

LA SIEMBRA DEL *M. LEPRAE* EN EL SACO DE LA YEMA DEL EMBRION DE POLLO EN DESARROLLO¹

JUAN EMBIL, JR., M. A. GONZÁLEZ PRENDES

Y EL PROF. A. CURBELO Y HERNÁNDEZ

Cátedra de Bacteriología

Escuela de Medicina de la Habana

La facilidad con que algunas bacterias, virus y rickettsias crecen en el saco de la yema del embrión de pollo (3) y basándonos particularmente en los trabajos más recientes referentes al *Mycobacterium tuberculosis* (2) que encuentra en este substratum los elementos necesarios para una rápida multiplicación (4), decidimos utilizarlos en un nuevo intento de obtención de cultivos del *M. leprae*, ensayo en el que en varias ocasiones y utilizando diversos medios de cultivo, ya habíamos fracasado (6). Aunque a nuestro juicio este constituye un fracaso más, nos ha parecido útil la publicación de los protocolos, por lo laborioso del esfuerzo y para contribuir en algo a este difícil y no resuelto problema bacteriológico. Fué nuestro propósito inicial, proceder del modo más original posible, utilizando la técnica de Beveridge y Burnet (1) para sembrar nuestros concentrados de *M. leprae*, procedentes de lepromas de enfermos no previamente tratados por droga alguna.

METODOLOGÍA

Fuentes de obtención de bacilos.—Según nuestro criterio, las mayores probabilidades de éxito favorable en este caso, radicaban en la mayor cantidad de bacilos que pudieran ser sembrados en el medio elegido, procedentes de lepromas, pero procediendo también de otros elementos (linfa y sangre) como factores secundarios, también importantes, ya que algunos investigadores señalan ciclos evolutivos en los bacilos, en los cuales estos pueden hacerse cultivables. Así decidimos practicar siembras a partir de a) leproma, (b) linfa y c) sangre, para lo cual fué elegido un enfermo lepromatoso, no tratado y en plena reacción leprótica.

Muestras obtenidas.—La rigurosidad aséptica en la obtención de las muestras, fué llevada al límite, procediéndose de modo tal, que los cultivos de control de la manipulación (aerobios y anaerobios) resultaron estériles. Para las siembras en embrión de pollo esto es rigurosamente exigible, ya que los contaminantes invalidan todo posible éxito en el trabajo. La recolección de material fué verificada a las 10 a.m., y este mantenido en sus frascos estériles hasta las 2 p.m.

Examen microscópico.—El leproma fué desmenuzado en trozos muy pequeños en mortero estéril, lavado con solución salina fisiológica (con Penicilina, 1,000 U. por cc.) y examinado, demostrando una enorme cantidad de bacilos. La linfa fué simplemente extendida en láminas a partir de los capilares, advirtiéndose el mismo resultado, tanto al Ziehl-Neelsen como a la Auramina. La sangre no fué examinada al microscopio.

PRIMER ENSAYO

Se utilizaron 12 huevos de 5 días de incubación, procediéndose a la inyección en el saco de la yema, de acuerdo con la técnica ya señalada (1)

¹ Trabajo llevado a cabo en la Sección Experimental de la Cátedra de Bacteriología de la Escuela de Medicina de la Universidad de la Habana.

y en la investigación de los bacilos ácido-resistentes se utilizó la técnica de concentración de Brueck y Budding (2) y las coloraciones de Ziehl y Auramina. Tanto las técnicas de concentración como de coloración resultaron buenas en el sentido de ofrecer claras imágenes al microscopio. Cuatro tubos fueron sembrados con cantidades variables de bacilo de Koch muy virulento como un control.

CUADRO 1.—Resultados del primer ensayo.

Huevo	Origen	Evolución	Resultado
1	Leproma 0.2 cc.	Muerto, 48 horas	Negativo
2	Leproma 0.2 cc.	Muerto, 48 horas	Negativo
3	Leproma 0.2 cc.	Muerto, 96 horas	Positivo; algunos bacilos y globi
4	Leproma 0.5 cc.	Muerto, 48 horas	Negativo
5	Leproma 0.5 cc.	Vivo, 6 días	Positivo; algunos bacilos
6	Plasma, 0.2 cc.	Muerto, 48 horas	Negativo
7	Hematías 0.2 cc.	(No fertil)	-----
8	Linfá 0.1 cc.	Muerto, 48 horas	Negativo
9	Control 0.2 cc.	Vivo, 96 horas	Positivo; algunos bacilos
10	Control 0.3 cc.	(No fertil)	-----
11	Control 0.4 cc.	Vivo, 6 días	Positivo
12	Control 0.5 cc.	Vivo, 4 días	Positivo; numerosos bacilos

Este primer ensayo, orientador, tuvo por objeto el observar el desarrollo general de la técnica aplicada y su desenvolvimiento nos permite reconocer que: *a)* fueron efectivas las precauciones asépticas; *b)* que el *M. tuberculosis*, sembrado como control, parece multiplicarse en el medio, y las suspensiones tanto del examen directo del material de la yema como el de la concentración, permite ver fácilmente el bacilo; y *c)* que no parece ocurrir aumento en el número de ácidosistente en los casos de *M. leprae*.

SEGUNDO ENSAYO

En las condiciones siguientes: *a)* partiendo solamente de material de leproma, que muestra 4.5 bacilos por campo; *b)* utilizando el mismo enfermo y las mismas técnicas; y con *c)* 25 huevos de 5 días de incubados. *d)* 3 huevos recibieron 0.3 cc. colución salina como un control.

En 9 de los huevos el embrión murió entre el 2° y 7° día y no fueron examinados microscópicamente. Los 3 controls salinos fueron estériles. Los resultados en los otros huevos aparecen en Cuadro 2.

Este ensayo, cuyo resultado general se puede comprender con su sola observación, si bien no es muy estimulante, tampoco niega en absoluto las

posibilidades de multiplicación, pues no es de dudar que, en un cambio de ambiente tan brusco, como sucede con los virus, la adaptación requiere un número de pases, inclusive "a la ciega," hasta llegar a obtener un

CUADRO 2.—Resultados del segundo ensayo.

Huevo	Cantidad	Evolución	Resultado
7	0.5 cc.	Vivo 5° día	Negativo
10	0.5 cc.	Vivo 5° día	Negativo
12	0.3 cc.	Vivo 5° día	Positivo ^a
13	0.3 cc.	Muerto 7° día	Negativo
14	0.3 cc.	Muerto 7° día	Negativo
15	0.3 cc.	Vivo 5° día	Negativo
19	0.2 cc.	Vivo 7° día	Positivo ^b
22	0.1 cc.	Vivo 7° día	Negativo
23	0.1 cc.	Vivo 11° día	Positivo; escasos bacilos
24	0.1 cc.	Vivo 11° día	Positivo
20	0.2 cc.	A termino	} Pollo normal a los 12 meses
21	0.2 cc.	A termino	

^a Ziehl, 2+; auramina, 2+; siembras, negativas.

^b Ziehl, dudosa; auramina, 2+; concentración, 2+; siembras, negativas.

verdadero crecimiento. Así, en este caso, eliminado los controles, quedan inoculados de modo efectivo 19 huevos, en los cuales advertimos que la dosis de 0.5 cc. es manifiestamente comprometedor de la vitalidad del animal y que, en las dosis menores, solamente en 3 casos se observan, tras minuciosa búsqueda, algunos bacilos ácido-resistentes, sin poder tener la evidencia de posible multiplicación, sino más bien la presunción de que se tratasen de los mismos bacilos que fueron inoculados.

Existiendo bacilos en el material del huevo No. 19, se procede, partiendo de la yema del mismo a practicar un:

TERCER ENSAYO

En el cual: a) se inoculan 12 huevos de 7 días de incubación con b) cantidades variables de una mezcla de: yema, 2 cc., sol salina, 10 cc., y Penicilina 60,000 U, 3 cc.

Este ensayo es demostrativo de que la cantidad de material inoculado, desde luego, en relación con su posible toxicidad, influye en la vitalidad del embrión, la cual es esencial para el éxito favorable con 0.2 cc. del "inoculum."

En cuanto a la posible multiplicación del *Mycobacterium*, el problema

viene a quedar igual, ya que al advertir positividad en los huevos Nos. 8, 9, 10 y 11, han sido así señalados porque, de modo efectivo, se observaron formas bacilares y gránulos ácido-resistentes en el material, aunque no en cantidad suficiente para hacer pensar que habían aumentado sobre el "inoculum" original. Un resultado irregular y paradójico lo ofrece el huevo No. 3, el cual, inoculado con mayor cantidad (0.3 cc.) no demuestra forma bacteriana alguna.

CUADRO 3.—Resultados del tercer ensayo.

Huevo	Cantidad	Evolución	Resultado
3	0.3 cc.	Vivo 9 días	Negativo
8	0.2 cc.	Vivo 5 días	Positivo; escasos bacilos
9	0.2 cc.	Vivo 9 días	Positivo; escasos bacilos al directo; numerosos a la concentración
10	0.2 cc.	Vivo 10 días	Positivo; escasos bacilos
11	0.2 cc.	Vivo 11 días	Positivo; muy escasos bacilos

Por estas consideraciones, procedemos con el material del huevo No. 9, de este ensayo a practicar un:

CUARTO ENSAYO

En el que: *a*) se inyecta una mezcla análoga al ensayo anterior; *b*) 12 huevos de 7 días de incubación y; *c*) usando en todas cantidades de 0.2 cc., con dos controles de solución salina.

Seis de los embriones murieron entre el 3° y 10° día y no fueron examinados. Dos controles examinados el 11° y 15° días fueron normales. Un embrión viviente examinado en el 5° día fué negativo, mientras un otro embrión examinado en el 11° día fué positivo, con escasos bacilos, y cultivos negativos.

Este resultado va diafanizando algo el panorama de la experiencia en general, en sentido negativo, y se sigue a un:

Quinto ensayo.—En las condiciones siguientes: *a*) se procede a hacer mezcla con material del huevo No. 5 (positivo) usándose 0.2 cc. del mismo como en el ensayo anterior; *b*) inoculando 12 huevos de 4 días de inoculados; y *c*) usando como control, material de huevo No. 12 (4° ensayo) en los Nos. 10, 11 y 12.

Este ensayo produce un resultado que obliga a continuar el experimento, ya que, los controles permanecen vivos y normales, pero los huevos No. 5 (vivo al 12° día) y No. 8 (vivo al 15° día) muestran formas bacilares en cantidad suficiente para poder hacer pensar en su posible multiplicación. Así, con el material procedente del huevo No. 8, se reproduce esta experiencia en un:

Sexto ensayo.—En el cual, de 9 huevos inoculados con material efectivo, se advierten solamente granulaciones en tres huevos, los cuales son considerados negativos a los efectos del diagnóstico de *M. leprae*.

Y para terminar, con el huevo No. 5 de esta serie, que era el que más granulaciones tenía, se procede al:

Septimo ensayo.—Que, verificado en idénticas condiciones al anterior, no permite ver ya sino muy escasas granulaciones en algunos huevos, los cuales son considerados negativos a los efectos del diagnóstico de *M. leprae*.

CONSIDERACIONES

A lo largo de todos los ensayos, mantuvimos una regularidad y uniformidad metodológica tan rígida, que hicieron la experiencia muy segura en sus resultados, llevando a nuestro ánimo que los bacilos que aparecieron en la serie, a partir del segundo ensayo, correspondían a los que habían sido originalmente inoculados, fenómeno que se mostró muy distinto, cuando en el primero usamos *M. tuberculosis* como control. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Hanks (5), del Leonard Wood Memorial.

RESÚMEN

1) Hemos inoculado gran cantidad de bacilos de Hansen procedentes de lesiones lepromatosas, en el saco de la yema de huevos embrionados en distintos estados de incubación.

2) Hemos examinado los huevos, en intervalos, en búsqueda de bacilos ácidosresistentes (eliminando las posibilidades de *M. avium*).

3) Hemos hecho hasta 6 pases, en un caso, pudiendo considerar que el *M. leprae*, a nuestro juicio, no encuentra, en el saco de la yema del embrión de pollo, un ambiente favorable a su multiplicación.

4) Que a pesar de este resultado adverso aquí anotado, pensamos seguir estas investigaciones sobre las bases del mismo principio, con otro método de inoculación, los cuales publicaremos en el futuro.

SUMMARY

We have inoculated large numbers of Hansen bacilli from lepromatous lesions into the yolk sac of chick embryos at different stages of incubation, and have examined the eggs at intervals in a search for acid-fast bacilli (eliminating the possibilities of *M. avium*). Egg-to-egg transfers have also been made, as many as six in one case.

The results have led us to the conclusion that *M. leprae* does not find an environment favorable for its multiplication in the yolk sac of the chick embryo.

In spite of the negative results here recorded, we plan to continue the investigation on the basis of the same principle, but with another method of inoculation.

Los autores desean expresar su agradecimiento al Profesor Vicente Pardo Castelló por su efectiva orientación y oportuno apoyo técnico. Queremos dejar consignados nuestro agradecimiento al Dr. A. Azel, cirujano del servicio del Hospital "San Lázaro," por su ayuda.

BIBLIOGRAFÍA

1. BEVERIDGE, W. I. B. and BURNET, F. M. The cultivation of viruses and rickettsiae in the chick embryo. Medical Research Council, Spec. Rep. Series (London), No. 256, 1946.
2. BRUECK, J. W. and BUDDINGH, G. J. Isolation of *M. tuberculosis* by inoculation of the yolk sac of embryonated eggs. Prof. Soc. Exper. Biol. & Med. **80** (1952) 589-591.
3. COX, H. R. Use of yolk sac of developing chick embryo as medium for growing rickettsiae of Rocky Mountain spotted fever and typhus groups. Publ. Hlth. Rep. **53** (1938) 2241-2247.
4. DUBOS, R. T., DAVIS, B. D., MIDDLEBROOK, G. and PIERCE, C. The effect of water soluble lipids on the growth and biological properties of tubercle bacilli. American Rev. Tuberc. **54** (1946) 204-212.
5. HANKS, J. H. Attempts to infect chick embryo and chick tissue cultures with bacilli from human lepromatous lesions. Internat. J. Leprosy **15** (1947) 70-77.
6. MARQUEZ, R. y CURBELO, A. Departamento de Investigaciones, Sección Experimental, Cátedra de Bacteriología, Escuela de Medicina de la Habana. (Datos sin publicar.)