

**DEL INSTITUTO DE HIGIENE DE LA UNIVERSIDAD
DE KIEL (Alemania), Director Prof. Dr. med. Franz
Klose y del Instituto de Anatomía Patológica de la
Universidad de Concepción (Chile)
Director: Prof. Dr. E. Herzog.**

Tuberculosis experimental en huevo de gallina incubado.

Método para la determinación de la resistencia de bacterias tuberculosas frente a los antibióticos

(Con 4 figuras)

por

Richard Schürmann

En este trabajo se informa sobre algunas investigaciones respecto a problemas de la tuberculosis. Estas investigaciones se realizaron en el Instituto de Higiene de la Universidad de Kiel, correspondiendo a mí la elaboración de la parte anatómo-patológica.

Dió origen a nuestra investigación un problema de gran actualidad. En Alemania la tuberculosis aumentó después de la derrota militar de Mayo de 1945 en forma alarmante, mientras que durante el desarrollo de la guerra misma no ha significado un factor de importancia en la salud pública del pueblo. Las causas de su aumento deben buscarse en la escasez de la alimentación y de viviendas y en la tragedia de los refugiados. Es un hecho que la población de Alemania recibió durante tres años después de la guerra menos de la mitad de las calorías necesarias para su alimentación, vivía pues con mucho menos del mínimo aceptable; a esto se agregaba además la escasez enorme de viviendas, ocasionada por los bombardeos a zonas pobladas de grandes ciudades y finalmente el desplazamiento de más de 7 millones de refugiados provenientes del este de Alemania. Todas estas circunstancias crearon a las autoridades sanitarias y a los médicos de Alemania un problema casi imposible de solucionar. Pese a todo esto es admirable, que actualmente en el año 1952 la extensión de la tuberculosis en Alemania ya es inferior a la del año 1939, o sea antes de la segunda guerra mundial. La causa de este desarrollo favorable debe atribuirse en primer lugar a la eliminación del déficit alimen-

ticio después de la reforma del cambio en 1948 y además a las medidas y a la lucha preventiva antituberculosa establecidas por el gobierno, finalmente a los métodos de tratamiento mejor desarrollados, ante todo con los nuevos medicamentos antibióticos y quimioterapéuticos. A pesar de que el problema de la escasez de viviendas y el de los refugiados está lejos de haber sido resuelto en Alemania, la tuberculosis está bajo control seguro de los médicos y autoridades sanitarias. Cabe mencionar a este respecto que la vacunación preventiva con B. C. G. sólo ha sido realizada en algunas provincias de Alemania y que hay razones bien fundamentadas contra su aplicación general que aquí no comentaremos en especial. Los médicos y las autoridades sanitarias en Alemania siguen considerando como guía fundamental para sus actuaciones el concepto de que **“la tuberculosis es una enfermedad contagiosa, por consiguiente evitable y curable”**, y que es más económico prevenir a 10 individuos del contagio tuberculoso que tener que tratar a un enfermo tuberculoso.

En los años posteriores a 1945 adquirieron importancia en Alemania los modernos tratamientos antibióticos y quimioterapéuticos contra la tuberculosis, con esto se establecieron también los problemas que dieron origen a nuestras investigaciones. En la clínica se tratan por ejemplo niños con una meningitis tuberculosa por semanas y meses con estreptomina, lográndose con esto prolongarles la vida y a veces sanarlos. Sin embargo la clínica nos hacía las siguientes preguntas: “¿Cómo se puede determinar, si un tratamiento con estreptomina llevado por semanas y aún meses tiene realmente razón de ser? No se habrán hecho las bacterias tuberculosas ya resistentes a la estreptomina y no será en este caso el efecto nocivo de la estreptomina sobre el nervio acústico más dañino que el provecho deseado?” Esta pregunta no la podrá resolver el clínico solo, sino con la ayuda del bacteriólogo en conjunto con el patólogo. En muchos países se iniciaron por consiguiente investigaciones para la determinación de resistencia de las bacterias tuberculosas frente a la estreptomina, Pas y Conteben, para nombrar sólo algunos de los más importantes medicamentos antituberculosos modernos. En Septiembre 1951 se publicó por el COMITE CENTRAL ALEMÁN PARA LA LUCHA ANTITUBERCULOSA un boletín, que reúne los primeros resultados de determinación de resistencia y da algunas pautas para su aplicación práctica. En este boletín se recalca que las determinaciones de resistencia en relación a la terapéutica con los medicamentos nombrados sólo tiene valor

1. al iniciar un tratamiento,
2. al fallar uno de los tres medicamentos nombrados durante el tratamiento,
3. al persistir positivo el examen bacteriológico al final del tratamiento previsto,
4. al presentarse exacerbaciones tuberculosas después que el enfermo había sido tratado con alguno de los tres medicamentos.

Todos los métodos de determinación indicados en el boletín se refieren exclusivamente a determinaciones "in vitro". Después de cultivo de las bacterias tuberculosas obtenidas de las secreciones y líquidos de los enfermos, se juntan éstas con los diferentes medicamentos en medios de cultivo adecuados, considerándose en seguida la influencia del medicamento sobre el crecimiento de las bacterias en diferentes espacios de tiempo. Entre los métodos indicados tiene importancia el método del portaobjeto según **Pryce** por obtenerse con él resultados relativamente temperanos.

Debemos detener presente que el crecimiento de las bacterias tuberculosas "in vitro" no significa algo definitivo sobre su patogenia en el organismo vivo. De ahí que la inhibición de su desarrollo "in vitro" por estreptomycin, Pas y Conteben no nos revelara un cuadro exacto sobre su virulencia inhibida o patogenidad disminuída en el organismo vivo. La cepa B. C. G. de **Calmette** por ejemplo se desarrolla en los más variados medios de cultivo con la misma intensidad que cepas del tipo humano y bovino, también es inhibida "in vitro" por los medicamentos antituberculosos y tiene sin embargo sobre el hombre sólo una pequeña patogenidad. Por esto es de importancia para la clínica que en las determinaciones de resistencia se imiten en lo posible las condiciones naturales. Para esto nos parecía indispensable **que las bacterias tuberculosas entren en contacto con el medicamento en tejido vivo**. Como tejidos adecuados resultaron las membranas extraembrionarias del embrión de gallina en desarrollo.

Antes de comenzar con las determinaciones de resistencia en tejidos vivos propiamente dichas debíamos de estudiar en experimentos fundamentales las condiciones bajo las cuales se lograba obtener una tuberculosis en el huevo de gallina incubado. El método de inyección o vacunación de la membrana corioalantoidea del embrión de gallina en desarrollo, con gérmenes patógenos ha sido descrito por **Beveridge** y **Burnet** en forma magistral y detallada. Estos métodos fueron algo modificados para nuestro objeto, pero en principio no fueron alterados. No consideramos por consiguiente necesario describirlos en este lugar. En nuestros experimentos hemos utilizado diferentes cepas del micobacterio tuberculoso del tipo humano y bovino que se habían desarrollado durante tres semanas en medio de cultivo de **Petragnani** y cuya virulencia nos era suficientemente conocida. Experiencias previas habían demostrado que el momento óptimo para la infección del huevo era del 7º al 8º día de incubación. En las primeras series de experiencia se goteaba una cantidad constante de bacterias tuberculosas sobre la membrana corioalantoidea de huevos con 7 días de incubación. Estos huevos eran todos de un criadero puro de la raza **LEGHORN BLANCA**. Después de la infección se continuaban incubando sucesivamente abriéndolos en períodos de 24 horas, hasta el 21º día. En otras series de experiencias se utilizaban diluciones recientes de bacterias tuberculosas. En ellas se abrían y se examinaban todos los huevos al 10º día de su infección, o sea al 17º día de incubación. Para provocar en lo posi-

ble alteraciones masivas, inyectábamos huevos con grandes cantidades de bacterias (hasta 1 mg. de masa de cultivo) y los abríamos después de 11 días de infección. Por la disposición sucesiva de estas experiencias fué posible estudiar el desarrollo de la tuberculosis en la membrana corioalantoidea del huevo de gallina incubado en todas sus fases por espacio de 14 días. Todas las membranas fueron examinadas macroscópicamente y en seguida histológicamente después de su tratamiento y tinción correspondiente.

Comenzamos nuestros experimentos sin conocimiento de la literatura norteamericana que en aquel entonces era difícil de conseguir en Alemania. Sólo durante el desarrollo de nuestras experiencias nos fué posible leer los trabajos de los norteamericanos que concordaban en muchos aspectos con los resultados nuestros. Remitimos en especial a **Goodpasture y Anderson, Emmart y Smith, Fite y Olson, Eggert, Mc Nelly y Ridell, Hall y Spink, Shaffer y Spink** y finalmente a los franceses **Costil y Bloch**. En todos estos autores predomina el aspecto bacteriológico, siendo mencionado el aspecto patológico sólo en forma somera. Además de los resultados obtenidos por estos autores pudimos obtener nosotros un concepto fundamental de histiogénesis de la tuberculosis en la membrana corioalantoidea, de lo cual se dará cuenta en lo siguiente. Se evidenció que el huevo de gallina incubado no sólo era un excelente campo de experimentación para la investigación bacteriológica y de virus, sino que también representaba considerables ventajas sobre los animales de experimentación habituales para el estudio de problemas anátomo-patológicos.

Nos parece indispensable para la mejor comprensión de los fenómenos histopatológicos, comentar en forma resumida la anatomía normal de la membrana corioalantoidea. Esta membrana se compone de tres capas diferentes que dependen de las tres hojas germinativas. Se encuentra inmediatamente debajo de la cáscara, alrededor del embrión, y sirve, durante la mayor parte del período del desarrollo de 21 días, como órgano de respiración. Además tiene el alantoides la misión de captar los productos solubles del metabolismo. Los pulmones del embrión se encargan de la respiración sólo del 16º-18º día, a pesar de que su presencia ya se distingue desde el 3.er día de incubación. Después del 16º-18º día, al terminar su función comienza a resecarse la membrana corioalantoidea. En el cuadro histológico (fig. 1) se reconoce un epitelio ectodérmico externo compuesto de una hilera de células planas, poligonales a las cuales llegan numerosos capilares del mesoderma que en parte toman contacto con la membrana de la cáscara atravesando el ectoderma. Una capa mesodérmica mediana más ancha consiste de células sincicio-reticulares sueltas. El mesoderma es atravesado por numerosos vasos. Finalmente la capa interna de la membrana está tapizada por un epitelio entodérmico que se asemeja al epitelio ectodérmico, pero siendo algo más fino que éste. Hasta la fecha no se ha podido establecer, si esta membrana extraembrionaria del huevo incubado está provista de nervios. Así no fué posible a Lange, utilizando simultáneamente méto-



FIG. 1.—Corte transversal de la membrana corioalantoidea del embrión de gallina. Se reconoce el epitelio ecto- y entodermal y la capa media mesodermal con las células disueltas del retículo y numerosos vasos.

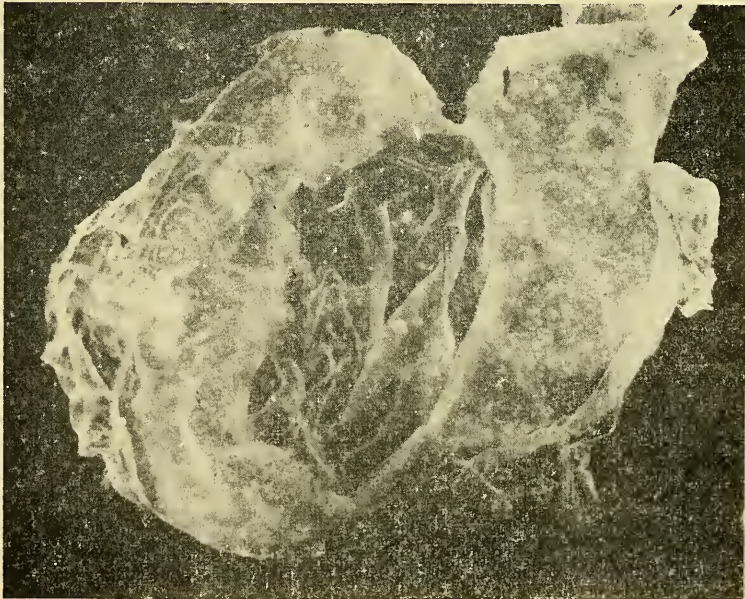


FIG. 2.—Extensa tuberculosis de inoculación de la membrana, 8 días después de la infección.

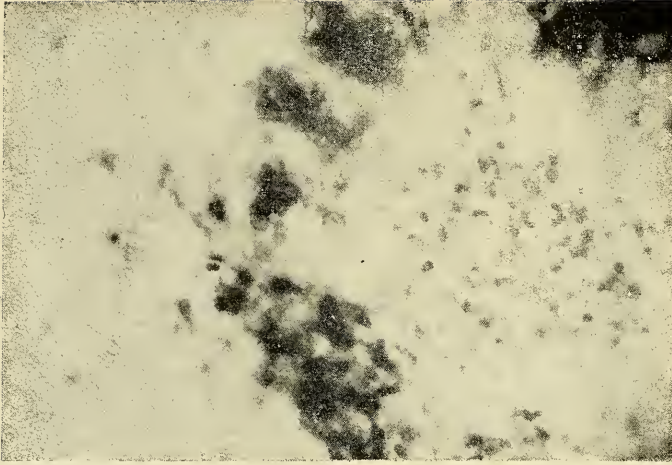


FIG. 3.—Tubérculo de inoculación muy reciente. En el centro se ve necrosis con restos de leucocitos, al lado izquierdo células gigantes de LANGHANS en formación.

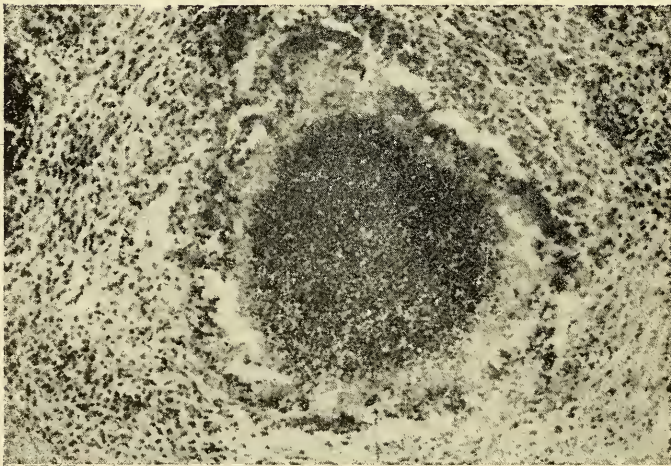


FIG. 4.—Tubérculo recién formado con típica forma de escarapela. Gran centro exudativo, valla de células gigantes y halo ancho de células epiteloideas.

dos morfológicos y fisiológicos, establecer inervación de esta membrana o de sus vasos. Este problema fundamental no se ha podido esclarecer hasta el día de hoy.

Su aclaración es sin embargo de gran importancia, porque el concepto de **Ricker**, aceptado por la mayoría de los patólogos, referente a los procesos inflamatorios, parte precisamente de la inervación de la circulación terminal. Si se lograra demostrar que la membrana corioalantoidea y sus vasos no presenta inervación, sería el material apropiado para el estudio de procesos inflamatorios en tejidos carentes de inervación. Se podrían revisar las teorías de **Ricker** y sobre todo considerar los discutidos trabajos y conceptos del ruso **Speransky** sobre el origen de las enfermedades infecciosas. **Speransky** coloca al sistema nervioso como punto céntrico de los fenómenos inflamatorios y de las enfermedades infecciosas, atribuyendo a los gérmenes patógenos sólo un papel secundario de indicadores. Este importante complejo de preguntas deberá ser sometido a futuras revisiones y es sin embargo de gran importancia teórica y práctica.

De la tuberculosis experimental en la membrana corioalantoidea se deducen a la observación macroscópica las siguientes consideraciones: 24 horas después de la infección se observa en el sitio de inoculación un tumor edematoso ligeramente turbio del tamaño de una moneda de 20 centavos. Los vasos sanguíneos circundantes están distendidos y repletos. A las 48 horas el edema se ha reducido, presenta opacidad difusa y ofrece en el centro un nodulito grisáceo mal delimitado. A los 3 días este cuadro se ha modificado poco. A los 4 días se observa en el sitio de inoculación un engrosamiento del tamaño de una lenteja, siendo poco reconocible el edema. Este engrosamiento es blanquecino, compacto y se extiende alrededor de los vasos. En la parte central ofrece varios nodulitos amarillentos del tamaño de una cabeza de alfiler. Los vasos aferentes y eferentes siguen distendidos. Cabe mencionar sin embargo que esas reacciones inflamatorias observadas macroscópicamente hasta el 4º día no son típicas para una tuberculosis de inoculación, por encontrarse también alteraciones parecidas en la inoculación con otros gérmenes y en la intervención de irritantes físicos y químicos (**Goulston y Mottram, Bieling y Heinlein** entre otros).

Después de 5 días ya se reconocen a simple vista alteraciones que hablan en favor de una tuberculosis. Así se observan en el sitio de inoculación, en una zona de 1 cm. de diámetro, múltiples nodulitos del tamaño de cabeza de alfiler y menores, que también se encuentran a más distancia, alrededor del trayecto de vasos mayores. Después de 6 días se observan estos nodulitos en una extensión mayor y después del 7º día comprometen casi toda la membrana. Al 8º día estos nodulitos aparecen más grandes (fig. 2). En el sitio de inoculación se encuentra un foco del tamaño de un grano de mijo, que al parecer se produjo por confluencia de diferentes tubérculos. 9 días después de la infección, o sea en total al 17º día de la incubación, se ha alcanzado el máximo del desarrollo. Las membranas examinadas en los días siguientes ofrecen pocas novedades. Esto es explicable ya que la membrana en este período ha perdido

su función y comienza a desecarse pudiendo esperarse pocas reacciones vitales en lo sucesivo. Este cuadro de conjunto descrito puede ofrecer grandes variaciones según la técnica de inyección y la cantidad de gérmenes empleados. Así pudimos reconocer ya al 3º día nítidos nodulitos diseminados.

De todas las membranas se hicieron cortes histológicos que fueron teñidos con H. E., Hematoxilina férrica, según el método combinado de elástica-van Gieson y según Ziehl-Neelsen. Además se realizaba siempre el examen microscópico-fluorescente cuando se utilizó la tinción con auramina. Este es un método indicado por **Finke** para reconocer bacterias tuberculosas en los cortes y ofrece mejores resultados que la tinción usual de Ziehl-Neelsen. La revisión de las investigaciones microscópicas ofrece el siguiente resultado esquemático: Al 1º día después de la infección el epitelio ectodérmico se encuentra notablemente proliferado y ensanchado en forma irregular. Las células están frecuentemente alargadas e hinchadas en forma vacuolas. Los núcleos, especialmente en las células superficiales, ofrecen picnosis, cariorexis y disolución de la membrana nuclear. Las capas basales del ectoderma proliferado ofrecen frecuentes mitosis como signo de una regeneración aumentada. Leucocitos han invadido el ectoderma y han fagocitado restos nucleares. En general aparece el ectoderma en el sitio afectado con infiltración edematosa, en la membrana misma todavía no se encuentran en este período bacterias tuberculosas. Se encuentran apelotonadas y formando redes sobre el ectoderma y en parte dentro de las células necróticas. Al 3º, 4º y 5º día el ectoderma se presenta más disuelto y proliferado en forma papilar y permite reconocer pequeñas ulceraciones. Ya se pueden observar en los sitios necróticos del ectoderma aisladas bacterias y micelios de bacterias que desde allí han penetrado al mesoderma. Al 5º día se sobrepasa la zona de inoculación produciéndose en este período las reacciones inflamatorias del mesoderma. El mesoderma se presenta con infiltración edematosa y muestra acúmulos focales de leucocitos. También se ha intensificado la movilización de las células regionales y comienza la formación de tubérculos. En el mesoderma hay grandes acúmulos de bacterias que permiten deducir una multiplicación muy rápida. Después del 6º día el ectoderma ha invadido al mesoderma en forma de las llamadas perlas epiteliales, una reacción que también se puede observar en otra clase de estímulos. Al 7º día se hace más visible el desarrollo de tubérculos. Un tubérculo maduro de 8 días de evolución está constituido esencialmente de una zona céntrica exudativa con abundantes leucocitos, que han fagocitado grandes cantidades de bacterias tuberculosas, pereciendo ellos mismos. Este centro exudativo está rodeado por una valla sincicial de células gigantes que pueden considerarse como típicas células gigantes de **Langhans** (fig. 3). Hacia fuera sigue una ancha zona circular de células reticulocitarias vegetantes, dispuestas en forma concéntrica, que son las precursoras de las células epiteloides (fig. 4). En las células gigantes y en las reticulocitarias también se encuentran bacterias y micelios fagocitados. Creemos que estos tubérculos

pueden madurar en corto tiempo y aún en pocas horas. Estos tubérculos que se han desarrollado en un tejido primitivo y simple, dan una visión de la histogénesis de la tuberculosis como difícilmente se encontrará en otra parte. Al 8º y 9º día aparecen aparte de los tubérculos exudativos pequeños nodulitos productivos, que en algunas ocasiones sólo consisten de células reticulocitarias proliferadas.

Para sacar provecho merecido de nuestros resultados, debemos mencionar brevemente algunas teorías y opiniones que se discuten actualmente sobre la histogénesis de la tuberculosis. A **Hübschmann** debemos la tesis ampliamente conocida de que cada tubérculo atraviesa primero por una fase exudativa como en cualquier otra inflamación, por lo menos bajo condiciones "normérgicas" del receptor, a la cual se agrega posteriormente una fase productiva. Una fase productiva primaria, sin inflamación exudativa precedente, es rechazada por **Hübschmann**. Las necrosis o caseificaciones del tubérculo se desarrollan ya en la primera fase exudativa y no por fusión de tejido tuberculoso productivo. En oposición a esto supone **Domagk**, basándose en sus experiencias en animales, que pueden formarse tubérculos productivos sin fase exudativa precedente y que se desarrollan de ellos necrosis y caseificaciones secundarias. A nuestro modo de ver se puede examinar experimentalmente la concepción de **Hübschmann**, que nosotros consideramos acertada, en un organismo que todavía reacciona en forma "normérgica" como por ejemplo el embrión de gallina en desarrollo. Como la membrana corioalantoídea del huevo incubado ofrece una constitución muy simple, representa el tejido apropiado para esta clase de experimentos. En cambio en el organismo postembrional, por la variación de sus fases alérgicas, no siempre se puede reconstruir el desarrollo cronológico de la inflamación tuberculosa.

En este último tiempo se ha vuelto a discutir el origen de las células epitelioideas y de las células gigantes de **Langhans**. Según **Fresen** se originan estas células en el sistema "retotelial", que se encuentra todavía por todas partes en el mesénquima del organismo desarrollado. Las células del mesoderma de la membrana corioalantoídea presentan justamente un tejido sincicial poco diferenciado, muy parecido al sistema "retotelial" de **Fresen**, que permite estudiar la génesis formal de las células específicas del tubérculo en esta membrana.

De nuestras experiencias se deduce, que las bacterias tuberculosas necesitan varios días para llegar al mesoderma de la membrana corioalantoídea. Más o menos al 3º día después de la infección han penetrado al mesoderma en el sitio de inoculación, extendiéndose rápidamente en los días siguientes sobre toda la membrana. Por formar las micobacterias tuberculosas densas redes de bacterias que representan un centro de irritación concentrado, se producen alrededor de este centro las primeras reacciones inflamatorias del mesénquima. Se demuestra claramente, que estas reacciones representan realmente una inflamación exudativa con todos los estados, que fueron descritos por **Ricker** en la inflamación de tejidos invadidos. A esta

inflamación exudativa sigue un crecimiento productivo de las células locales. Este orden cronológico está en relación con la constitución del tubérculo en el espacio. Este crecimiento en el espacio es a su vez una imagen de la irritación disminuyente hacia la periferia del tubérculo. Resalta especialmente que las células gigantes de **Langhans** siguen en el espacio y en el tiempo a la exudación, formando una valla protectora alrededor del centro exudativo. Sólo después y por fuera se forman las células epiteloides. El tubérculo obtenido experimentalmente en el huevo de gallina incubado muestra pues una manifiesta forma de escarapela, de la cual es fácil deducir su génesis formal. Los diferentes estados de su génesis no se desarrollan en forma pareja y continua, sino más bien en púses o períodos diferentes. El ataque bacterial más intenso es detenido por la inflamación exudativa, siendo limitado en seguida el foco de agresión por las células gigantes, para ser limpiado finalmente por el tejido de granulación constituido por células epiteloides. La compenetración del tubérculo exudativo por células epiteloides no se deja representar bien en la membrana corioalantoidea por el tiempo limitado de observación. La conocemos sin embargo suficientemente de los tubérculos del organismo humano. Tubérculos preferentemente productivos, que siguen en la membrana, indican que el embrión ha evolucionado en su estado alérgico y que la diferencia entre agresión y defensa ha disminuído a su favor. Por lo demás se puede reconocer claramente, que tanto las células gigantes como las células epiteloides se forman de las células reticulares del mesoderma. Creemos haber confirmado con esto las enseñanzas de **Hübschmann** y los conceptos de **Fresen** sobre el origen de los elementos celulares productivos.

Después de haber obtenido una visión clara sobre la tuberculosis experimental en el huevo de gallina incubado por las experiencias citadas, pasamos a aprovechar nuestros conocimientos en la práctica. Primero se ensayó de ampliar el método para el diagnóstico de enfermedad en aquellos casos, en los cuales falló la determinación bacterioscópica directa y en los cuales se hacía necesario recurrir a cultivos e inoculaciones en animales, que demoraban algún tiempo. Al resultar el cultivo de bacterias tuberculosas del material sospechoso sobre la membrana corioalantoidea se habría acertado mucho la determinación experimental en animales que demora unos dos meses. Sin embargo todos nuestros experimentos en este sentido no obtuvieron éxito. El material investigado en estos casos (líquido cefaloraquídeo, jugo gástrico, etc.), contiene generalmente tan pocas bacterias tuberculosas, que no se produjo una tuberculosis visible en el huevo de gallina en un tiempo de desarrollo tan relativamente corto, siendo en estos casos la investigación clásica en animales como el **hoy** por hoy indudablemente superior, pero siguen adelante nuestros experimentos.

Finalmente decidimos probar nuestro método para la determinación de resistencia de bacterias tuberculosas frente a los antibióticos y a la quimioterapia moderna. Las reflexiones que nos indujeron a realizar esto, ya fueron menciona-

das anteriormente. Pronto se demostró que la determinación de resistencia según nuestro método "in vivo" daba muy buenos resultados, aun superiores a los otros métodos "in vitro". Permítasenos por consiguiente informar finalmente, sin perdernos en detalles, sobre nuestras experiencias para la determinación de resistencia frente a la estreptomycinina. Utilizamos varias cepas de bacterias tuberculosas conocidas y las goteábamos, en la forma ya expuesta, sobre la membrana corioalantoídea, en cantidad suficiente para producir una tuberculosis de inoculación. En las primeras series de experimentos se administraba simultáneamente con la infección una dosis constante y única de estreptomycinina. Los huevos se abrieron y se examinaron en intervalos de 24 horas de incubación. Se demostró que la estreptomycinina inhibía la tuberculosis por inoculación, pero no causaba la muerte de todas las bacterias tuberculosas. Siempre quedaba una suficiente cantidad de bacterias vivas, para producir una típica tuberculosis de inoculación en el cuy. En otras series se administraban dosis constantes de estreptomycinina al huevo en intervalos de 24 horas hasta el 7º día después de la infección. Se deseaba determinar con esto, hasta cuantos días después de la infección la administración de la estreptomycinina era capaz de inhibir el desarrollo de la tuberculosis. Se obtuvo el siguiente resultado: la estreptomycinina suministrado 4 días después de la infección, y a veces más, no era capaz de inhibir la tuberculosis por inoculación de la membrana corioalantoídea. Finalmente se realizaron otras series de experimentos para determinar la menor dosis de estreptomycinina capaz de impedir el desarrollo de una tuberculosis por inoculación en el huevo de gallina de 7 días de incubación. Se obtuvo una inhibición franca en estos experimentos, con la administración de 10 γ del medicamento. Dosis menores ya no eran efectivas. Mayores detalles sobre estos experimentos se pueden obtener de los trabajos ya publicados en conjunto con **Klose y Knothe**. Este método se sigue revisando y perfeccionando actualmente. Su ventaja podría ser la rápida determinación de resistencia de bacterias tuberculosas, ya que se pueden obtener resultados aprovechables a los 8^o ó 9 días. Es de esperar que pronto se pueda aprovechar este método en el trabajo rutinario diario, como ayuda al clínico y para bien de los enfermos tuberculosos.

RESUMEN

Previa algunas observaciones sobre el estado de la tuberculosis en Alemania después de la segunda guerra mundial, se considera la determinación de resistencia de bacterias tuberculosas frente a los nuevos antibióticos y quimioterapéuticos. Se recalca, que todos los "tests" actualmente en uso son "in vitro", que demoran mucho y no corresponden a las condiciones vitales en el individuo enfermo. Se describen en seguida los experimentos que se realizaron para obtener un test "in vivo". Este tejido vivo es la membrana corioalantoídea del embrión de gallina en desarrollo. Después de exponer la anatomo-

mía, histología y fisiología normal de la membrana, se comunican los resultados macroscópicos y microscópicos de la tuberculosis experimental en ella y se discuten en forma crítica. Se confirma, que en principio cada tubérculo comienza con una fase exudativa, a la cual se agrega secundariamente la fase productiva. Las necrosis se desarrollan siempre a partir de la primera fase exudativa. Los elementos tisulares específicos del tubérculo productivo, a saber las células epiteloideas y las células gigantes de **Langhans** se originan de las células reticulocitarias mesodermales de la membrana. Están unidas entre sí por un retículo y tienen la propiedad de fagocitar bacterias tuberculosas, siendo al parecer el sitio de formación de anticuerpos. El tubérculo experimental en el huevo de gallina incubado muestra una forma clásica de escarapela con necrosis central, valla de células gigantes y halo de células epiteloideas, dejándose determinar su génesis causal y formal mejor que en cualquier otro animal de experimentación o en el hombre. Finalmente se da una visión de los diferentes experimentos realizados para la determinación de la estreptomycin-resistencia en la membrana corioalantoidea del huevo de gallina incubado.

SUMMARY

After some introductory observations on TB in Germany after World War II, determinations of resistance of TB bacteria to the new antibiotics and chemotherapeutics are taken in consideration. It is pointed out that all tests in use at the present time are in vitro tests, that these are of too long duration and do not correspond to the actual vital conditions in diseased individuals. Descriptions are given on experiments of an in vivo test, realized in living tissues (chorio-allantoid membrane of developing chicken embryos). After exposing the normal anatomy, histology and physiology of this membrane, macroscopical and microscopical findings of experimental TB in it are communicated and critically discussed, confirming the fact that every tubercle starts in principle from an exudative phase, which is followed secondarily by a productive phase. Necrosis always has its origin in the first phase. The specific tissular elements of the productive tubercles-epitheloid and giant Langhans' cells- derive from reticulo-mesodermal cells of the membrane. They are connected reticularly, are able to phagocytize tuberculous bacteria and apparently are the site of antibody formation. The experimental tubercle in incubated hen-eggs has the classic cockade shape,-central necrosis, giant cells and marginal epithelioid cells- and allows to determinate its causal and formal genesis much better than in any other experimental animal or in man.-Finally a revision of different fundamental experiments performed in order to determinate streptomycin resistance of TB bacteria in the chorio-allantoid membrane is given.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach einleitenden Bemerkungen über den Stand der Tuberkulose in Deutschland nach dem 2. Weltkriege, wird auf die Resistenzbestimmungen von Tuberkelbakterien gegenüber den neuen Antibiotica und Chemotherapeutica eingegangen. Es wird darauf hingewiesen, dass alle bis heute angewandten Teste nur "in vitro" Teste sind, dass sie zu lange andauern und den vitalen Bedingungen im kranken Individuum nicht entsprechen. Es werden dann die Versuche beschrieben, die zur Ausarbeitung eines "in vivo" Testes am lebenden Gewebe unternommen worden sind. Dieses lebende Gewebe ist die Chorio-Allantois-Membran des sich entwickelnden Hühnerembryos. Nach Darstellung der normalen Anatomie, Histologie und Physiologie dieser Membran, werden die makroskopischen und mikroskopischen Befunde der experimentellen Tuberkulose in ihr mitgeteilt und kritisch besprochen. Es wird bestätigt, dass jeder Tuberkel im Prinzip mit einer exsudativen Phase beginnt, an die sich sekundär die produktive Phase anschliesst. Nekrosen entwickeln sich immer aus der ersten exsudativen Phase heraus. Die spezifischen Gewebelemente des produktiven Tuberkels, die Epitheloidzellen und die LANGHANSschen Riesenzellen entstammen den mesodermalen Reticulumzellen der Membran. Sie sind reticulär miteinander verbunden, besitzen die Fähigkeit, Tuberkelbakterien zu phagozytieren und sind offenbar auch der Ort der Antikörperbildung. Der experimentelle Tuberkel im bebrüteten Hühnerei zeigt eine klassische Kokardenform,- zentrale Nekrose, Riesenzellwall, epitheloidzelliger Saum - aus der sich seine causale und formale Genese besser als bei jedem anderen Versuchstier oder beim Menschen ablesen lässt. -Zum Schluss wird ein Überblick über die verschiedenen Grundversuche zur Resistenzbestimmung von Tuberkelbakterien gegenüber Streptomycin innerhalb der Chorio-Allantois-Membran gegeben.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—BEVERIDGE and BURNET.—The cultivation of viruses and rickettsiae in the chick embryo. London: Medical Research Council, Ser. N° 256. 1946.
- 2.—BIELING und HEINLEIN.—"Die Grippe". Verlag J. A. Barth, Leipzig, 1949.
- 3.—COSTIL et BLOCH.—C. r. Soc. Biol. Paris 128, 40 (1938).
- 4.—Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose.—Vorläufiges Merkblatt über Resistenz von Tb. Bakt. gegenüber Streptomycin, PAS und Conteben, September 1951.
- 5.—DOMAGK.—Klin. Wschr. 1951, 139.
- 6.—EGGERTH, DRESHER and MC OSKAR.—Amer. Rev. Tbc. 57, 632 (1948).

- 7.—EMMART and SMITH.—Publ. Health Rep. Washington 56, 1277 (1941).
 - 8.—FRESEN.—Virchows Arch. 317, 491, 517 (1950). Beitr. Klin. Tbk. 103, 47 (1950).
 - 9.—FINKE.—Arch Hyg. u. Bakter. 123, 381 (1947).
 - 10.—FITE and OLSON.—Publ. Health Rep. Washington 59, 1423 (1944).
 - 11.—GOODPASTURE and ANDERSON.—Amer. J. Path. 13, 149 (1937).
 - 12.—GOULSTON and MOTTRAM.—Brit. J. exp. Path. 13, 175 (1932).
 - 13.—HALL and SPINK.—J. of Immun. 59, 379 (1948).
 - 14.—HÜBSCHMANN.—Pathologische Anatomie der Tuberkulose. Berlin; Springer 1928.
Die Histogenese der Tuberkulose im Rahmen der allgemeinen Krankheitslehre. Stuttgart; Georg Thieme 1947.
 - 15.—KLOSE, KNOTHE, SCHÜRMAN.—Arztl. Wschr. 1951, 381.
Arztl. Wschr. 1952, 102.
 - 16.—LANGE.—Según Beveridge and Burnet.
 - 17.—MC NELLY and RIDELL.—Amer. J. of Publ. Health 39, 1463 (1949).
 - 18.—PRYCE.—Brit. J. of Path. 53, 327 (1941).
 - 19.—RICKER.—Pathologie als Naturwissenschaft. Relationspathologie. Berlin: Springer 1924.
 - 20.—SCHÜRMAN.—Virchows Arch. 321, 395 (1952).
 - 21.—SHAFER and SPINK.—J. of Immun. 59, 393 (1948).
 - 22.—SPERANSKY, traducido en alemán por K. R. von Roques.—Grundlagen der Theorie der Medizin-Verlag Dr. Werner Saenger, Berlín, 1950.
-