, cuando se emplea antes de los tres días. En los demás casos se carboliza con 10 por 100 de una solución de ácido fénico al

5 por 100, y se conserva en la refrigeradora; en este caso se usa sin desactivarlo.

Colóquese el estante de tubos en la incubadora por dos horas y léase los resultados.

Esta prueba debe practicarse como preliminar a todo ensayo que quiera hacerse con suero sospechoso de muermo, puesto que siempre es necesario determinar cuál es la cantidad menor de complemento que ha de usarse en la prueba final. Por supuesto que dentro del mismo período de veinticuatro horas puede practicarse cualquier número de pruebas con las mismas diluciones de complemento.

TABLA 2. — Valoración del complemento

Tubo	Solución de NaCl (1)	Complemento (2)	Amboceptor (3)	Hematías (4)	OBSERVACIONES
	cc.	cc.	cc.	cc.	
1	2·7	0·3	Dilución básica del complemento
2	2·5	(5) 0·5	1	1	Los tubos de 2 a 6 establecen la menor cantidad de complemento que produce la hemólisis completa. Esta cantidad mínima se acepta como valoración del mismo. Por ejemplo, si la cantidad mínima es 0.03, entonces se agregarán 3 cc. de complemento a 97 cc. de solución salina
3	2·6	0·4	1	1	
4	2·7	0·3	1	1	
5	2·8	0·2	1	1	
6	2·9	0·1	1	1	
7	3·5	0·5	1	Testigo de complemento, sin hemólisis
8	3·0	1	1	Testigo de amboceptor, sin hemólisis
9	4·0	1	Testigo de solución salina, sin hemólisis

(1) Solución salina al 0.85 %.

(2) Suero de curiel en cantidades decrecientes.

(3) Suero hemolítico previamente avalorado, el doble de la cantidad de la dilución.

(4) Suspensión de glóbulos rojos de carnero al 5 % en solución salina.

(5) Esta cantidad se toma de la dilución básica en el tubo número 1.

Fijación del complemento específico

(Desviación)

La fijación del complemento es una reacción biológica, en la que el fenómeno de hemólisis se emplea como principio fundamental.

Se le da este nombre por el hecho de que el complemento ha sido fijado por la combinación del antígeno con el anticuerpo, impidiéndosele de esta manera que participe en el proceso hemolítico en el cual es necesaria su presencia para producir la hemólisis. Por este procedimiento puede demostrarse la presencia de muy pequeñas cantidades de amboceptores (anticuerpos) en un suero.

La presencia de un elemento infeccioso en el organismo de un animal o de un hombre ejerce una acción estimulante sobre la producción de anticuerpos (*immun körper*). Si un suero que contiene « estos cuerpos inmunes » se inactiva y se pone en contacto con el antígeno en presencia del complemento, éste, el complemento, se

fijará firmemente por la acción del cuerpo inmune y el antígeno combinados. (Véase plancha I, B.) De esta manera ocurre una atracción entre el antígeno y el anticuerpo que produce la fijación del complemento. Esta atracción se establece completamente cuando se coloca la mezcla en una incubadora durante el espacio de una hora. La adición del amboceptor hemolítico y de los hematíes al cuerpo inmune y al antígeno anclados o combinados de este modo resulta sin efecto. (Véase la plancha I, D.)

La hemólisis, por consiguiente, no se efectuará; porque el complemento ha sido fijado por el cuerpo inmune y el antígeno, dejando incompleto el sistema hemolítico. Por el contrario, si el suero inactivado no contiene cuerpos inmunes no habría en el suero substancia para fijar el antígeno. El resultado será, por consiguiente, que no habrá fijación del complemento, quedando éste libre, de manera que al añadir el amboceptor hemolítico y los hematíes, se efectuará la hemólisis. (Véase la plancha I, D.)

Ni el antígeno ni el anticuerpo pueden, cada uno por sí solo, fijar el complemento y producir la hemólisis cuando se agreguen el amboceptor hemolítico y los hematíes. En combinación los dos, sin embargo, la fijación se produce invariablemente y al añadir el amboceptor hemolítico y los hematíes la hemólisis no se produce.

Desde el descubrimiento de este fenómeno se viene utilizando extensamente para el suerodiagnóstico; pero probablemente donde han sido más señalados sus servicios es en relación con la reacción de Wassermann para el diagnóstico de la sífilis. Se ha empleado también en otras enfermedades más o menos satisfactoriamente y está muy lejos de haberse agotado sus aplicaciones para el diagnóstico práctico y la determinación de cuerpos inmunes en el suero. En la práctica veterinaria la fijación del complemento va introduciéndose gradualmente en los procedimientos para el diagnóstico del muermo. Este método de diagnosticar el muermo ha dado los mejores resultados en Alemania y constituye, en el momento actual, la prueba reglamentaria que se emplea en Prusia y en otras partes de Alemania. También se ha empleado en el diagnóstico de otras enfermedades de animales, pero no con el éxito que en el muermo. Particularmente con relación a la tuberculosis los resultados fueron poco uniformes y prometen poco para la aplicación práctica.

La presencia de los cuerpos inmunes específicos (amboceptores bacteriolíticos) en el suero del caballo muermoso ocasiona la fijación del complemento cuando el antígeno, en la forma de extracto de bacilos del muermo, es añadido al sistema hemolítico. El suero de caballos muermosos, por consiguiente, contiene anticuerpos (cuerpos inmunes) contra el bacilo del muermo, anticuerpos que son específicos para el bacilo del muermo solamente y no para otra infección alguna. La fijación del complemento, por consiguiente, representa una prueba específica, puesto que sólo en presencia de los cuerpos inmunes del muermo y del antígeno muermoso puede producirse la reacción. Si en lugar de los cuerpos inmunes del muermo se encuentran los anticuerpos de otras enfermedades infecciosas en el

suero, no producirán efecto alguno sobre el antígeno muermoso; y, por otra parte, si un suero que contiene anticuerpos del muermo se pone en contacto con el antígeno de alguna otra enfermedad infecciosa, el mencionado suero tampoco producirá efecto alguno en la reacción. Por esta fijación del complemento el sistema hemolítico queda incompleto, dando por resultado que la hemólisis no se produce. Esta fijación del complemento por el antígeno y amboceptor del muermo en el suero del caballo constituye el signo diagnóstico para esta enfermedad.

En la aplicación de la prueba es necesario tener las sustancias que constituyen el sistema hemolítico, que son: los hematíes lavados del carnero, el amboceptor hemolítico (suero de conejo) y el complemento (suero normal de curiel). La cantidad de amboceptor hemolítico que debe usarse se ha establecido previamente por valoración, según hemos descrito en otra parte de este trabajo. En la prueba del muermo se usa el amboceptor hemolítico de doble intensidad a la establecida por la valoración. Un pequeño exceso en la cantidad del amboceptor no altera el resultado de las pruebas.

Por el contrario, la determinación de la cantidad mínima del complemento que es capaz de producir la hemólisis en presencia del amboceptor hemolítico y los hematíes, es muy esencial, y, por consiguiente, es preciso fijar dicho *minimum* por medio de la prueba preliminar previamente descrita antes de practicar las pruebas para el muermo.

Si se omite este paso, puede resultar que se emplee una cantidad excesiva de complemento, lo que, en algunos casos, pudiera afectar el resultado final de la reacción. Un exceso de complemento puede, no sólo ser suficiente para la fijación por los anticuerpos y el antígeno, sino que podría también quedar cantidad suficiente de complemento para producir una hemólisis incompleta y hasta casi completa. Es evidente, por consiguiente, la importancia de fijar por medio de la prueba preliminar (Véase la tabla 2) la cantidad exacta de complemento que debe emplearse. Schütz y Schubert demostraron que el éxito de este método para el diagnóstico del muermo estriba en gran parte sobre el empleo de la cantidad precisa de complemento. Importa, por consiguiente, que no se omita nunca la determinación previa de esta cantidad.

Los hematíes del sistema hemolíticos siempre constituyen una cantidad uniforme, es decir, una suspensión al 5 por 100 de los hematíes lavados en solución salina. Como antes hemos dicho, este líquido en que se encuentran en suspensión los hematíes, puede conservarse hasta dos y tres días en el refrigerador. La manera de obtener los hematíes ha sido descrita en la primera parte de este trabajo.

En la reacción de la fijación del complemento se emplean, además del sistema hemolítico, el suero del caballo que se examina y el antígeno.

Método de obtener el suero del animal que se examina

Se obtiene la sangre de la vena yugular del caballo sospechoso después de atusar y desinfectar con alcohol una pequeña área sobre la vena. Se produce la dilatación de ésta comprimiendo la parte inferior del cuello y se obtiene la sangre por la inserción de un trocar con su cánula. Se recomienda que se recoja la sangre en tubos o pomos de tamaño uniforme que deben ser desinfectados antes de usarse. Se considera como cantidad suficiente para las reacciones de 50 a 100 cc. de sangre. Esta se coloca en un tubo en lugar fresco y obscuro donde se separa el suero del coágulo y queda lista para usarse en las pruebas. Si se desea enviar la sangre a un Laboratorio pueden empaquetarse los tubos por separado o juntos en una caja. Cada tubo llevará su rótulo, y el número del caballo que corresponde con el número del tubo, debe aparecer también en el rótulo. No es de absoluta necesidad que el suero esté claro, puesto que, en repetidas pruebas practicadas en este Laboratorio, ha resultado que sangre enviada desde Michigan a Washington, daba resultados satisfactorios aunque el suero estaba alterado en su color por desintegración de los glóbulos rojos. Si se desea conservar el suero, o si por alguna causa no puede practicarse la prueba durante los primeros días después de la extracción de la sangre, se conservará ésta con una solución de ácido fénico al 0.5 por 100. La mejor manera de obtener este tanto por ciento, es añadir una parte de una solución de ácido fénico al 5 por 100, a nueve partes del suero que se quiere conservar. Este suero fenicado da las reacciones después de algunos meses.

Se toman 2 cc. del suero que se quiere examinar y se colocan en un tubo apropiado o pomo, para someterlo, durante media hora, a una temperatura de 58° C. Por este procedimiento se obtiene la inactivación del suero; es decir, que se destruye por el calor el complemento que se encuentra en el suero. Este suero inactivado está listo para las pruebas, pero debe usarse solamente en el mismo día de la inactivación. Si se hace necesario repetir la prueba; será preciso extraer de la muestra otra cantidad de 2 cc. para la inactivación.

En los casos en que se haya hecho prueba de la maleína, no se tomará la sangre para la prueba de la fijación del complemento, sino de siete a diez días después de la última prueba de la maleína.

Preparación del antígeno

(Extracto de bacilos del Muermo)

El antígeno representa un extracto de bacilos del muermo obtenido por agitación en solución salina. Se prepara de la manera siguiente: de un cultivo madre de bacilos de muermo se preparan subcultivos en medio de agar glicerinado ácido al 2 por 100. Debe preferirse el uso de frascos de Kolle en vez de tubos de cultivo, por-

que en estos frascos la superficie del medio es mucho mayor y puede obtenerse una cantidad mayor de bacilos. Después de inocular el medio con el bacilo del muermo se colocan los frascos en la incubadora y, al cabo de veinticuatro horas, se hace que el agua de condensación de los cultivos se extienda sobre la superficie del medio. Después de veinticuatro o cuarenta y ocho horas en la incubadora, la superficie del medio presenta, generalmente, una propagación abundante del bacilo, y está lista para el lavado. A cada frasco se le agregan de 20 a 40 cc. de solución salina. Si el cultivo se ha hecho en los tubos de ensayo ordinario, se lavarán con 5 a 15 cc. de la solución salina.

Después de arrastrar de la superficie del medio, por el lavado, el brote abundante de bacilos, se echa el líquido en frascos esterilizados y se calienta a 60° C., durante cuatro horas, para destruir los bacilos del muermo. Después de someterlos al calor se colocan los frascos en aparatos especiales para agitarlos, y se agitan durante cuatro días.

Colócase después el extracto en tubos de centrifugadora y se somete a la centrifugación con velocidades de 2,500 a 3,000 revoluciones por minuto. Se separa el líquido claro que sobrenada y se coloca en pomos apropiados, agregándosele 10 por 100 de una solución de ácido fénico al 5 por 100 y se tapan los pomos. Esto representa el extracto de antígeno que ha de usarse para las pruebas en una dilución establecida por la valoración. Este extracto se conserva durante dos o tres meses, y aun más, si se mantiene en un lugar fresco y obscuro.

Valoración del extracto

La valoración del extracto tiene por objeto determinar la cantidad de extracto que no impide la hemólisis. Se preparan primeros diluciones del extracto en solución salina, en proporciones de 1 a 20, 30, 40, 50, y así, sucesivamente, hasta 200. Estas diluciones se hacen partiendo de una dilución básica de 1 a 10, según puede verse en la Tabla 3. La valoración se hace de la manera siguiente: se emplean nueve tubos para la valoración y tres como testigos. A cada tubo se le agrega 1 cc. de la solución salina y después 1 cc. de complemento de la cantidad mínima establecida, según la prueba preliminar (Véase la Tabla 2). Después se agrega el extracto, recibiendo cada tubo 1 cc. de las distintas diluciones preparadas.

Es decir, en el primer tubo se agrega 1 cc. de la dilución de 1 a 10; en el segundo tubo, 1 cc. de la dilución de 1 a 20; en el tercero, 1 cc. de la dilución de 1 a 30, y, así, sucesivamente. Colócase, entonces, el estante con los tubos en la incubadora durante una hora. Después de sacarlos, se agrega a cada tubo 1 cc. de una cantidad doble del amboceptor previamente valorado, y, finalmente, 1 cc. de la emulsión de hematies del carnero al 5 por 100. De los tres tubos testigos, el primero sirve para probar que el complemento solo (sin el amboceptor) no produce hemólisis; el segundo, para probar que

el amboceptor solo no produce hemolisis, y, el tercero, para probar que la solución salina, por sí sola, no produce hemolisis. En el primer tubo testigo, por consiguiente, se mezclan 3 cc. de solución salina, 1 cc. de complemento y 1 cc. de glóbulos rojos. El segundo tubo, contiene 3 cc. de solución salina, 1 cc. de amboceptor y 1 cc. de glóbulos rojos, mientras que el tercer tubo contiene 4 cc. de solución salina y 1 cc. de glóbulos rojos. Esta valoración es semejante a la del amboceptor hemolítico.

Después de agitar los tubos, como debe hacerse siempre después de preparadas las mezclas, se coloca el estante de tubos en la incubadora por dos horas. Después se verifican los resultados. El tubo en que deja de presentarse la hemolisis representa la valoración del extracto. (Véase la plancha IV). En las experiencias con el muermo, sin embargo, debe usarse la mitad de esa cantidad. Por ejemplo, si la valoración indica que el primer tubo que no impide la hemolisis contiene una dilución de 1 a 50, se usará una dilución de 1 a 100 del extracto para las experiencias del muermo.

En la Tabla 3, la valoración del extracto de bacilos del muermo aparece en orden consecutivo, y podrá seguirse de la misma manera que con las otras tablas. En esta tabla, las substancias que han de emplearse se presentan, consecutivamente, indicándose, al mismo tiempo, las cantidades exactas.

TABLA 3. — Valoración del extracto de bacilos de muermo

Tubo	Solución NaCl (1)	Complemento (2)	Extracto (3)	Amboceptor (4)	Hematías (5)	OBSERVACIONES
	cc.	cc.	1 cc. de	cc.	cc.	
1	1	1	1 : 10	1	1	Una mitad de la cantidad de extracto que no impide la hemolisis, es el valor que debe usarse en las pruebas finales. Si por esta prueba resulta ser la dilución de 1 a 50 se usará 1 a 100 del extracto para la experiencia final
2	1	1	1 : 20	1	1	
3	1	1	1 : 30	1	1	
4	1	1	1 : 40	1	1	
5	1	1	1 : 50	1	1	
6	1	1	1 : 60	1	1	
7	1	1	1 : 80	1	1	
8	1	1	1 : 100	1	1	
9	1	1	1 : 200	1	1	
10	3	1	1	Testigo de complemento, sin hemolisis
11	3	1	1	Testigo de amboceptor, sin hemolisis
12	4	1	Testigo de solución salina, sin hemolisis

(1) Solución de NaCl al 0.85 %.

(2) La cantidad mínima establecida en la prueba preliminar.

(3) La dilución básica se prepara del extracto en proporciones de 1 a 10, 20, 30, etc., hasta 200. De estas diluciones básicas se prepara la tercera columna como se indica más abajo.

(4) El doble de la cantidad previamente valorada.

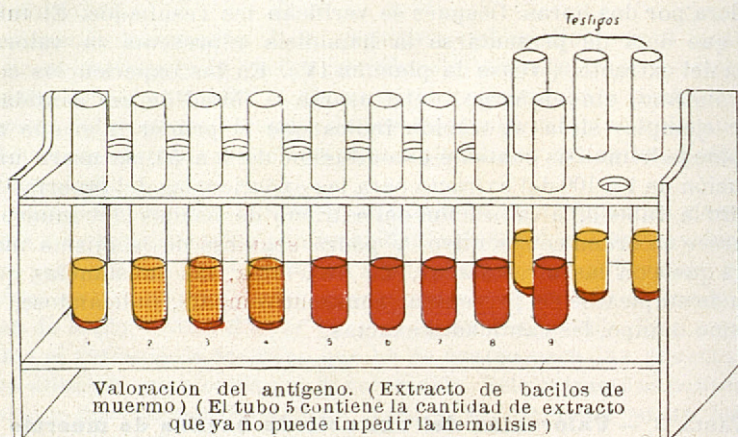
(5) Hematías lavados con solución salina en suspensión al 5 %.

Las diluciones básicas del extracto de bacilos de muermo se hace de la manera siguiente:

Para la dilución de

1	a	20	se añade 1 cc. de dilución de 1 a 10,	a 1 cc. de solución salina
1	»	30	» » 1 » » » » 1 » 10, » 2 » » » »	
1	»	40	» » 1 » » » » » 1 » 10, » 3 » » » »	
1	»	50	» » 1 » » » » » 1 » 10, » 4 » » » »	
1	»	60	» » 1 » » » » » 1 » 10, » 5 » » » »	
1	»	80	» » 1 » » » » » 1 » 10, » 7 » » » »	
1	»	100	» » 1 » » » » » 1 » 10, » 9 » » » »	
1	»	200	» » 1 » » » » » 1 » 100, » 1 » » » »	

PLANCHA IV



Fijación del complemento

Como hemos dicho antes, el suero del caballo muermoso contiene anticuerpos que se desarrollan durante el curso de la enfermedad. La presencia de dichas sustancias en el suero se utiliza para la verificación de la prueba. Naturalmente, la cantidad de estos anticuerpos varía en cada animal infectado y depende, sin duda, de la extensión de la infección. Es, por consiguiente, de aconsejarse, que se emplee en la prueba la cantidad de suero que sea suficiente para que se produzca la reacción.

La cantidad necesaria para la reacción se ha fijado, por los laboriosos experimentos de Shütz y Schubert, en 0'2 y 0'1 cc., colocados en dos tubos distintos. En algunos casos, el tubo que contiene 0'2 cc. del suero puede producir la fijación del complemento, mientras que el tubo que contiene 0'1 cc. del mismo suero puede producir sólo una fijación parcial. En la mayoría de los casos, sin embargo, la fijación se manifiesta en ambos tubos.

Las substancias que se emplean en la prueba de la fijación, han sido descritas detalladamente; se ha establecido su grado de concentración por la valoración de estas diversas substancias, y sólo debemos mencionar, de paso, que los mejores resultados se obtendrán cuando se empleen las cantidades más pequeñas permitidas

por la valoración; es decir, que las sustancias deben tener una alta valoración. Si, por ejemplo, el extracto del muermo tiene una valoración baja, las albúminas que contiene pueden influenciar el resultado de la prueba, puesto que es sabido que las albúminas de extractos celulares, si están presentes en grandes cantidades, pueden producir la fijación de los complementos. Es, por consiguiente, de aconsejarse que se usen extractos muermosos de alta valoración; la cantidad que se emplee no debe exceder en mucho la cifra de 0.01 cc.

Además de la centrífuga y el aparato de agitar, sólo se necesitan diversas piezas de cristal, a saber: pipetas de varios tamaños, de las que habrá siempre un número suficiente, a mano, durante las experiencias. Son preferibles las pipetas de 1 cc., graduadas en centésimos, y pipetas de 10 cc., graduadas en décimos. Se necesitarán, también, varias pipetas de diversos tamaños, para medir las sustancias que han de ser diluidas. Se recomienda el empleo de tubos de ensayo de un tamaño uniforme que correspondan con el portatubos. Toda la cristalería debe limpiarse, cuidadosamente, y esterilizarse al calor seco antes de usarse. No debe emprenderse mayor número de pruebas que las que pueden, convenientemente, manipularse en un sólo día. Finalmente, la incubadora debe tener espacio suficiente para contener el número necesario de portatubos. Con una incubadora de buen tamaño y los aparatos antes mencionados, cualquier Laboratorio Bacteriológico del Estado, puede atender al diagnóstico de los casos que envíen los Veterinarios de su distrito, puesto que de 80 a 100 reacciones pueden hacerse perfectamente por este método en un día.

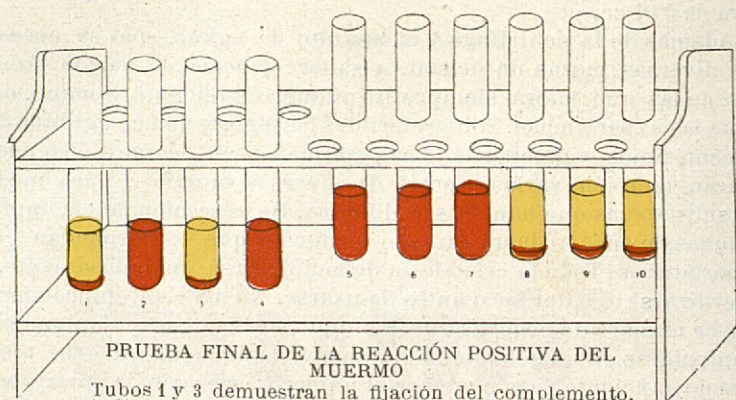
Práctica de la reacción

Antes de empezarse las reacciones es de recomendarse que se tengan preparadas las diluciones que se emplearán en las mismas. Las cantidades de las diluciones pueden determinarse con suficiente precisión según el número de reacciones que han de hacerse. De esta manera se prepararán las cantidades necesarias de la emulsión de glóbulos rojos, de amboceptor, complemento y extracto muermoso. La preparación de estas diluciones se efectuará en balones de Erlenmeyer, y las diluciones de este modo preparadas no deben conservarse más de un día.

Se emplean cuatro tubos de ensayo para la reacción del suero de cada caballo. Es conveniente para la observación de los resultados que se coloquen los tubos en un portatubos. El primer tubo se señala con el número del animal para su identificación. Así, por ejemplo, si es necesario examinar veinte caballos se necesitarán 80 tubos para las pruebas. El primero y el tercer tubos son para la reacción propiamente dicha, mientras que el segundo y el cuarto tubos sirven como de testigos del suero equino que ha de examinarse. Todos los tubos se llenan desde luego con la cantidad necesaria de solución salina, que, con las otras sustancias que se emplean, completa la

cantidad de 5 cc. que se requiere. Así, el primero y tercer tubos contienen cada uno 1 cc. de solución salina, mientras que el segundo y el cuarto contienen cada uno 2 cc. Después se añade el suero del caballo sospechoso que se está examinando, y que ha sido previamente inactivo, calentándolo durante media hora a 58° C. En el pri-

PLANCHA V



PRUEBA FINAL DE LA REACCIÓN POSITIVA DEL MUERMO
 Tubos 1 y 3 demuestran la fijación del complemento, indicando muermo. — Tubos 2 y 4 testigos del suero sospechoso. — Tubos 5 y 6 testigos del antígeno. — Tubo 7, testigo del sistema hemolítico. — Tubo 8, testigo del complemento. — Tubo 9, testigo del amboceptor hemolítico. — Tubo 10, testigo de la solución salina

mero y el segundo tubos se añade 0.01 cc. y en el tercero y cuarto tubos 0.02 cc. de este suero inactivado. Después se agrega el extracto del bacilo del muermo, el cual se introduce solamente en el primero y tercer tubos, empleándose 1 cc. de la dilución establecida. El segundo y el cuarto tubos, por consiguiente, no contienen el extracto del bacilo del muermo, puesto que estos tubos sirven solamente de testigos para demostrar que el suero equino por sí sólo no influye en la hemolisis. De este modo en cada una de las pruebas la cantidad de suero empleada en la reacción (primero y tercer tubos) lleva por testigo una cantidad igual de suero (segundo y cuarto tubos).

Después de añadir el antígeno (extracto muermoso) se añade a cada tubo 1 cc. del complemento en la dilución que se ha establecido antes por las pruebas preliminares. (Véase la Tabla 2.)

En este momento de la reacción cada tubo contiene 3 cc. de líquido. El portatubos con sus tubos correspondientes se agita y se coloca en la incubadora durante una hora. El objeto de esta incubación es obtener la unión del antígeno y el amboceptor, a la cual se fija firmemente el complemento. Naturalmente, la fijación sólo puede obtenerse si el suero contiene el amboceptor del muermo; es decir, cuando el caballo está infectado de muermo. (Véase la Plancha I, D). Por otra parte en la ausencia de una infección muermosa el suero no contiene amboceptores y, por consiguiente, tanto el antígeno

como el complemento permanecen libres en los tubos. (Véase la Plancha I, C.)

Después de pasado el tiempo necesario para la incubación se retira el portatubos y se añaden las otras sustancias del sistema hemolítico, a saber: el amboceptor hemolítico y los hematíes en suspensión.

A cada tubo se añade 1 cc. del suero de conejo previamente valorado (Amboceptor hemolítico), y, finalmente, 1 cc. de hematíes de carnero en suspensión al 5 por 100, los cuales han sido previamente lavados con solución salina. Agítanse después los tubos individualmente o colectivamente en el portatubos con el objeto de mezclar los líquidos perfectamente y desprender partículas de las soluciones que pudiesen haber quedado adheridas a las paredes de los tubos.

Esto termina de hecho la prueba, y sólo falta incubar los tubos durante diez horas, al cabo de las cuales se podrán anotar los resultados.

Testigos

Durante la práctica de todas las reacciones se emplean al mismo tiempo tubos testigos para hacer comparaciones. Se necesitan cuatro tubos como testigos del sistema hemolítico y dos como testigos del extracto muermoso. El testigo del sistema hemolítico se establece usando en el primer tubo todas las sustancias que constituyen el sistema hemolítico, a saber: el amboceptor hemolítico, el complemento y los hematíes en suspensión. Este tubo, después de concluida la reacción debe presentar una hemólisis completa. En el segundo tubo se prueba el amboceptor hemolítico sin el complemento, para demostrar que no produce hemólisis. El tercer tubo sirve como testigo del complemento sin el sistema hemolítico, para comprobar también que no produce hemólisis. El cuarto tubo sirve para demostrar que la solución salina no tiene acción hemolítica sobre los hematíes. Las cantidades de las diferentes sustancias que se usan en los testigos son las mismas que se emplean en la reacción propiamente dicha. Es necesario en los tubos testigos, así como en todos los demás completar la cantidad hasta 5 cc. con solución salina. Resulta, pues, que en el tubo que sirve de testigo del sistema hemolítico se añaden 2 cc. de solución salina, mientras que en el testigo del amboceptor hemolítico, así como en el testigo del complemento se añaden 3 cc., y en el testigo de la solución salina, 4 cc. Agréganse las sustancias a los tubos testigos en el mismo orden que se expresa, y se produce la incubación también al mismo tiempo.

Como se ha dicho antes, se usan 2 tubos como testigos del antígeno (extracto de bacilos del muermo), además de los 4 que se emplean como testigos del sistema hemolítico. Aquellos dos tubos contienen el sistema hemolítico, y al primero de ellos se agrega 1 cc. del extracto usado en la reacción del muermo, mientras que al segundo tubo se agregan 2 cc. del extracto. Los testigos del extracto sirven para probar que el extracto usado en las reacciones no oca-

siona la fijación del complemento, y que aun usando una cantidad del extracto el doble de la que se ha usado en la reacción del muermo, no se obtiene la fijación del complemento. En los testigos del extracto tenemos, en el primero, 1 cc. de solución salina, mientras que en el segundo tubo no se añade solución salina alguna, porque las sustancias en este testigo bastan por sí solas para sumar la cantidad de 5 cc. En el primer tubo, además del 1 cc. de solución salina, se añade 1 cc. del extracto, al que se siguen en su orden las sustancias del sistema hemolítico en cantidades y diluciones iguales a las que se usaron en la reacción propiamente dicha, y que ya antes se indicaron.

Los resultados en los tubos testigos después de la conclusión de las pruebas, deberán ser los siguientes:

Todos los tubos testigos que contienen, además del sistema hemolítico, sólo el suero del caballo sospechoso, es decir, el segundo y el cuarto tubos, deberán presentar una hemolisis completa o casi completa. No debe aparecer depósito alguno de hematíes en el fondo de estos tubos, o, por lo menos, una cantidad muy pequeña. El líquido deberá tener el característico color rojo de vino.

En los tubos testigos del extracto debe haber también una hemolisis completa o casi completa. Lo mismo debe suceder en los testigos del sistema hemolítico; éste debe presentar una hemolisis completa. En los tubos testigos del complemento, el amboceptor hemolítico y la solución salina, no debe producirse hemolisis alguna; es decir, que los hematíes deben sedimentarse al fondo de los tubos, sobrenadando un líquido claro como el agua.

En la Tabla 4.ª, la prueba final para el muermo se presenta en el orden que debe seguirse. Se indica el número de tubos que debe emplearse, así como el número de testigos. Las sustancias y sus cantidades, así como las diluciones, se indican también en la columna de Observaciones de la Tabla. Como se ha dicho antes, son suficientes seis testigos para cualquier número de reacciones que se practiquen en un día, si se emplean las mismas sustancias para todas las reacciones. Al hacer la reacción de la fijación del complemento, es de aconsejarse que se comprueben aun más completamente los resultados, empleando el suero de un caso de muermo comprobado, en una serie de cuatro tubos, y el suero de un caballo sano en otra serie igual, para los fines de la comparación.

Interpretación de los resultados de las reacciones

Los resultados de las pruebas se manifiestan, en la mayor parte de los casos, por una reacción clara en los tubos de ensayo. La indicación de los resultados se buscará en los tubos numerados 1 y 3, que representan la reacción propiamente dicha del muermo, puesto que estos tubos contienen todas las sustancias que se requieren para la reacción.

En los tubos podemos obtener ya una hemolisis completa, ya una hemolisis incompleta, ya la ausencia total de hemolisis. La fijación

del complemento se manifiesta por la ausencia total, de modo que en el primero y el tercer tubo ocurre la sedimentación de los hematíes con un líquido claro encima. Tal resultado indica, sin duda alguna, la presencia del muermo. Por otra parte, si el primero y el tercer tubos dan una hemólisis completa, queda establecida la au-

TABLA 4.—**Reacción final del muermo**

Tubo	Solu- ción sa- lina	Suero de caba- llo sospe- choso	Extracto de bacilo de muermo	Comple- mento	Se incuba durante una hora	Ambo- ceptor	Hema- tíes	OBSERVACIONES
	(1)	(2)	(3)	(4)		(5)	(6)	
	cc.	cc.	cc.	cc.		cc.	cc.	
1	1	0'1	1	1	Se incuba durante una hora	1	1	{ Tubo para la dosis de 0.1 cc. de suero sospechoso
2	2	0'1	1		1	1	{ Testigo de suero para la dosis de 0.1 cc. de suero sospechoso
3	1	0'2	1	1		1	1	{ Tubo para la dosis de 0.2 cc. de suero sospechoso
4	2	0'2	1		1	1	{ Testigo de suero para la dosis de 0.2 cc. de suero sospechoso
5	1	1	1		1	1	{ Testigo para la cantidad de ex- tracto que se emplea, hemo- lisis
6	2	1		1	1	{ Testigo para la cantidad doble de extracto, para mayor segu- ridad, hemólisis
7	2	1		1	1	{ Testigo del sistema hemolítico, hemólisis
8	3	1		1	1	{ Testigo del complemento, no hay hemólisis
9	3		1	1	{ Testigo de amboceptor, no hay hemólisis
10	4		1	1	{ Testigo de la solución salina no hay hemólisis

(1) Solución salina al 0.85 %.

(2) Suero de caballo sospechoso que se inactivará a 58° C., durante 30 minutos en baño maría, con el objeto de destruir el complemento que se encuentra en el suero de todo caballo.

(3) Una mitad de la cantidad que no impide la hemólisis y que se ha valorado debidamente. (Véase la Tabla 3).

(4) La cantidad más pequeña establecida según la prueba preliminar. (Véase la Tabla 2).

(5) El doble de la cantidad previamente determinada por la valoración. (Véase la Tabla 1).

(6) Hematíes de carnero en suspensión a 5 %.

sencia del muermo. En la presencia del muermo ocurre la fijación del complemento como resultado de la combinación con el amboceptor y el antígeno (véase la plancha I, D.), mientras que en la ausencia del muermo, no existiendo el amboceptor, el complemento queda libre para producir el fenómeno de la hemólisis (véase plancha I, C.)

Pueden ocurrir casos en que la fijación del complemento es incompleta; es decir, que se produce la sedimentación de los hematíes

en el fondo del tubo, pero el líquido muestra algunas trazas de hemolisis. La coloración de este líquido, en este caso, no es el color saturado de la hemolisis, sino solamente una coloración parcial por la hemoglobina. Esto constituye una fijación casi completa, e indica también la presencia del muermo. La presencia del color característico en el líquido con una sedimentación muy ligera de hematíes, no constituye una prueba de la infección, puesto que este fenómeno puede producirse por varias causas y particularmente por la presencia de sustancias no específicas en el suero del caballo, las cuales pueden causar una inhibición parcial de la hemolisis. Pero en todos los casos en que los resultados indican la fijación del complemento (no hemolisis) o una fijación casi completa (ligera coloración del líquido sobre los hematíes sedimentados), puede darse por comprobada la existencia del muermo.

Como resultado de las diferentes cantidades de suero equino que se emplean en los dos pares de tubos, resultará, a veces, que el tubo que contiene la mayor cantidad de suero (0'2 cc. tercer tubo) dará la reacción de la fijación del complemento, mientras que el tubo que contiene la menor cantidad de suero (0'1 cc. primer tubo) dará una fijación parcial del complemento. Esto puede considerarse también como evidencia de una infección muermosa, puesto que indica la presencia de amboceptores, aunque no en suficiente cantidad para producir la fijación del complemento en el tubo en que se ha empleado la cantidad menor de suero sospechoso. En la mayor parte de los casos de infección muermosa, sin embargo, se observará que la fijación del complemento es uniforme y casi completa en ambos tubos.

No se formará opinión hasta que los resultados en los tubos manifiesten claramente la reacción en un sentido o en otro.

En las ilustraciones de la plancha V, los resultados de las pruebas se indican por la presencia de una reacción positiva. En los tubos 1 y 3 se manifiesta una fijación del complemento, es decir, que hay ausencia de hemolisis, mientras que los tubos 2 y 4 representan los testigos para el suero de caballo (no habiéndose agregado extracto de bacilos de muermo); en estos tubos aparece la hemolisis. En la hilera superior del portatubos aparecen los testigos, que indican los resultados que se van obteniendo en el curso de las pruebas.

Si el caballo resulta muermoso, según esta prueba, podrá repetirse la reacción usándose las siguientes cantidades de suero: 0'1, 0'05-0'03, 0'02, 0'01 cc. Se prepara un testigo también con 0'1 cc., como en el tubo 2 de la prueba. Por este método se establece la menor cantidad de suero que puede desviar el complemento; pero esto no es necesario en la rutina corriente.

Nuestra propia experiencia, así como los trabajos de Schütz y Schubert, a los que deseamos expresar nuestro reconocimiento, indican que los resultados de la reacción de la fijación del complemento deben interpretarse de la manera siguiente:

1. Los caballos en que el suero produce una fijación completa

del complemento en las cantidades de 0'1 cc. y 0'2 cc. deben considerarse como muermosos.

2. Los caballos en que el suero da una fijación completa en la cantidad de 0'2 cc. y una fijación incompleta en la cantidad de 0'1 cc., se considerarán también como muermosos.

3. Los caballos en que el suero produce una fijación incompleta del complemento en las cantidades de 0'1 cc. y 0'2 cc., se considerarán también como muermosos.

4. Los caballos cuyo suero no da la reacción de la fijación del complemento en ninguno de los tubos se considerarán como libres de muermo.

Con el objeto de reducir al minimum la posibilidad de error, puede aplicarse la prueba de la aglutinación a estos últimos casos. Si la aglutinación se presenta en diluciones de 1 por 1,000 o más, se considerará muermoso el animal. Estos casos, sin embargo, son rarísimos.

La prueba de la aglutinación puede efectuarse juntamente con la de la fijación del complemento sin gran dificultad, sobre todo si se practica la aglutinación según el método que hoy se emplea en Alemania, por el cual se obtienen los resultados en dos horas. Consiste este método en utilizar la centrifugación que anticipa la aglutinación, de manera que los resultados pueden obtenerse al cabo de dos horas de incubación.

Conducta que debe seguirse en un establo infectado

Cuando se descubre el muermo o hay sospecha de su existencia entre los caballos de un establo, deberá de obtenerse la sangre de todo el ganado para examinarla de la manera que antes hemos descrito. Todos los animales cuyos sueros responden a la reacción de la fijación del complemento, deben ser sacrificados inmediatamente. Después de la muerte de los animales, se aseará perfectamente el establo y se desinfectará. Se repetirá, al cabo de tres semanas, la reacción en los animales que no la dieron en la primera prueba; y si no hay indicaciones de infección en esta segunda prueba, el establo puede considerarse como libre de contaminación. Por el contrario, si en esta segunda prueba uno o más animales presentan la reacción, éstos serán sacrificados y los demás se someterán, al cabo de tres semanas, a una tercera comprobación. No se considerará el establo como libre de infección sino cuando la última experiencia pruebe que no queda animal alguno infectado.

Resultados de las pruebas practicadas con la fijación del complemento

Con el objeto de determinar el tiempo que transcurre después de la infección antes de que el animal dé la reacción del complemento. en la Estación Experimental del *Bureau of Animal Industry*, se infectó con muermo un caballo restregándole una gasa de cultivo del

muermo en la mucosa de la nariz. Veinticuatro horas después de la infección se tomó la primera muestra de sangre de la yugular, operación que se repitió diariamente durante un mes. El caballo fué inoculado el 17 de enero, y la sangre que se tomó el día 22 dió una reacción positiva por la fijación del complemento, demostrando que cinco días después de la infección podía demostrarse, por este método, la infección muermosa. En el día mencionado el animal no presentaba fenómeno clínico alguno de la enfermedad, pero tres días más tarde (en el octavo día), empezó a aparecer el flujo por la nariz; y al mismo tiempo se presentaron las tumefacciones características de los ganglios linfáticos.

Las repetidas pruebas hechas diariamente con la sangre del animal dieron siempre la reacción característica. Después de cuatro semanas del día de la infección, la reacción apareció menos pronunciada, debido esto probablemente a la marcha aguda de la enfermedad y la gran cantidad de toxina producida continuamente por el animal. No se continuaron las reacciones después que la enfermedad hubo de afectar al animal a tal extremo que se hacía peligroso continuar estas manipulaciones.

Desde que se inauguró en este Laboratorio el método de diagnóstico del muermo que acabamos de describir, se ha examinado un gran número de caballos y de mulos del Distrito de Colombia, así como de otras secciones de los Estados Unidos.

Muchos de los caballos estudiados tenían manifestaciones clínicas de muermo, mientras que otros fueron escogidos porque reaccionaban a la prueba de la maleína, más o menos característicamente. La gran mayoría de los casos eran animales que habían estado expuestos al contagio del muermo. Por el número de pruebas que se han verificado hasta ahora (unas 800), los resultados indican que en la fijación del complemento tenemos un método que es igual en su exactitud a la prueba de la tuberculina para el diagnóstico de la tuberculosis en el ganado. Las pruebas hasta ahora practicadas demuestran que, por lo menos, un 97 por 100 de los casos de afecciones muermosas pueden descubrirse por el método de la fijación del complemento. Los caballos afectados en que ocurrió una reacción negativa o atípica fueron, generalmente, o casos muy crónicos de muermo o casos recientes en el período de incubación. Según Hutyra y Marek (1), el diagnóstico del muermo por la fijación del complemento ha dado resultados tan seguros que, puede considerarse como el mejor método que poseemos en la actualidad.

En enero de este año se presentó una buena oportunidad para la aplicación de este método en un brote de muermo que ocurrió en uno de los establos de lujo en el Distrito de Colombia. Encontráronse en este establo dos casos clínicos de muermo, y un examen cuidadoso de los sesenta animales estabulados descubrió otros dos casos que presentaban algunos síntomas sospechosos. Se procedió en se-

(1) *Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere*. — Tercera edición, Tomo I. 1910, p. 717.

guida al examen de todo el ganado, descubriéndose por la reacción de la fijación del complemento que catorce caballos estaban infectados. Desgraciadamente no fué posible obtener el consentimiento del dueño para el ensayo de la inoculación de la maleína con el objeto de hacer un estudio comparativo de estos dos métodos de diagnóstico.

La autopsia cuidadosa de todos los animales que reaccionaron descubrió en cada uno de ellos las lesiones del muermo en uno o más órganos.

En algunos de los casos las lesiones estaban limitadas a pequeños y característicos nódulos en el pulmón, mientras que en otros aparecían las lesiones características del muermo agudo de los pulmones y del hígado. En ninguno de estos casos dejó la autopsia la menor duda con respecto al diagnóstico.

Después de matar los animales infectados, el establo se aseó y desinfectó cuidadosamente. Al cabo de las tres semanas se procedió a una segunda prueba con los demás animales. En esta ocasión, todos los animales, menos uno, dieron una reacción completamente negativa. Este caballo fué sacrificado inmediatamente, y la autopsia reveló un foco caseoso en el ganglio linfático bronquial izquierdo y veinte pequeños nódulos muermosos en los pulmones. Estos eran evidentemente recientes, habiéndose desarrollado sin duda, en el intervalo entre las dos pruebas.

En todos los casos, hasta ahora la autopsia ha confirmado siempre los resultados obtenidos por la reacción biológica. Desde luego que no todos los animales que dieron la reacción fueron autopsiados, puesto que en algunos casos la reacción se verificó a petición de oficiales de los diversos Estados y los animales, por consiguiente, no estaban bajo la jurisdicción del Departamento de Agricultura. En otros casos en que los animales fueron sacrificados no le fué posible a este Departamento obtener notas de las autopsias.

Entre los caballos examinados por el método de la fijación del complemento los hubo que dieron una reacción atípica a la prueba de la maleína; pero la reacción del complemento fué, o absolutamente positiva o negativa. De estos animales, los que dieron una reacción positiva y fueron muertos después, presentaron todos signos del muermo en la autopsia.

La Tabla 5 nos da los resultados comparativos que se obtuvieron entre la prueba de la maleína y la de la fijación del complemento:

TABLA 5. — Resultados comparativos de la maleína y la fijación del complemento

(+ Denota reacción positiva; — denota reacción negativa; ? denota reacción atípica)

SERIES:	Número de animales	Maleína		Fijación del complemento		Maleína		Fijación del complemento		Maleína		Fijación del complemento		Maleína		Fijación del complemento		Maleína		Fijación del complemento		Autopsia	
		+	+	—	—	—	+	+	—	?	—	?	+	+	+	—	?	+	+	+	—	+	—
Montana.	51	23	23	13	13	4	4	8	8	3	3
North Dakota. . . .	37	19	19	11	11	1	1	6	6
Michigan.	15	13	13	1	1	1	1
Illinois.	10	4	4	2	2
Missouri.	8	1	1	5	5	2	2
Connecticut.	5	4	4	1	1
Florida.	20	5	5	1	1	8	8	6	6
Maine.	51	32	32	7	7	12	12
Washington D. C. . .	93	176	176	17	17
»	118	116	116	2	2
Varios.	379	377	377	2	2	2	2

(1) Caballos en estado normal dos meses después de la prueba.

De los 787 caballos estudiados en la Tabla anterior, 199 fueron sometidos a la prueba de la maleína y a la de la fijación del complemento, mientras que los restantes 588 fueron diagnosticados por este último método solamente. De los 199 casos en que pudieron compararse ambos métodos la prueba de la maleína se vió confirmada por la fijación del complemento en 115 casos y no confirmada en 42, mientras que los restantes dieron una reacción atípica a la maleína, pero fueron definitivamente diagnosticados por la fijación del complemento.

Con el objeto de determinar si alguna vez puede obtenerse la fijación del complemento en caballos normales o en caballos afectados de diversas enfermedades, se hicieron experimentos con la sangre de caballos, al parecer, normales, y también con caballos que padecían de diversas enfermedades infecciosas y no infecciosas. Una de estas pruebas se hizo con la sangre de un caballo afectado de fiebre de los pantanos, que tenía una temperatura de 106.2° F.; otras pruebas se hicieron con caballos que padecían de *distemper*, influenza, neumonía, huérfago, cojera, fistulas, envenenamiento por el forraje, etc.; pero en todos ellos la reacción fué negativa.

De todos estos resultados se deduce, evidentemente, la especificidad de esta reacción. Los animales que padecen de muermo darán una reacción positiva. Los animales en estado normal y los que padecen de otras enfermedades dan la reacción negativa.

(Traducido por el DR. J. GUITERAS de un folleto publicado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.)

TRABAJOS EXTRACTADOS

FÍSICA Y QUÍMICA BIOLÓGICAS

YOSHIMURA, K. **Presencia de algunas bases orgánicas en la carne del conejo silvestre.** — En 1 kilo de carne fresca de conejo silvestre Yoshimura encontró 2 gramos de creatina, 2'23 de carnosina, 0'04 de hipoxantina e indicios de xantina. — P. F. — (*Biochemische Zeitschrift*, t. 37, pág. 477.)

CAILLAUX, H. **Variaciones de la proporción de la grasa de la leche y de la vaca.** — Cada día se descubren mecanismos biológicos defensivos más curiosos. De las dosificaciones hechas por Caillaux, parece deducirse que la proporción de manteca de la leche de vaca está como regulada por la voluntad del animal, el cual puede disminuirla y hasta casi por completo suprimirla, cuando se substituye la succión del ternero por el ordeño manual, como si quisiera defenderse de la explotación de que le hacemos objeto. P. F. — (*Bull. de la Soc. Pharm. de Bordeaux*, t. 51, página 447.)

PATOLOGÍA Y CLÍNICA

HYNEK, K. **Hemorreacción de la tuberculosis.** — Agregando tuberculina a la sangre cuyos hematíes deseaba sedimentar, Hynek descubrió que sedimentaba mucho más aprisa. Investigó si esto era característico de la tuberculosis y, en efecto, fundado en cien reacciones, llegó a la conclusión de que realmente son específicos de los organismos tuberculosos, y desde luego superiores a las reacciones cutáneas y conjuntivales.

AMERLING, K. En otro artículo que titula « Observaciones al trabajo de Hynek », intenta explicar el método del último, pero sin lograrlo, pues, dice sólo que la sedimentación más rápida de los eritrocitos, después de agregarles tuberculina, depende, o de la hemoaglutinación, o de alteraciones del volumen de las partículas que se hallan en suspensión en el plasma sanguíneo.

El método de Hynek es curioso, y parece llamado a ponerse pronto en moda. — P. F. — (*Casopis Lékaru Ceskych*, 1911, núms. 46-50 y 51. Extractado por E. Babak, en el *Zentralb. f. Biochemie und Biophysik*, t. III, pág. 687.)

SECCIÓN PROFESIONAL

Nuestra opinión

POR

J. BARCELÓ

En la *Gaceta de Medicina Zoológica* del día 15 del mes actual, se solicita de las Revistas profesionales que emitan su parecer sobre la próxima III Asamblea Nacional Veterinaria. Nosotros nos apresuramos a contestar y aconsejamos a nuestros estimados colegas la misma actitud en cumplimiento de un sagrado deber.

Los acuerdos tomados en la II Asamblea, el año 1907, nos obligan a celebrar la III dentro del presente año, y nosotros tenemos ciega confianza en que dichos acuerdos se cumplirán.

Negar que la última Asamblea ha dado buenos resultados fuera negar la evidencia. Pero de estos buenos resultados ha nacido una saludable enseñanza: la de recoger cuanto antes las dispersas energías nacidas de la Asamblea y multiplicadas al calor del entusiasmo que alberga en nuestras ansias de mejoramiento social.

Se ha evidenciado la necesidad de recoger y acumular la labor individual de estos cinco años transcurridos.

Los esfuerzos convergentes hasta el presente realizados, traducidos en hechos, han dado ya su fruto, honra de la clase entera y premio de gloria a los sabios y esforzados mantenedores que los han llevado a la realidad, orientados en un punto bien definido, que ha sido la base de su éxito.

Las energías individuales, merecedoras del mayor aplauso, exteriorizadas a la par con tantos pensamientos como hombres, han dado lugar a muchos proyectos, bien o mal definidos, con múltiples orientaciones; como si dijéramos: han lanzado nuestra nave hacia lo desconocido, y al tomar el timón para dirigirla cada uno con rumbo a su particular orientación, se halla, en este momento álgido, a la misma altura en que la dejáramos cinco años atrás.

No es esto decir que se ha perdido el tiempo. ¡No! Hemos probado nuestras fuerzas, y son tantas, que, reuniéndolas ahora, daríamos un elevado ejemplo de civismo y conseguiríamos los propósitos de mejora que todos ansiamos.

La Asamblea próxima a celebrarse puede y debe tener carácter científico, pero fuera un atentado al progreso, a la ciencia y a la profesión el no conceder a la misma carácter profesional para sintetizar nuestras aspiraciones. La conjunción de todos los proyectos y consiguiente refundición en uno solo, se impone en estos momentos, y el cumplimiento de los acuerdos de la última Asamblea lo impone también.

¿Que se acordó que la Asamblea próxima había de ser científica? Nadie lo impide: es más: creemos que debe serlo. Tenemos un ele-

vado concepto de los que, por sus méritos personales, han de hacerla brillar con su labor. Pero ¿es que ello impide el que la referida Asamblea tenga doble carácter?... ¿Que por qué no se acordó así en las conclusiones de la II Asamblea?... Entonces no pudo preverse lo que había de suceder. En aquellos momentos no podía sentirse la necesidad imperiosa de hoy de reunir lo que, creado a impulsos de ella misma, ha venido presentándose con diversidad de formas, que es imprescindible reducir a una. Y nos parece que en la Asamblea, donde estarán representados todos los organismos de la clase, es el lugar más adecuado para tratar de un asunto de tan vital interés.

Por tales razones, la clase entera debe votar por el doble carácter de la Asamblea próxima a celebrarse, y sus organizadores han de ver en este doble carácter la única forma legal de dar satisfacción a la clase y a la sociedad, dándosela a sí propios por la estricta justicia en el cumplimiento de tan espinoso deber.

Podremos ir equivocados, pero ésta es nuestra modesta opinión. Digan los demás la suya.

NOTICIAS

A la memoria de un Catedrático. — El Ayuntamiento de Pinos Puente (Granada), deseoso de perpetuar el recuerdo del que fué ilustre Catedrático y Director de la Escuela de Veterinaria de Córdoba, D. Antonio Ruiz Fernández, hijo de aquella población, ha acordado colocar la siguiente lápida conmemorativa, en la casa donde nació:

«En esta casa nació el día 13 de junio de 1833, D. Antonio Ruiz Fernández, Catedrático y Director de la Escuela de Veterinaria de Córdoba. Fué humilde y caritativo con los pobres. El Ayuntamiento de Pinos Puente, su patria, le dedica este recuerdo.»

El solemne acto del descubrimiento de la mencionada lápida tendrá lugar el día 1.º del próximo mes de abril.

Proposición filantrópica. — Con este epígrafe nos remite un bien pensado artículo nuestro distinguido compañero D. Leandro Fernández Turégano, en el que expone la idea de fundar una «Sociedad de socorros mutuos de los Veterinarios al servicio del Estado».

La falta de espacio nos impide publicar íntegramente dicho artículo, y por esto lo resumimos a continuación.

El profesorado de nuestras Escuelas de Veterinaria y los Cuerpos de Veterinaria Militar e Higiene pecuaria, dice el Sr. Turégano, carecen de una Sociedad de socorros mutuos que asegure a las viudas y a los hijos de los Catedráticos, Veterinarios militares e Inspectores de Higiene pecuaria, una cantidad que alivie en algo la triste situación en que quedan cuando muere el jefe de su respectiva familia.

Separadamente, ninguna de estas entidades podría recaudar una suma bastante a cubrir los gastos que la muerte ocasiona. En cambio, unidas las tres corporaciones, con sólo contribuir sus miembros con el 1.º o el 2.º por 100 del sueldo líquido que perciben, podrían reunir una cantidad que aliviaría el precario estado económico de sus huérfanos y viudas.

Si como confiadamente espero, añade el Sr. Turégano, llega a reunir número suficiente de adhesiones, haré entrega de las mismas, el día 15 de mayo próximo, a una Comisión compuesta de un Catedrático, un Veterinario militar y un Inspector de Higiene pecuaria, residentes en esta Corte, con el fin de que redacte la misma el Reglamento correspondiente y quede constituida la « Sociedad de socorros mutuos de los Veterinarios al servicio del Estado ».

Las adhesiones deben remitirse a estas señas: Sr. D. Leandro Fernández Turégano, capitán de Inválidos, procedente del Cuerpo de Veterinaria militar, Cuartel de Inválidos, calle de la Cruzada, Madrid.

Los servicios sanitarios en Melilla. — Los veterinarios militares que prestan sus servicios en el ejército de operaciones de Melilla, están realizando una campaña sanitaria que merece calurosos elogios.

He aquí lo que escribe a este propósito un importante diario barcelonés:

« Se nos dice que en pocos días fueron decomisadas e inutilizadas, por consiguiente, algunas reses vacunas que en Monte Arruit se les sacrificó con destino al abastecimiento de la fuerza que guarnece dicha posición; una de ellas presentaba las lesiones orgánicas características del carbunco bacteriano (fiebre carbuncosa), enfermedad contagiosa al hombre, y otra afecta de tuberculosis miliar generalizada, más aparte los diarios espurgos parciales llevados a cabo, efecto de lesiones puramente locales y poco extensas; la vigilancia ejercida constantemente sobre los embutidos, pescados y otros comestibles que los cantineros presentan algunas veces en malas condiciones de salubridad, pone de manifiesto que la ingestión por el soldado de alimentos averiados, ya sea de mala fe, ya debido a enfermedades, podría, en algunos casos, dar lugar a fuertes sacudidas en la salud de las unidades del ejército ».

La labor sanitaria que se ejerce en Monte Arruit, se practica en Zelúan y demás puntos ocupados por nuestras fuerzas, y como no se trata de una acción simplemente personal, sino que es expresión técnica profesional de un cuerpo científico, entendemos es de justicia poner de relieve el mérito sanitario de los trabajos anónimos por el personal de oficiales veterinarios, los cuales se hacen cada vez más acreedores a la estimación pública y oficial, teniendo en cuenta que con su perseverante gestión higiénica disminuyen con seguridad y grandemente la morbosidad en el ejército ».

Vaya, pues, nuestro sincero aplauso a los sufridos veterinarios militares, que en la guerra cumplen tan satisfactoriamente su misión.

Enlace. — La Sra. D.^a Leonor Ramírez, hija de nuestro ilustrado compañero de la República Argentina D. Genaro, ha contraído matrimonio con D. Agustín Sánchez.

Reciban nuestro parabién.

Triquinosis. — En El Palmar, pueblo inmediato a Murcia, han enfermado de triquinosis muchas personas que comieron embutidos elaborados con carne de cerdo triquinada.

Aun que las autoridades han adoptado medidas para evitar la propagación del mal, el número de invasiones es muy considerable y han ocurrido algunas defunciones.

Excursión científica. — El distinguido catedrático de Zootecnia de la Escuela de Veterinaria de Madrid, Sr. Castro y Valero, ha realizado una excursión científica, acompañado de sus alumnos, al depósito de caballos sementales del Estado, establecido en Alcalá de Henares.

Los excursionistas admiraron los hermosos ejemplares que allí existen y se dedicaron a estudiarlos y clasificarlos científicamente, adquiriendo así, del natural, que es de la manera como deben darse estas enseñanzas, conocimientos sólidos y provechosos.

VETERINARIOS EMINENTES

JUAN MAZZINI



Juan Mazzini

