

Estudio de algunas Pasteurellas y Salmonellas por cultivo en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo

por FRANCISCO SANTISTEBAN GARCIA

Profesor auxiliar de la Facultad de Veterinaria de Córdoba

Universidad Central

Curso 1945-46

TESIS DOCTORAL

I. Introducción

Las técnicas de cultivo de ultravirus en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo han abierto un vasto campo en la experimentación microbiológica, pues no sólo se emplean para el cultivo y estudio de los virus, sino que, por tratarse de un medio vivo y estéril, pueden utilizarse para el estudio de los problemas derivados de la infección bacteriana.

Convencidos de la gran importancia que tienen dichos problemas, hemos emprendido una serie de experiencias encaminadas a resolver algunas cuestiones relacionadas con el cultivo en huevo de *Pasteurellas* y *Salmonellas*, bajo la dirección del Dr. Germán Saldaña Sicilia, Decano y Catedrático de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Córdoba.

Agradecemos las orientaciones de nuestro querido compañero Diego Jordano, Catedrático de Biología, que nos inició en las técnicas de cultivo en huevo.

II. Antecedentes

Si bien es abundante la bibliografía sobre cultivo de ultravirus en corio-alantoides de embrión de pollo, es muy escasa, por el contrario, en lo que respecta al cultivo de bacterias en las mismas condiciones.

Solamente conocemos los trabajos de E. W. GOODPASTURE y K. ANDERSON, en los que se estudian problemas de infección mediante inoculación de cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Aerobacter aerogenes*, *Eberthella typhi*, *Brucella abortus*, *Corynebacterium disteriae* y *Mycobacterium tuberculosis avium*. Estos autores aseveran que para el estudio de la infección, en los primeros estadios de invasión, la inoculación en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo, con cultivos puros de bacterias patógenas, es un método fácil de realizar. Estudian el reparto o localización y la capacidad de reproducción que las distintas bacterias del grupo antes mencionado tienen

para desarrollarse en las células mesodérmicas (fijas y móviles) y en los epitelios ecto y endodérmico.

Para dichos autores, todas menos el *Staph. aureus*, *Strep. haemoliticus* y *C. difteriae*, invaden las células y se observan dentro de las fijas y móviles del mesodermo. El *Strep. viridans* lo encontraron sólo dentro de células errantes y fijas del mesodermo; el *A. aerogenes*, en células errantes mesodérmicas, pero también en células del epitelio ectodérmico; el *E. typhi*, en el epitelio entodérmico y en menor extensión en el ectodérmico; el *Br. abortus* en el epitelio ectodérmico y en elementos mesodérmicos de la membrana; el *M. tuberculosis avium*, sólo en los elementos mesodérmicos.

Teniendo en cuenta tales hechos, sientan también la conclusión de que para algunas bacterias la fagocitosis no representa una resistencia a la invasión, sino que, por el contrario, la favorece, ya que los gérmenes viven y se reproducen dentro del protoplasma de células fagocitarias.

Respecto al *St. aureus* y al *haemoliticus*, dicen haber observado que pueden ser destruidos en parte por los fagocitos del embrión y que son incapaces de crecer en el medio intracelular.

También son muy interesantes las experiencias de N. E. GOLDSWORTHY y VARNFOD MOPPETT, que reseñamos a continuación:

Estos autores corían trozos de cáscara en forma de cuadrado, dejando íntegra la testa, sin exponer el huevo al aire. En los huevos así «preparados» comprueban que no se producen reacciones, ni tampoco cuando al quitar un pedazo de cáscara se rompe un vaso corio-alantoideo.

Estudian lo que ellos llaman «reacción periférica», que se reconoce a simple vista como una línea de engrosamiento, discontinua e irregular, separada unos 2 mm. del borde de la ventana. Al microscopio esta línea presenta principalmente hipertrofia papilomatosa del entodermo, con frecuencia intesa, mientras que el ecto y mesodermo ofrecen ordinariamente lesiones menos llamativas, pero perceptibles. Las células del mesodermo hipertrofico se mostraban con signos degenerativos: tumefactas, irregulares, con grandes vacuolas, y el material nuclear apenas

visible. El examen bacterioscópico y el cultivo de estas lesiones resultó negativo.

Al excluir la causa bacteriológica, los autores verifican experiencias con factores físicos asociados a las manipulaciones que requiere la preparación de la ventana.

Un chorro de aire frío es eficaz en la producción de lesiones atroficas corioalantoideas. El aire proyectado fué esterilizado por filtración. En cambio, el aire caliente (a 37° C) no produjo lesiones. Así como tampoco un pedazo de hielo contactando durante 10 minutos. Lo que motiva la lesión es la desecación rápida originada por el frío.

Tomaron huevos de 10 días de incubación y los sumergieron total o parcialmente en caldos de cultivo. Estos cultivos los ensayaron respecto a su capacidad para determinar lesiones corioalantoideas, depositando una gota sobre la testa y cubriendo con un trozo de cáscara estéril tan pronto como la gota se absorbía. Después parafinaban. La mayor parte de estos caldos de cultivo no producían efecto, aunque contenían muchas bacterias. Aislaron un bacilo parecido al *B. subtilis*, que llamaron *E. XIII*, siendo el único que produjo lesiones. No daban reacciones, ni un bacilo coliforme gram-negativo, ni un coco gram-positivo.

La reacción que origina el *E. XIII* es de tipo infeccion. Macroscópicamente se caracteriza por ser gris, abultada, uniformemente redondeada y difuminada gradualmente hacia los tejidos normales circundantes. Microscópicamente el entodermo no estaba afectado en el grado característico de las lesiones producidas por medios físicos, sino que las principales lesiones estaban repartidas por meso y ectodermo. En ningún caso observaron bacterias, aunque existían en el espacio virtual existente entre la testa y la alantoidea. La inoculación de este germen en huevos moribundos o muertos, parece producir una coagulación en masa.

Experimentos realizados les permiten asegurar que la lisozima del huevo no interviene en su defensa.

Concluyen que las modificaciones de la presión osmótica y la exposición al aire favore-

cen la infección, siendo la desecación el factor más importante.

III. Material y técnicas empleados

A. Material.

Nuestras experiencias las hemos realizado con gérmenes pertenecientes al género *Pasteurella* y *Salmonella*, que procedían de cepas del Instituto de Biología Animal, Instituto Veterinario Nacional, de Madrid, Laboratorios Ifmy, de Córdoba, y de los Laboratorios de Bacteriología y Enfermedades Infecciosas de esta Facultad de Veterinaria.

Las cepas ensayadas han sido:

Pasteurella aviseptica, 3; *suisepitica*, 2; *oviseptica*, 2. *Salmonella*: *S. pullorum*, 2; *S. gallinarum*, 2; *S. cholerae suis*, 3.

Para incubar hemos utilizado huevos frescos de gallina (no más de siete días) de procedencia distinta, tanto de granjas con animales seleccionados como de corral, sin que hayamos notado en los resultados una diferencia apreciable. Siempre indagamos sobre el estado de salud de los animales y dimos preferencia a los huevos limpios y de cáscara sin defectos.

El resto del material empleado lo componen el usual en la técnica histológica y bacteriológica.

B. Técnicas.

1. Incubación. Las incubaciones las hemos realizado en estufa eléctrica o incubadora a petróleo. El resultado ha sido satisfactorio en ambas, pero aconsejamos que, sea en una o en otra, se compruebe la temperatura a la altura de los huevos o, mejor aun, colocar un termómetro de máxima y mínima que nos mostrará cualquier oscilación, sobre todo si hay el peligro de una anomalía en el suministro eléctrico.

Estuvieron reguladas a 38-40°, temperatura que ha dado los mejores resultados.

La duración de la incubación ha sido de 10 a 12 días. Al cuarto día practicábamos la ovoscopia, rechazando todos aquellos huevos que hubieran resultado infértiles. A los 10 días se

hace nueva ovoscopia para poder observar los movimientos del embrión. Es conveniente rechazar los huevos que no presenten una clara vitalidad. A los 12 días se realiza la ovoscopia con más dificultad, pero siempre (caso de no ser demasiado gruesa la cáscara) se puede observar la sombra del ojo o el pico del embrión y los vasos alrededor de la cámara de aire.

Los huevos declarados positivos son marcados con el signo + y si se va a proceder a la inoculación inmediatamente, se les marca un círculo con lápiz, precisamente en el lado opuesto al que ocupa el embrión, que siempre se ve como una mancha más oscura.

La fecha más adecuada para la inoculación de bacterias nos ha parecido ser la de doce días, pues para entonces se encuentra la membrana corioalantoidea completamente desarrollada y en ella es posible apreciar las lesiones histológicas que se pueden presentar.

2. Controles. En todos los casos hemos procedido a un control riguroso antes y después de las inoculaciones del material objeto de estudio; si bien era ya suficiente el nombre del lugar de procedencia para garantizar su pureza. Pero con objeto de hacer uniformes las experiencias y asegurarnos de que no existía una contaminación con las cepas en nuestro poder, procedimos siempre con idéntica técnica.

Para realizar el control de *Pasteurellas*, hemos seguido la técnica descrita por C. AGENJO Y I. HERENCIA CARLOS DE VERGARA, añadiendo las propiedades morfológicas y culturales propias de ellas.

Las cepas han sido sembradas en caldo suero. A partir de éste la marcha ha sido:

- 1.º Siembra en caldo salado al 4 por 100.
- 2.º Siembra en los azúcares (glucosa, galactosa, sacarosa, manita, maltosa y lactosa).
- 3.º Investigación de indol.
- 4.º Tinción con azul de metileno y Gram.
- 5.º Movilidad.
- 6.º Siembra en agar ordinario, agar-suero y suero coagulado.

El control de *Salmonellas* lo hemos realizado teniendo en cuenta sus propiedades morfológicas, bioquímicas y culturales. Previo cultivo en

caldo durante 24 horas, la cepa la hemos examinado:

- 1.º Con la tinción por el método de Gram.
- 2.º Prueba en gota pendiente para investigar movilidad.
- 3.º Siembras en los azúcares (glucosa, sacarosa, manita, maltosa y lactosa) para observar las fermentaciones y producción de gas.
- 4.º Siembras en agar ordinario y en el medio de Kauffman.

Puesto que nos daban ya clasificados los gérmenes, no hemos realizado pruebas de aglutinación.

Todos los medios se han preparado según los procedimientos ordinarios y no los describiremos por encontrarse en cualquier técnica bacteriológica.

3. *Preparación del material para inocular.* Los gérmenes a inocular procedían en todos los casos de subcultivos de 24 horas, de las cepas perfectamente identificadas. Nuestras primeras inoculaciones las hacíamos con cultivos en caldo sin diluir, pero las lesiones se observan mucho mejor con material diluido.

Esterilizamos por ebullición jeringas de insulina con su émbolo y agujas montados, y una vez hervidas las colocamos en tubos de ensayo estériles. Al mismo tiempo, en un vaso de precipitados, con alcohol de 90º, se colocan unas tijeras de punta fina y unas pinzas.

En un tubo de ensayo que contenga parafina dura se pone a fundir ésta, y una pipeta introducida nos servirá para depositar a gotas el líquido a punto de solidificarse.

Se cargan las jeringas con el material a inocular y se colocan nuevamente en sus respectivos tubos. Conviene, si son más de un germen los que se van a inocular, anotar todos los tubos que contienen las jeringas y en los de s. s. hacer la indicación del germen respectivo, con lo que evitaremos equivocaciones.

4. *Técnica de la inoculación.* La técnica que hemos empleado está basada en las de Burnet y Borrel.

Preparado el material como anteriormente se ha dicho, se colocan los huevos elegidos en una gradilla (se puede sustituir con una cápsula de

Petri y una capa de algodón) procediéndose de la manera siguiente:

Se colocan con el círculo marcado con lápiz (descrito en la pág. 69) para arriba y el extremo donde está la cámara de aire hacia la derecha; se vierte alcohol de 90º para que bañe bien por fuera la cáscara; una vez secada ésta, se flamean las tijeras y cogiéndolas sólidamente se perfora con decisión (basta 2-3 mm²) en el centro de la cámara de aire. A continuación se perfora con la punta de la tijera en el centro del círculo marcado con lápiz, rompiendo la testa sin lesionar la corioalantoides, estándose entonces en disposición de realizar la inoculación.

Se toma la jeringa del tubo en que está introducida, y con cierta oblicuidad se introduce en el orificio practicado. La cantidad a inocular depende del germen y de la dilución. En nuestras experiencias hemos inoculado generalmente de 0'025 a 0'15 ml.

Practicada la inoculación se toma la parafina del tubo que la contiene, valiéndose de la pipeta, y con cuidado se depositan varias gotas sobre el orificio de inoculación, pero de tal forma que, en contacto con la cáscara, se solidifique rápidamente y no penetre en el interior, como ocurriría si estuviese demasiado caliente. De igual forma se procede con el orificio de la cámara aérea.

El huevo es colocado nuevamente en la estufa, con el sitio de inoculación hacia arriba, hasta el momento de su apertura.

5. *Contaje de gérmenes.* La técnica seguida ha sido la de Breed. La hemos realizado de la siguiente manera:

Con las mismas jeringas y agujas utilizadas para la inoculación y con un portaobjetos esmerilado con cuadros sin esmerilar de un centímetro cuadrado.

Previamente se determinó el área del campo microscópico (7,854 mm²).

Se deja caer la solución con la jeringa de insulina sobre un cuadrado del portaobjetos. Con estas jeringas basta una división de las de $\frac{1}{40}$ ml., o sean, 0'025 (aproximadamente una gota de solución). Con el asa de platino se extiende bien por el cuadrado y a continuación se fija por el calor.

Se tiñe la preparación con azul de metileno

(no importa sobrecolear si después se diferencia bien con agua) o con el método de Gram.

Conviene contar 20 campos y hallar la media. Una vez obtenida ésta, basta una sencilla proporción para averiguar el número total de gérmenes en un centímetro cuadrado, que a su vez será el número de gérmenes del volumen depositado. En nuestro caso 0'025 ml.

Al estudiar cada germen en particular, daremos el número aproximado de bacterias inoculadas en total y por ml.

6. *Incubación de los huevos inoculados.* Ha variado según los casos; generalmente han sido incubados durante 24 a 48 horas. A veces se ha prolongado hasta 4 días para apreciar el estado de pureza del germen inoculado en esa fecha. Otras, sólo 10 o 12 horas para observar las lesiones incipientes y comprobar el tiempo que tarda en morir el embrión.

Influye indudablemente en la vitalidad del embrión la dosis inoculada. Aun cuando han sido bastantes los huevos inoculados con un mismo germen no nos es posible fijar una dosis mínima mortal aproximada. No obstante las Salmonellas se prestan más a esta determinación que las Pasteurellas, por conservar una virulencia más fija.

7. *Toma de material del huevo.* Después de la apertura del huevo pueden hacerse las siembras convenientes en los medios ordinarios, pero es más fácil la contaminación en este momento, por lo cual vamos a indicar la técnica que hemos seguido para evitar estos inconvenientes y economizar tiempo y material.

Los huevos inoculados se sacan de la estufa o incubadora y, siempre con el sitio de inoculación hacia arriba, se colocan en la gradilla; se bañan bien con alcohol y una vez seco éste se toman las fijeras, en las mismas condiciones que si fuésemos a realizar una inoculación, y se perfora la cáscara. Con una jeringa de 5 ml., con aguja de 1,5 mm., se atraviesa la testa y se introduce más o menos, según el material que vayamos a sacar. Conviene siempre hacerlo del que existe en la proximidad de la alantoides (clara, exudados), pues el vitelo enturbia mucho los medios líquidos. Con este material y sirviéndonos de la misma jeringa, sembramos en medio

ordinario, caldo o agar, donde vamos a realizar el control.

Con una gota de material y con la ayuda de la misma aguja podemos hacer a continuación un frotis, que nos servirá para control bacterioscópico.

También se puede realizar la toma con asa de platino, pero nos ha resultado más práctico y seguro el procedimiento con jeringa.

Cuando interesa recoger la membrana corioalantoidea con fines de investigación histológica o para preparar emulsiones con ella, seguimos la técnica siguiente:

8. *Apertura del huevo.* Colocado en la misma posición que hemos dicho anteriormente, y si se realizó ya la toma de material, sin necesidad de precauciones para evitar la contaminación, se toman las fijeras, y perforando profundamente la cáscara se corta el huevo en el sentido de un plano horizontal y a nivel del eje mayor de aquél se le va dando vuelta y se completa el corte hasta llegar al punto de partida. La parte superior de la cáscara se levanta con pinzas y entonces podremos apreciar si el embrión está vivo o muerto; si bien antes, en el momento de cortar, se ve salir sangre de los vasos alantoideos seccionados, caso de estar el embrión vivo.

Generalmente queda adherida la alantoides a la cáscara cuando el embrión está vivo, pero si está muerto se encuentra desprendida y de no haberla cortado en el momento de la apertura continua envolviendo al embrión.

En una cápsula de Petri se coloca la parte superior de la alantoides, o sea, la próxima al lugar de inoculación. En otra cápsula se colocan el resto de alantoides, el embrión y saco con restos de clara.

Las membranas se extenderán en una cápsula de Petri, con la ayuda de unas pinzas y unas agujas de vidrio con punta roma. Es delicada esta operación, porque los movimientos bruscos o la presión demasiado enérgica lesionan con facilidad la membrana y nos impiden después una visión perfecta y completa al microscopio de las distintas capas.

Una vez observadas las lesiones macroscópicamente, se procede a la fijación para cortes histológicos. En el caso de tener que realizar

una emulsión, se introducen las membranas en un frasco con perlas de vidrio y s. s. estériles y con movimientos enérgicos y rápidos se logra su trituración.

Los fijadores que hemos empleado han sido: Formol al 10 por 100 en suero fisiológico.

Líquido de Zenker.

Fijador de Borrell.

El propuesto por Goodpasture y Anderson, modificación del fijador de Schaudin, consistente en dos partes de solución acuosa saturada de sublimado corrosivo y una parte de alcohol de 60.º

IV. Experimentación con Pasteurellas

Creemos que es más conveniente describir primero los caracteres generales que las distintas cepas de Pasteurellas ensayadas han presentado por inoculación en huevo, y a continuación hacerlo con cada cepa en particular.

Téngase en cuenta que en este trabajo no tratamos de diferenciar entre sí los distintos gérmenes que integran el grupo Pasteurella, porque en general siempre hemos encontrado lesiones principales que son comunes a todas las cepas. Para asegurar una diferenciación serían precisas pruebas que no hemos realizado, ya que nos encontramos con una serie de problemas derivados de la inoculación de gérmenes en la membrana corio-alantoidea que son imposibles de resolver y detallar en un solo trabajo. Por lo tanto, sólo hemos investigado las diferencias que pueden existir entre Pasteurellas y Salmonellas.

1. *Propiedades culturales.* El crecimiento por inoculación de cepas de Pasteurellas, aviar, porcina, ovina, bovina, ha sido positivo en alantoides. Estos gérmenes se desarrollan perfectamente en el medio que representan los tejidos jóvenes de dicha membrana; bastan para ello cantidades insignificantes, como lo prueba la inoculación de la Pasteurella ovina 116, a la dosis total de 200 gérmenes (aproximadamente) en 0.025 ml., que más adelante se describirá.

Para que el desarrollo sea activo es preciso que el embrión esté perfectamente desarrollado y vivo. Hemos inoculado huevos de doce días en los cuales el desarrollo se había iniciado; pero

se notaba por ovoscopia un detenimiento del mismo. En estos casos la autopsia nos revelaba embriones detenidos en su desarrollo desde el séptimo día aproximadamente, así como la ausencia de lesiones. Las siembras practicadas en estos casos resultaban estériles en su mayoría y en los frotis no se ponía de manifiesto germen alguno.

Lo mismo ha ocurrido con gérmenes inoculados en huevos que desde el primer momento se mostraron infecundos.

2. *Morfología.* Respecto a la morfología no hemos encontrado cambio alguno. Las Pasteurellas sembradas en medios ordinarios, se comportan igual que las aisladas de los animales de experimentación. La forma cocobacilar de coloración bipolar, que se pone de manifiesto mejor aun por la coloración con azul de metileno bien diferenciado, la hemos encontrado en todos los frotis de membrana y también en los de embrión y vitelo.

El crecimiento en los medios líquidos y sólidos es también completamente normal. La forma de las colonias tanto en agar, agar-suero y suero coagulado, es la característica gota pequeña de rocío.

3. *Propiedades fermentativas.* La fermentación de los azúcares no presenta alteración. Con la técnica seguida, solamente pudimos observar la diferente capacidad en cuanto a la fermentación de la maltosa. Pero hay que tener en cuenta que los distintos autores asignan a la fermentación de la maltosa una inconstancia manifiesta. Así, para BERGEY, la Pasteurella aviar fermentaría en algunos casos la maltosa, sin producción de gas.

Para MORCH y KROGH-LUND la maltosa es incluida dentro de los azúcares fermentados por gérmenes del que llaman tipo I., el cual fermenta también la glicerina, dulcita, galactosa y almidón.

Según BADJI la cepa Dahomey, aislada de un tumor edematoso de un buey, fermentaría la maltosa sin producción de gas. Este mismo autor cita a TWEB, que ha observado la fermentación de la maltosa en cepas aisladas de un buey con neumonía.

En nuestros casos, cepas que antes de inocu-

larlas no fermentaron la maltosa, si lo hicieron en el segundo control, después de aisladas del huevo.

Por tanto, a la vista de los estudios de los autores citados, hemos dado como cultivos puros de *Pasteurellas* a aquellas cepas que en determinados casos fermentaban la maltosa, siempre y cuando las demás propiedades, morfológicas, bioquímicas y culturales estuvieran conservadas. De los demás azúcares, la fermentación de la lactosa fué negativa, y la glucosa, galactosa, sacarosa y manita dieron resultados positivos.

4. *Indol*. Positivo.

5. *Resistencia*. Generalmente se ha verificado la apertura de los huevos a las 24 horas. Por excepción, este período ha sido acortado a fin de intentar sorprender la muerte del embrión, que ocurrió siempre después de las 10 horas; pero, en determinadas circunstancias, dejamos pasar, expofeso, 5 días sin abrir el huevo, y en todos los casos hemos aislado la *Pasteurella* pura. Indudablemente la inoculación en huevo presenta más ventajas que las realizadas en cualquier animal de experimentación, como veremos con más detalle en la discusión.

6. *Patogenia*. Los gérmenes aislados del huevo han conservado perfectamente su virulencia y en algunos experimentos hemos podido comprobar una exaltación. En un caso hemos podido comprobar que conejos inyectados con cultivos de 24 horas, procedentes de un pase por huevo, han muerto a la dosis de 0'005 ml. (tres milésimas) a las 15 horas. Bien es verdad que las cepas ensayadas eran muy virulentas. Para el palomo y cobaya lo han sido igualmente, sobreviniendo la muerte a las 24 horas.

7. *Lesiones macroscópicas que las Pasteurellas producen en la membrana corioalantoidea*. Todas las *Pasteurellas* ensayadas presentaban cierta igualdad respecto a las lesiones macroscópicas. Han predominado las hemorragias muy circunscritas, colocadas periféricamente a las lesiones necróticas, del tamaño de un grano de mijo, y la congestión de los vasos alantoides mayores. La figura núm. 1 muestra la disposición de estas necrosis y hemorragias.

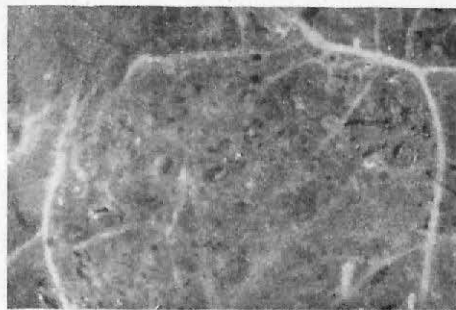
La apertura a las 24 horas siempre ha mos-

trado un embrión muerto, cuyos órganos presentaban congestiones y hemorragias intensas.

Cuando las lesiones hemorrágicas y necróticas han sido masivas, han coincidido con una contaminación, que se ha puesto perfectamente de manifiesto en el control posterior a la toma de material del huevo.

8. *Lesiones microscópicas en general*. Antes de hacer el estudio particular de las lesiones histológicas de cada germen ensayado, vamos a indicar los caracteres comunes a todos, ya que los separan perfectamente de los correspondientes a las *Salmonellas*.

En *Pasteurellas* hay un mayor predominio de las lesiones inflamatorias y necróticas, si bien es posible encontrar hemorragias, que presentan el



Fotomicrografía núm. 1.

carácter de ser más circunscritas y menos abundantes que las producidas por *Salmonellas*.

Estas lesiones inflamatorias están integradas preferentemente por linfocitos, células plasmáticas o plasmocitos (*Plasmazellen*), con su núcleo característico en rueda, puesto de manifiesto con el método del azul policromo de Unna y con el verde de metilo-pironina, y células con núcleo grande, que hemos identificado como histocitos macrofágicos. En ningún caso hemos observado la presencia de células cebadas (*Mastzellen*). En algunas preparaciones se aprecia el exudado inflamatorio, que distiende la membrana dando lugar a engrosamientos manifiestos.

Además de las lesiones inflamatorias, hemos podido observar la presencia de necrosis, que

afectan a las tres hojas blastodérmicas, unas veces por separado y otras simultáneamente. Las necrosis se han presentado con cepas muy virulentas o en aquellas que habían sufrido un pase anterior por huevo.

Mediante la coloración por el Giemsa hemos observado la presencia de Pasteurellas en el interior de las células epiteliales ecto y endodérmicas, así como en las células conjuntivas del mesodermo. La *Pasteurella* conserva aquí su forma, igual a la que presenta en los órganos de los animales de experimentación. Las fotomicrografías a inmersión números 2 y 6 muestran la presencia de los gérmenes en dichas células.

Los cultivos de Pasteurellas muertos por el calor, utilizados como testigos, han resultado estériles y no hemos podido observar lesiones macro y microscópicas apreciables.

9. Lesiones microscópicas en particular. Por creer que presenta interés el estudio detallado de las lesiones que cada cepa ensayada ha producido en alantoides, insertamos a continuación el resumen de las fichas más interesantes de nuestro protocolo.

H. núm. 1. Huevo incubado durante 11 días. Previo control de la cepa fué inoculado con la *Pasteurella* avi núm. 3, en la cantidad total de 5.400 gérmenes (en 1 ml., 216.000).

Apertura a las 48 horas. Embrión muerto. La membrana corioalantoidea no presentó lesiones macroscópicas manifiestas; sólo congestión de algunos vasos alantoideos.

Los controles de azúcares fueron: glucosa, +; galactosa, +; sacarosa, +; manita, +; maltosa, —; lactosa, —.

Cultivo en caldo salado: —.

Colonias en agar: Típicas de Pasteurellas.

Bacterioscopia: Gérmenes cocobacilares gram-negativos.

Movilidad: Inmóviles.

Fueron fijados trozos de alantoides e incluidos en parafina. Las preparaciones histológicas revelaron una inflamación cuyos elementos celulares se componen de linfocitos, Plasmazellen e histocitos. No se observan hemorragias; tampoco lesiones necróticas.

Los gérmenes son abundantes, sobre todo en el mesodermo. Fotomicrografía núm. 2.

H. núm. 4. 12 días de incubación.

Inoculado con 450 gérmenes en 0,025 ml. (en 1 ml., 18.000).

La cepa provenía de un cultivo en caldo de material tomado del H. núm. 1. Se trata, por tanto de un segundo pase en huevo.

Apertura a las 48 horas. Embrión muerto. La alantoides sólo presenta unas manchas blanquecinas, posibles lesiones necróticas.

Los controles bacteriológicos fueron todos positivos.

Los cortes histológicos ponen de manifiesto zonas inflamadas. Fotomicrografías números 3 y 4. En algunos puntos, necrosis del ectodermo y mesodermo. Fotomicrografía núm. 5.

Los gérmenes aparecen en gran cantidad en las tres hojas, pero preferentemente en la ectodérmica. Fotomicrografía núm. 6, en la proximidad de un gran vaso.

Identificamos las lesiones necróticas con los puntos blanquecinos encontrados macroscópicamente.

H. núm. 6. 12 días de incubación. Inoculado con un cultivo de avi núm. 3; 3.800 gérmenes en total (152.000 en 1 ml.)

48 horas de incubación. La apertura pone de manifiesto un embrión muerto. En la alantoides se observan lesiones hemorrágicas intensas.

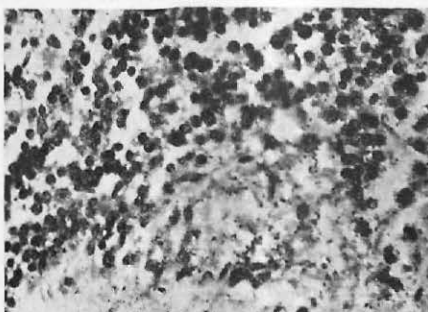
Los controles bacteriológicos resultaron negativos. En los frotis se pudo observar, además de Pasteurellas, un bacilo gram-positivo.

Los cortes histológicos presentaban lesiones inespecíficas, consistentes en infiltrados muy abundantes de células redondas y hemorragias intensas, que invaden el mesodermo.

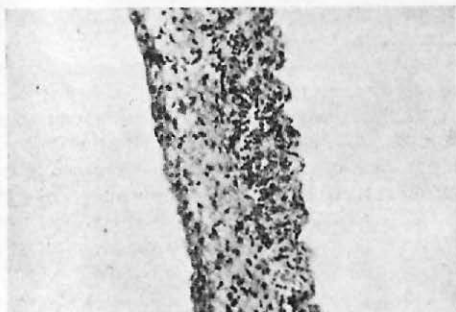
H. núm. 10. 12 días de incubación. Se practicó el procedimiento de ventana, cortando un cuadrado de cáscara de 10 mm. aproximadamente y tapando con un cubreobjetos sujeto con parafina. Se observó que el embrión había muerto antes de las 24 horas. Al verificar la apertura se apreciaron lesiones hemorrágicas.

Los controles bacteriológicos fueron positivos.

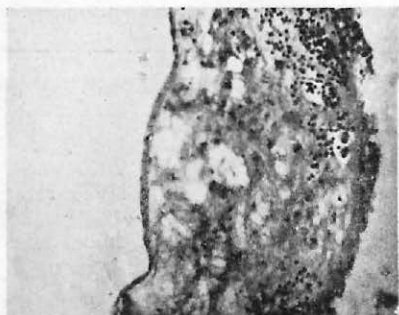
Las preparaciones histológicas presentaron lesiones hemorrágicas; llamó la atención la proliferación epitelial y la necrosis y degeneración del ectodermo.



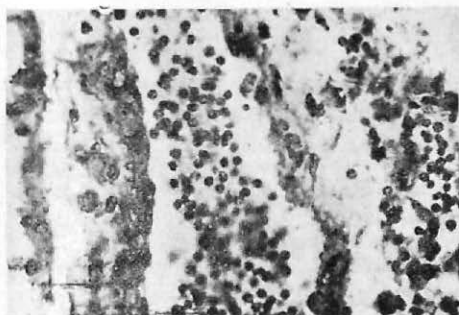
Fotomicrografía núm. 2. Reacción inflamatoria producida por Pasteurellas en alanteídes. Pasteurellas en el interior de células mesodérmicas.



Fotomicrografías números 3 y 4. Zonas inflamadas, preferentemente ectodérmicas.



Fotomicrografía núm. 5. Necrosis de ectodermo y mesodermo.



Fotomicrografía núm. 6. Hecha en la proximidad de un gran vaso. Gérmenes sobre todo en ectodermo.

H. núm. 14. 12 días de incubación. Inoculado con *Pasteurella aviar* 1.084, con un total de 5.000 gérmenes en 0,025 ml. (120.000 en 1 ml.)

Apertura a las 48 horas. Embrión muerto. Macroscópicamente, lesiones necróticas y hemorragias muy circunscritas.

Los frotis mostraron *Pasteurellas* puras. Los demás controles fueron positivos.

En las preparaciones histológicas se pueden observar, principalmente, reacciones inflamatorias que acusan los caracteres de las reseñadas en las lesiones de *Pasteurellas* en general.

H. núm. 15. 10 días de incubación.

Con un control previo, se inoculó la cepa *Pasteurella bovina* Salamanca en la cantidad total de 3.900 gérmenes (156.000 en 1 ml.)

Apertura a las 24 horas.

De los controles bacteriológicos, la maltosa fué fermentada por el material aislado del huevo. Los demás controles positivos.

Los cortes histológicos presentaron, preferentemente, necrosis ectodérmica, conservándose mejor el endodermo. Inflamación con una zona de gran engrosamiento. Hemorragias con pocos elementos. Los gérmenes ocupan en gran cantidad el ectodermo. Fotomicrografías 7, 8 y 9.

H. núm. 17. Fué inoculado también con *Pasteurella bovina* Salamanca y a pesar de que los controles en azúcares fueron positivos, la bacterioscopia puso de manifiesto un bacilo fino gram-positivo.

H. núm. 22. Parecidas lesiones a *H. número 15.* La inoculación se hizo con *Pasteurella bovina* 112.

H. núm. 32. 12 días de incubación. Inoculado con *Pasteurella porcina* 502, previo control; total 5.100 gérmenes (en 1 ml. 127.000).

La apertura presentó un embrión bien desarrollado y muerto. Llamen la atención las lesiones hemorrágicas muy abundantes, que macroscópicamente se asemejan a las que producen las *Salmonellas*.

Los controles todos positivos.

Los cortes histológicos ponen de manifiesto hemorragias muy abundantes; pero también hay degeneración gránulo-grasosa y en algunos puntos reacción inflamatoria. Fotomicrografías números 10 y 11.

Con el cultivo de 24 horas en caldo se inocularon dos conejos (0,1 y 0,02 ml.), muriendo ambos antes de las 15 horas. De los órganos se aisló la *Pasteurella* pura.

H. núm. 55. Inoculado a los 12 días de incubación, con la *Pasteurella ovina* 116; 200 gérmenes en total (8.000 en 1 ml.)

Apertura a las 24 horas. Embrión muerto y bien desarrollado. Lesiones congestivas y algunas hemorragias. Se apreciaron manchitas más claras del tamaño de un grano de mijo rodeadas de anillo hemorrágico.

La siembra de material, en caldo, creció con normalidad a las 24 horas. En los frotis de alantoides y clara sólo se observaron *Pasteurellas*. En goia pendiente sólo gérmenes inmóviles. A la coloración por el Gram, gérmenes negativos. El cultivo en caldo salado, negativo.

Con el cultivo en caldo de 24 horas, se inocularon dos conejos con dosis de 0,02 ml. y 0,005 ml., respectivamente, muriendo el primero antes de las 15 horas y el segundo a las 17, después de verificada la inoculación. La autopsia de ambos animales reveló el cuadro de la septicemia hemorrágica. De las vísceras se aisló la *Pasteurella* pura.

El estudio de las preparaciones histológicas nos puso de manifiesto, en primer lugar, una necrosis que afectaba al mesodermo y endotelio de los vasos (fotomicrografías números 12, 13 y 14); en segundo lugar, el ectodermo era el más afectado. Se observa hiperplasia celular en algunos puntos y degeneración de tipo gránulo-grasoso. La coloración con Giemsa muestra *Pasteurellas*, especialmente abundantes en mesodermo y endodermo, pero también fueron observadas en el ectodermo.

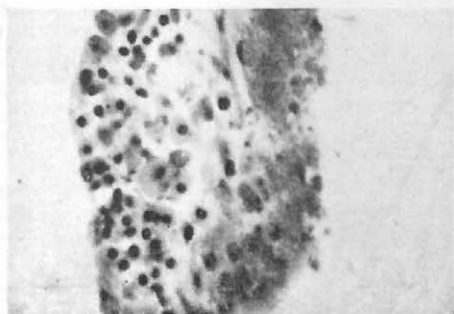
Idénticas lesiones presenta el *H. núm. 60*, inoculado con el mismo germen.

H. núm. 90. 15 días de incubación. La inoculación se practicó con la cepa de *Pasteurella ovina* núm. 2. El número total de gérmenes inoculado fué: 2.000 en 0,1 ml. (20.000 en 1 ml.)

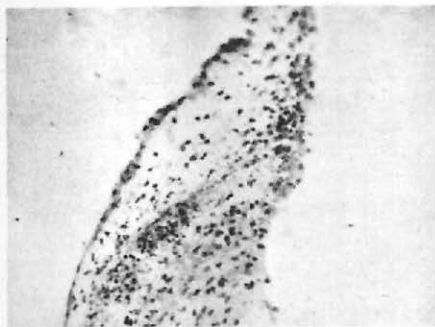
Las lesiones macroscópicas en alantoides fueron idénticas al *H. núm. 55*. Hemorragias circunscritas, rodeando a manera de anillo a una manchita blanquecina. Los cortes histológicos revelaron, igualmente, necrosis que afectaron



Fotomicrografía núm. 7

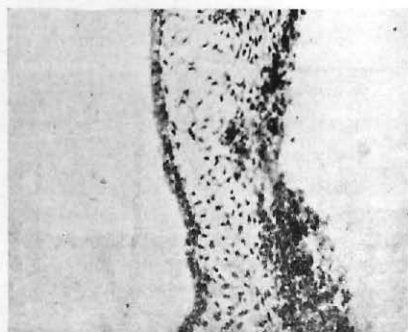


Fotomicrografía núm. 8

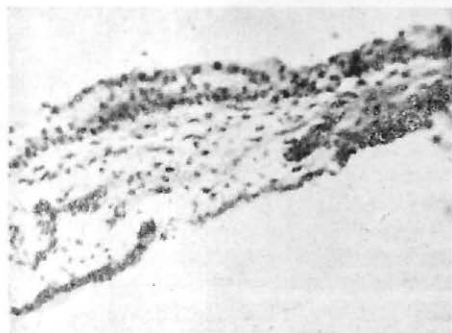


Fotomicrografía núm. 9.

Fotomicrografías números 7, 8 y 9: Necrosis ectodérmica.



Fotomicrografía núm. 10. Hemorragia subectodérmica.



Fotomicrografía núm. 11. Degeneración granulo-grasosa.



Fotomicrografía núm. 12.



Fotomicrografía núm. 13.



Fotomicrografía núm. 14.

Fotomicrografías núms. 12, 13 y 14. Necrosis que afecta al mesodermo y endotelio de los vasos.

principalmente al mesodermo. Repten las lesiones, casi exactamente, las presentadas por la *Pasteurella ovina* 116.

H. núm. 92. Inoculado a los 12 días de incubación, con el mismo germen y en iguales condiciones que el *H. núm. 90.* Apertura a las 24 horas. Embrión muerto. Todos los controles fueron positivos.

Las lesiones, tanto macroscópicas como microscópicas, fueron iguales al *H. núm. 90.*

V. Experimentación con *Salmonellas*

Seguiremos el mismo orden de exposición que en las *Pasteurellas*; pero lo haremos más concisamente a fin de evitar repeticiones.

1. *Propiedades culturales.* Las inoculaciones en huevo de las cepas de *S. pullorum*, *S. gallinarum* y *S. cholera-suis*, han resultado positivas, si bien hemos podido notar una menor abundancia en el crecimiento a diferencia con las *Pasteurellas*.

2. *Morfología.* Al igual que ocurre con las *Pasteurellas*, los frotis de membranas y vitelo de huevos inoculados con *Salmonellas*, muestran a éstas con sus caracteres morfológicos ordinarios, conservándose las propiedades tintoriales.

Los gérmenes aislados del huevo crecen con normalidad en los medios líquidos y sólidos ordinarios.

3. *Propiedades fermentativas.* Las *Salmonellas* aisladas del huevo, crecen normalmente en el agua de peptona, con los azúcares indicados en la técnica. No hemos encontrado ninguna diferencia notable, ni en la acidificación, ni en la producción de gas.

4. *Resistencia.* El material tomado del huevo, tanto a las 24 horas como a los 5 días, ha conservado sus propiedades bioquímicas y culturales.

5. *Patogenia.* No hemos podido comprobar exaltación de virulencia. Los gérmenes aislados del huevo han sido inyectados al palomo y conejo, pero han respondido lo mismo a éstos que a los de cepas primitivas sin inocular.

Lesiones macroscópicas que producen las Salmonellas. Existe un predominio de lesiones hemorrágicas extensas, siempre más difusas que

las que presentan las Pasteurellas. También hay congestión de los vasos alantoides.

No hemos observado necrosis.

No presentan las Salmonellas una gran capacidad de ataque. Son precisas dosis elevadas, en comparación con las Pasteurellas, para producir la muerte del embrión.

Hemos tenido ocasión de comprobar embriones vivos, después de la apertura a las 24 horas. Sus órganos se presentan congestionados y hemorrágicos.

No hemos comprobado si los embriones pueden llegar a término.

7. *Lesiones microscópicas generales en la membrana corioalantoidea.* El estudio, en conjunto, de las preparaciones obtenidas con membranas que presentaban lesiones por Salmonellas, nos ha revelado la presencia de numerosas hemorragias que afectaban el mesodermo, preferentemente en su zona ectodérmica. La fotomicrografía núm. 15 muestra los glóbulos rojos nucleados entre las células mesodérmicas y en parte entre las ectodérmicas. A primera vista pudieran confundirse los núcleos de los hematíes con linfocitos.

La reacción inflamatoria es nula en la mayoría de los casos, y cuando se presenta sólo la componen elementos de núcleo grande que identificamos como histocitos diferenciados, siendo muy raros los linfocitos, polinucleares y plasmocitos.

A pesar de haber empleado distintos métodos de coloración no hemos podido poner de manifiesto Salmonellas en las células ecto y endodérmicas. Sólo las hemos encontrado en el mesodermo.

8. *Lesiones en particular.* Insertamos, al igual que con las Pasteurellas, el resumen de las fichas más interesantes que hemos obtenido en la experimentación con Salmonellas.

H. núm. 9. Huevo incubado durante 11 días. Inoculado con *Salmonella pullorum* 1, en la cantidad total de 2.500 gérmenes (100.000 en 1 ml.)

Apertura a los dos días. Embrión muerto. El alantoides presentaba lesiones hemorrágicas muy manifiestas, pero siempre más difusas y extendidas que las observadas en las Pasteurellas.

Los controles bacteriológicos dieron los caracteres de *Salmonella pullorum*.

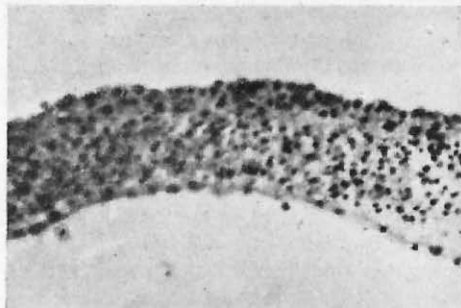
Histológicamente se comprobó engrosamiento de la alantoides, con hemorragias muy intensas. En otras zonas se observa hiperplasia mesodérmica. No se observaron fenómenos necróticos extensos.

H. núm. 20. Inoculado con una cepa de *Salmonella gallinarum*, a los 11 días de incubación, con un total de 3.000 gérmenes (120.000 en 1 ml.)

Se practicó la apertura a las 48 horas, apreciándose un embrión bien desarrollado y muerto. En la alantoides lesiones hemorrágicas.

Los controles bacteriológicos dieron, todos ellos, resultado positivo.

En el estudio de las preparaciones histológi-



Fotomicrografía núm. 15. Lesiones producidas por Salmonellas. Hemorragias y hiperplasia inflamatoria.

cas llamaron la atención las hemorragias intensas que dominaban sobre cualquier otra lesión (fotomicrografías núms. 16 y 17, en la proximidad de un gran vaso ramificado). También se observó hiperplasia conjuntiva.

El Giemsa puso de manifiesto Salmonellas, pero en pequeña cantidad y sólo en el mesodermo.

H. núm. 35. Incubación 12 días. La inoculación se practicó con la *Salmonella cholerae suis* 116; 2.500 gérmenes en total (100.000 en 1 ml.).

Se realizó la apertura a las 24 horas. El embrión presentó movimientos y antes, en el momento de cortar la cáscara, se apreció la salida de sangre.



Fotomicrografía núm. 16. Hemorragias intensas que predominan sobre cualquier otra lesión.

El alantoides presentaba lesiones hemorrágicas muy abundantes y extensas.

Los controles resultaron positivos.

Microscópicamente se pudo apreciar el cuadro general de lesiones que presentan las *Salmonellas*: hemorragias abundantes que afectan al mesodermo, preferentemente acumuladas hacia el ectodermo; ectodermo mejor conservado; entodermo con escasos puntos hipertrofiados. Fotomicrografías núms. 18 y 19.

H. núm. 44. Fué inoculado también con *Salmonella* 116. Presentó en el examen macroscópico de la alantoides hemorragias y unos puntos blanquecinos que no se habían apreciado en otras membranas.

Bacteriológicamente se pudo comprobar, además de las *Salmonellas*, la presencia de un coco gram-positivo.

H. núm. 63. Inoculado con *Salmonella cholerae suis* 10. Las lesiones eran iguales a las presentadas por *H. núm. 35*.

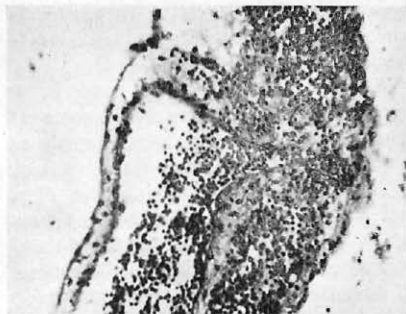
Discusión

Las diversidad de problemas con que nos hemos encontrado al inocular gérmenes en huevo, han determinado algunas variaciones en el plan de trabajo que primitivamente nos habíamos impuesto. Nosotros sólo intentábamos el cultivo de *Pasteurellas* y *Salmonellas* en huevo y su estudio diferencial por las lesiones que producen,

pero no queremos dejar de reseñar la importancia que tiene el estudio de dichos problemas.

Como medio de cultivo, la membrana corio-alantoidea de embrión de pollo es excelente. Hemos podido comprobar, sobre todo en *Pasteurellas*, una proliferación abundantísima, en algunos casos formando acúmulos que al microscopio simulan pequeñas colonias. El tipo de lesiones se manifiesta con características bastante constantes.

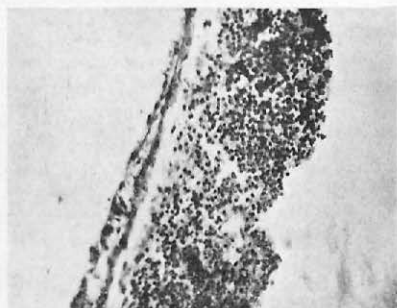
Con una técnica depurada se consiguen cultivos puros, 5 días después de la inoculación; cosa imposible de realizar en ningún animal de experimentación, en el que si se retrasara la autopsia corremos el riesgo de una contaminación. MANNINGER recomienda el aislamiento de las *Pasteurellas* de los productos patológicos directamente y no del pase por animales, pues al inocular material sospechoso a animales de experimentación, es difícil discernir con certidumbre si los microbios cultivados tienen su origen en el material inoculado o si provienen del animal de experiencia, en el que se ha provocado una septicemia intercurrente desencadenada por la inoculación de prueba. Cita este autor que ha podido comprobar la muerte en 24-48 horas de conejos inoculados con *Pasteurella* a consecuencia de la acción del virus de la enfermedad de Aujeszky, puesto que los conejos se pueden encontrar en jaulas donde se debilitan y es suficiente una inoculación para que las *pasteurellas* acci-



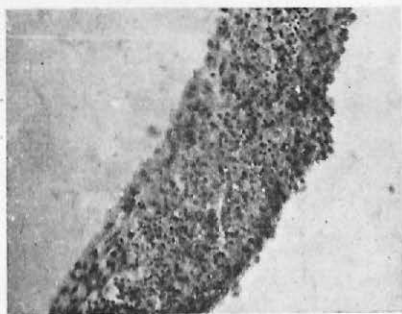
Fotomicrografía núm. 17. La misma preparación de la núm. 16 a más aumentos.

dentalmente presentes pasen al torrente circulatorio.

La inoculación en huevos con embriones muertos o en los infecundados, producen un crecimiento poco abundante. En muchos de estos casos el material tomado del huevo se ha mostrado estéril.



Fotomicrografía núm. 18.



Fotomicrografía núm. 19.

Fotomicrografías núms. 18 y 19. Hemorragia en mesodermo, preferentemente acumulada hacia ectodermo.

Los controles de gérmenes muertos, emulsionados en s. s., no han producido crecimiento, ni tampoco lesiones, conservando los embriones su vitalidad.

Aun cuando hemos podido notar algunas diferencias en las lesiones que producen especies distintas de un mismo género, no tenemos sufi-

cientes pruebas para establecerlas; sólo apunta-mos la importancia que representa la inoculación en huevo, para el estudio del problema de la unidad o pluralidad de ciertas especies bacterianas.

Creemos que los gérmenes encuentran en el medio de cultivo que representan los tejidos jóvenes, un terreno apropiado para la exaltación de su virulencia; aun cuando podríamos aportar algunas pruebas de ello, no lo haremos por considerarlas insuficientes y porque esto sería objeto de nuevas investigaciones.

Conclusiones

1.^o La membrana corioalantoidea del embrión de pollo se nos ha mostrado como un excelente medio de cultivo para las Pasteurellas ensayadas.

2.^o Igualmente es un buen medio para las Salmonellas estudiadas, pero su crecimiento es menos abundante.

3.^o Los gérmenes empleados no se han modificado en sus propiedades morfológicas, bioquímicas y culturales.

4.^o Los gérmenes se han aislado con pureza del huevo, cinco días después de verificada la inoculación.

5.^o Creemos que las lesiones histológicas producidas en dicha membrana difieren entre Pasteurellas y Salmonellas. Las primeras se caracterizan, principalmente, por producir lesiones inflamatorias y necróticas; en menor proporción hemorrágicas. Las segundas dan, preferentemente, lesiones hemorrágicas y en menor proporción hiperplásicas.

6.^o Creemos haber cultivado por primera vez Pasteurellas y Salmonellas en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo.

Summary

- (1) The chorio-allantoic membrane of the developing chick embryo proved to be an excellent culture medium for the Pasteurella tested.
- (2) It is likewise a good medium for the Salmonella studied, but the growth of the latter is less abundant.

- (3) The germs employed did not show any modifications of their morphological, biochemical and culture properties.
- (4) Pure germs have been isolated from the egg five days after practising inoculation.
- (5) It is believed that the histological lesions of the chorio-allantoic membrane caused by *Pasteurella* differ from those originated by *Salmonella*.
The former are chiefly characterized by inflammatory and necrotic lesions, hemorrhages are found only in a few cases. The latter cause especially hemorrhagic lesions and, at a minor rate hiperplasia.
- (6) It is believed that *Pasteurella* have been cultivated for the first time on the chorio-allantoic membrane of the developing chick embryo.

Bibliografía

- AGENJO CECILIA, C y H. C. VERGARA. Contribución al estudio del género *Pasteurella* (Trevisan). *Trab. Inst. Biología Animal*, 6, 59 (1941).
- ARJONA TRIGUEROS, E. y F. MANSO RODRIGUEZ. El diagnóstico práctico de las *Salmonellas*. *Trab. Inst. Biol. Animal*, 5, 116 (1940).
- ASCHOFF, L. Tratado de anatomía Patológica. 1934.
- BADJI, S. Estudio comparativo de una cepa local de *Pasteurella boviséptica*. *Rev. Vet. exot.*
- BERGEY. Manual of determinative Bacteriology. 5.ª ed.
- BURNET, E. M. The use of the developing egg in virus research. *Med. R. Council*, núm. 220 (1936).
- FERRER DE LA RIVA, D. Manual de Técnica Histológica. (1929).
- GOLDSWORTHY, N. E. y W. MOPPET. The reactions of the chorio-allantoic membrane of the chick to certain physical and bacterial agents. *J. Path. a. Bacter.* 41, 529 (1935).
- GOODPASTURE, E. W. y ANDERSON. The problem of infection as presented by bacterial invasion of the chorio-allantoic membrane of chick embryos. *Amer. J. Path.* 13, 149 (1937).
- JORDANO, D. Estudio de las lesiones alantoideas producidas por el virus variólico y resultados de la inoculación del virus-huevo en el conejo. Tesis. *C. Vet.* núm. 30 (1945).
- JORDANO, D. Nota sobre algunos métodos de cultivo de ultravivus. XVIII Cong. de la As. esp. para el Progreso de las Ciencias. Córdoba. 1944. *Zootecnia*, 5, 29 (1944).
- LANGERON, M. Précis de Microscopie, 1934.
- MANNINGER, R. *Bull. Off. Inter. des Epizooties*, 116 (1934).
- MORCH y KROGH-LUND. *C. R. Soc. Biol.* 319 (1930).
- ROMEIS, B. Técnica Histológica. 1928.
- SEIFRIED, O. Curso de Histopatología, 1936.
- TOPLEY y WILSON. Bacteriología e Inmunidad. 1.ª edición española.
- URTUBEY, L. La inflamación. Lecciones de Anatomía Patológica. 1942.
- URTUBEY, L. Histología. 1944.
- ZAPATERO, E. Técnica Bacteriológica. 1942.

FACULTAD DE VETERINARIA DE CORDOBA

CUADRO DE PROFESORES DURANTE EL CURSO 1946-47

Catedráticos numerarios

Germán Saldaña Sicilia.—Histología y Anatomía Patológica.

José Martín Ribes.—Anatomía.

Rafael Castejón y Martínez de Arizala.—Enfermedades infecciosas.

Félix Infante Luengo.—Patología general.

Gumersindo Aparicio Sánchez.—Zootecnia 2.º

Diego Jordano Barea.—Biología aplicada.

Sebastián Miranda Entrenas.—Bacteriología.

Profesores encargados de cátedra

Isidoro García Escribano.—Patología quirúrgica.

Amando Ruiz Prieto.—Inspección de alimentos.

Francisco J. Castejón Calderón.—Fisiología.

Dolores Arjona Soto.—Química.

Manuel Pérez Cuesta.—Zootecnia 1.º

José Villegas Laguna.—Farmacología.

Manuel Medina Blanco.—Fitotecnia.

José Fernández Cuenca.—Religión.

Antonio Sarazá Ayustante y José Barrena Rodríguez.—Formación política.

Mariano Barrena Gómez.—Educación física.

Auxiliar numerario

Rafael Ortiz Redondo.—Podología.

Ayudantes de clases prácticas

Fernando Guerra Martos.

Gabriel Bellido Mínguez.

Francisco Santisteban García.

Francisco Castillo Gigante.

Rafael Amo Molina.

Juan Lucena Solá.

Publicaciones periódicas de la Facultad

«Boletín de Zootecnia». Mensual, (Órgano de la Sociedad Veterinaria de Zootecnia, Sección de Córdoba).

ZOOTECNIA. Revista trimestral

GANADERIA. Interrumpida su publicación en 1936, cuando estaba en prensa el número 6, que debía llevar unas 80 páginas. Ha sido completado ahora hasta 16 páginas y publicado, con objeto de terminar la colección de *Ganadería*, de la cual *Zootecnia* es continuación, y lleva un índice general. Precio: 10 pesetas.

El Consejo de Redacción hace público su agradecimiento a los Colegios Oficiales de Veterinarios de Andalucía que contribuyen a la publicación de esta Revista.