

Vacuna antidiftérica

SU ESTUDIO EXPERIMENTAL

Por A. SORDELLI, E. SAVINO y J. FERRARI

El Instituto Bacteriológico (D. N. de H.), se ha dedicado al estudio y adaptación de los mejores procedimientos técnicos de preparación de la vacuna antidiftérica, procurando satisfacer así las exigencias de la vacunación contra la difteria en la R. Argentina; práctica médica que, iniciada desde muchos años atrás (ELIZALDE, BACHMANN, DESTEFANO, etc.), ha cobrado impulsos de real significación higiénica entre nosotros, sólo en el último lustro, esto es con la campaña intensiva efectuada por la Asistencia Pública de la Capital Federal. (1)

Los progresos alcanzados en la vacunación antidiftérica se deben exclusivamente al mejoramiento del agente en ella empleado y, por lo tanto, para realizar una campaña de vacunación es de importancia esencial la preparación de una buena vacuna.

En esta comunicación trataremos precisamente de este problema de orden técnico, que puede enunciarse del modo siguiente:

La vacuna antidiftérica debe: 1°. poseer un gran poder inmunizante, por su especial aplicación a personas sensibles, sin antitoxina circulante, en las cuales la inmunidad se produce difícilmente: 2°. carecer de capacidad alergénica, pues el hombre está dotado de sensibilidad alérgica para los productos del *C. diphtheriae*: 3°. ser inocua, esto es esté-

(1) La Dirección de la Asistencia Pública (Dr. Roberto Acosta) designó, en 1931, una comisión presidida por el Dr. Cibils Aguirre, con el objeto de implantar la vacunación antidiftérica en la ciudad de Buenos Aires. Dicha Comisión redactó un informe con las normas necesarias para cumplir ese propósito y dió principio a su ejecución.

ril y desprovista de toxicidad; fácilmente administrable; de buena conservación y bajo costo.

Solo con la visión conjunta de estos tres términos es posible intentar la solución del problema.

Ahora bien, el uso del toxoide (anatoxina) ha sido tan afortunado y sus éxitos tan evidentes que todos los investigadores han limitado sus actividades a la mejora de la calidad de este producto.

El problema planteado por la preparación de la vacuna antidiftérica ha quedado pues, por esta circunstancia, reducido a la obtención de un toxoide (anatoxina) antigénicamente muy activo; con capacidad alergénica mínima; atóxico; estéril y de fácil aplicación, buena conservación y bajo costo.

Los antecedentes registrados en la literatura científica son tan numerosos, variados y contradictorios, que su estudio y crítica nos alejarían mucho de la finalidad de esta comunicación. Por tanto citaremos únicamente aquellos trabajos que, por la importancia de sus conclusiones, inciden de manera directa sobre el asunto que tratamos o constituyen antecedentes de prioridad. Aunque todos sabemos que es a RAMON, a quien se debe la difusión del excelente medicamento, no es supérfluo recordarlo; rindiendo así justo homenaje de gratitud al distinguido investigador francés.

I. — OBTENCION DE LA TOXINA

La fabricación de sueros antidiftéricos de alto valor, ha sido regida por la idea del empleo de toxinas muy activas y ésta primaria preocupación de todos los técnicos que trabajan en la producción de sueros, ha conducido de por sí, independientemente de la vacunación humana, a un considerable enriquecimiento de la toxina diftérica. En efecto, si en 1913, año en el que BEHRING preparó la vacuna antidiftérica, era raro obtener toxinas cuyo valor excediera de 5 L₊ y, en 1921, nosotros considerábamos como un hecho excepcional la elaboración de toxinas de 12 L₊, ya POPE (1932) las prepara regularmente con 50 L₊ por c³.

Base principal de este gran adelanto ha sido la introducción de sustancias economizadoras del consumo protéico, glucosa (THEOBALD SMITH, 1899) o acetato de sodio (POPE, 1932), en la composición de los medios nutritivos.

El empleo universal de un solo medio de cultivo está impedido por la diversidad de las condiciones locales y de la materia prima, factores de significado biológico preponderante, difícilmente determinables. Convencimiento éste que surge apenas se haya intentado preparar

toxina diftérica por cualquiera de las muchísimas recetas conocidas y que justifica plenamente el uso en cada región o país de caldos preparados con fórmulas propias.

En general, nosotros no nos hemos apartado de los principios clásicos y, desde muchos años, empleamos el mismo caldo que, modificado en algunos detalles, ahora usamos para preparar la toxina diftérica. (Ver técnicas).

La siembra de una cepa apropiada (Park Williams n.º 8), de buen poder toxigénico, da un máximo de actividad tóxica en un tiempo y a una temperatura convenientes. (Ver técnicas). Paralelamente a esta toxicidad crece también la capacidad de combinación de la toxina y esta magnitud, que puede ser determinada en corto tiempo por el fenómeno de RAMON (floculación), es un índice de la actividad antigénica de la toxina.

Los resultados son lo suficientemente constantes para que su técnica de obtención se haya incorporado a la rutina fabril, según lo prueban los protocolos de la Sección Toxinas (Dr. R. QUIROGA y M. ARZENO CARRANZA); de donde proceden los datos siguientes:

1933			1934			1935		
Lf	N.º	Litros	Lf	N.º	Litros	Lf	N.º	Litros
0.04	1	30	0.04	—	—	0.04	—	—
0.05	8	250	0.05	13	400	0.05	27	800
0.06	21	700	0.06	17	600	0.06	15	450
0.07	1	15	0.07	7	200	0.07	2	45
+ de 0.07	1	48	+ de 0.07	2	60	+ de 0.07	—	—

II. — TRANSFORMACION DE LA TOXINA EN TOXOIDE

GLENNY y SÜDMERSEN (1921), RAMON (1923) y GLENNY y HOPKINS (1923, demostraron que la toxina diftérica pierde su toxicidad por la acción del formol, pero conserva sus propiedades antigénicas y su capacidad de combinación con la antitoxina. El método de floculación de RAMON (1922) pone de manifiesto esta última propiedad en forma admirable y debe ser considerado como el guía de todas las operaciones de la preparación de la vacuna antidiftérica.

Los principios que rigen la transformación de la toxina en toxoide por la acción del formol, son muy simples. Por ejemplo, la velocidad de atenuación aumenta con la concentración del formol libre y con la temperatura; un exceso de formol o una muy alta temperatura,

disminuyen su poder antigénico; la desintoxicación completa exige un mínimo de formol y la reacción del medio tiene importancia decisiva, estando su óptimo cerca de pH 8.

Resulta fácil comprender así que para cada tipo de toxina corresponde una particular concentración óptima de formalina y, en ciertos casos, una conveniente corrección del pH, efectuada después de la adición del formol.

En el caso de la toxina usada por nosotros, la adición de 0,6 % de formalina neutra y la incubación a 37° C. durante 15 días, son suficientes para obtener la desintoxicación completa. El pH de estos toxoides está cerca de 7.5. (Ver técnicas).

Según nuestra experiencia, no es posible producir una desintoxicación completa sin que haya un exceso de formol, revelado por el reactivo de Schiff después de la incubación a 37° C. Por tanto, creemos que los toxoides sin formalina libre, deben haber sido obtenidos en condiciones diferentes de las que se acaban de describir.

En recientes investigaciones hemos entrevisto la posibilidad de mejorar la actividad antigénica del toxoide bruto, si se ajustan las condiciones de atenuación.

III. — MEDICION DE LA ACTIVIDAD DEL TOXOIDE

Para RAMON la actividad inmunizante de un toxoide puede ser apreciada por el número de unidades antigénicas contenido en 1 c³ y medido por floculación (Lf/c³). Esta magnitud constituye un guía muy útil, pero los resultados de nuestra experiencia, coincidentes con los de otros autores (GLENNY y col.), niegan que pueda ser utilizada para medir el poder vacunante de un toxoide dado.

En apoyo de esta afirmación podemos mencionar: 1. La existencia de toxoides carentes de poder floculante que, sin embargo, son óptimos antígenos. 2. La posibilidad que de una misma toxina se puedan preparar toxoides de igual valor floculante (Lf) y diferente poder inmunizante. Aunque, cabe reconocerlo, estos hechos no llegan a invalidar totalmente la afirmación de RAMON, pues es cierto que entre el poder vacunante de un toxoide de poco valor (medido por floculación) y otro de mucho valor, elaborado de idéntica manera, existen diferencias que seguramente favorecen al toxoide de más Lf por c³ cuando se comparan volúmenes iguales.

Por tanto, la actividad vacunante de un toxoide debe medirse directamente, para lo cual se lo inyecta, en manera y dosis adecuadas, a animales capaces de producir antitoxina por la inoculación de toxoides y que normalmente carecen de inmunidad natural.

El cobayo es el animal de elección y, desde el descubrimiento del toxoide diftérico, ha sido usado corrientemente para probar la actividad antigénica de éste. Empero, quedan aún por fijar la dosis y el método de medida de la inmunidad, así como también el momento en que debe practicarse la medición. GLENNY, ALLEN y HOPKINS (1923), introdujeron en la práctica de la medición el denominado «índice de inmunidad», dado por el número de veces que una dosis de la toxina utilizada en la reacción de Schick, debe inyectarse para obtener un resultado negativo, cuando la primera inyección se hace a las tres semanas de la vacunación y el intervalo entre las siguientes inyecciones de prueba y a la vez vacunantes es de 7 días (patrón de inmunidad potencial). Una variante de este método es el «índice de inmunidad rápida», que consiste en inyectar la dosis Schick de toxina a los 10 días de la vacunación y repetir su inyección cada dos días.

El índice está dado por el número de días que transcurren entre la fecha de vacunación y la de la primera reacción negativa.

SCHMIDT y KJAER (1930), prueban la actividad antigénica de la vacuna por inyección de 1 y 10 D. L. M. de toxina diftérica, a los 21 días de haber vacunado con 10 Lf.

En los EE. UU. se exigía una actividad tal que los cobayos, inyectados con la primera dosis de vacuna, no debían sucumbir a la intoxicación con 5 D. L. M. de toxina diftérica, inyectadas 42 días después de la vacunación. Este patrón es considerado deficiente por PARK (1932), puesto que en su experiencia la inmunidad con un buen toxoide llega a ser suficiente para proteger a los cobayos contra 20 a 30 D. L. M. de toxina.

RAMON (1928), comparando toxoides de 11 Lf, 7 Lf y 1 Lf por c^3 , administrados en dosis de 5 c^3 a cobayos de 350 g., encuentra que los animales inyectados con 55 Lf. resisten hasta 400 D. L. M. de toxina, los de 35 Lf a 100 D. L. M. y los de 5 Lf a unas pocas dosis e irregularmente.

BELFANTI, con 1 c^3 de un toxoide que no flocula (destinado a rino-vacunación), inmuniza cobayos contra 100 D. L. M. de toxina.

Nuestros estudios al respecto los iniciamos en mayo 1932. Proseguidos hasta la fecha, nos han permitido apreciar el valor decisivo del método experimental directo en la determinación del poder vacunante. (1)

(1) El poder vacunante de un toxoide destinado a la vacunación humana con tres inyecciones, determinado mediante la inmunización de cobayos inyectados una sola vez, es pasible de crítica (como ya lo ha hecho GLENNY); pero permite revelar diferencias que por la medición *in vitro* no son apreciables. Por otra parte esta técnica constituye el procedimiento de elección, cuando se mide la actividad antigénica de las vacunas de una sola dosis.

En un primer momento empleamos el procedimiento siguiente: a cada animal de una serie de 12 cobayos de 250 g., inyectábamos $1/3$ de la dosis total de vacuna usada en el hombre y, transcurridos 30 días, probábamos la inmunidad existente administrando 100 D. L. M. Otras veces usábamos 1 L_+ o 2 L_+ de toxina con un mínimo de 60 D. L. M. por cada L_+ . Como por lo general la dosis vacunante total del método clásico está contenida en 3 c^3 , suministrada en 3 inyecciones, la cantidad que inyectábamos al cobayo era de 1 c^3 , o sea 10 a 16 Lf.

Este procedimiento nos permitió distinguir toxoides con buen poder vacunante de otros que eran poco activos. Con todo, después de haber determinado la actividad de 50 diversos toxoides de varias series y proveniencias, no lo consideramos completamente satisfactorio.

Como resumen de nuestros experimentos podemos decir que 1 c^3 (10 a 16 Lf) de un buen toxoide de tres dosis, vacuna a los cobayos tan fuertemente que estos animales sobreviven a la inyección de 1 L_+ de toxina (60 D. L. M.), hecha a los 30 días de la vacunación.

Un segundo procedimiento fué estudiado después de conocer el método usado en el Nat. Inst. for Med. Res., gracias a la amabilidad del Dr. Percival HARTLEY. Consiste en determinar en cada animal usado el grado de inmunidad que se alcanza con la vacuna, mediante la inyección intradérmica de diversas dosis de toxina. Deben emplearse animales de piel blanca y toxina que responda a las características exigidas para la prueba de Schick.

Con el objeto de verificar si por este último procedimiento se puede conocer el contenido de antitoxina circulante a la vez que la cantidad absoluta de antitoxina, inyectamos cobayos por vía peritoneal o venosa con un suero antidiftérico homólogo. La antitoxina circulante se medía en el suero obtenido por sangría practicada 48 horas después de la inyección de la antitoxina y la sensibilidad cutánea, era determinada por inyección de 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1.000 dosis cutáneas de una toxina apropiada para la reacción de Schick.

De los datos obtenidos, que publicamos en el cuadro respectivo, se deduce que entre antitoxina circulante y cantidad absoluta de la misma, existe una relación lineal y que entre estas cifras y la resistencia a la toxina inoculada por vía cutánea, también existe relación, aunque regida por una ley diferente. Así, conociendo el grado de sensibilidad cutánea a la toxina, se puede calcular el contenido de antitoxina circulante y, por consiguiente, la cantidad total de antitoxina existente en el animal del ensayo.

Es obvio decir que el valor antitóxico del suero también puede medirse directamente por el procedimiento de RÖMER o alguna de sus variantes.

RELACION ENTRE LA ANTITOXINA INYECTADA, ANTITOXINA CIRCULANTE
Y SENSIBILIDAD CUTANEA A LA TOXINA DIFTERICA

Dosis de antitoxina inyectada U. A.	Peso del cobayo	Dosis de la toxina inyectada expresada en D. n. m. Reacción producida por la inyección							Valor antitóxico del suero en U.A.
		1	3	10	30	100	300	1.000	
0.5	270	—	—	+	+	+	+	+	1/300
0.5	270	—	—	+	+	+	+	+	1/200-1/300
0.5	300	—	—	+	+	+	+	+	1/300
1	280	—	—	+	+	+	+	+	1/100-1/200
1	270	—	—	+	+	+	+	+	1/50 -1/100
1	290	—	—	+	+	+	+	+	1/100-1/200
2	280	—	—	—	+	+	+	+	1/50 -1/100
2	290	—	—	—	+	+	+	+	1/50 -1/100
2	300	—	—	—	+	+	+	+	1/50 -1/100
5	300	—	—	—	—	—	+	+	1/10 -1/25
5	270	—	—	—	—	—	+	+	1/10 -1/25
5	280	—	—	—	—	—	+	+	1/10 -1/25
10	290	—	—	—	—	—	—	+	1/10 -1/25
10	300	—	—	—	—	—	—	+	1/5 -1/10
10	300	—	—	—	—	—	—	+	1/10 -1/25

La aplicación del último método descrito, al estudio del poder inmunizante de los toxoides, nos ha demostrado que hay una concordancia entre el valor antitóxico calculado en función de la sensibilidad cutánea y el valor antitóxico medio determinado directamente.

Para la apreciación del valor antigénico de toxoides corrientes, aún aquellos con un número alto de Lf por c³, el método es perfectamente utilizable y substituye con ventaja al que usamos en un primer momento (ver pág. 692); ya que permite conocer el grado de inmunidad de cada animal, calcular los valores correspondientes a la antitoxina circulante y total y deducir, en consecuencia, el valor antitóxico medio.

Además, ilustra de una manera clara acerca de una propiedad muy importante, cual es el diferentísimo comportamiento individual de cada cobayo inyectado, lo que hace pensar enseguida que la univacunación del hombre con este mismo toxoide carece de buen fundamento experimental. Claro está que, el referido método, presenta el inconveniente de requerir animales de piel blanca, sin contar, por otra parte, el trabajo bastante gravoso que importa la administración de 6 inyecciones a cada animal del experimento.

Ahora bien, cuando los cobayos alcanzan un alto grado de inmunidad (por obra de vacunas muy activas), para conocer el límite de reacción es necesario inyectarles toxina sin diluir, lo cual provoca una reacción necrótica primitiva y circunscrita (diferente de la reacción inflamatoria específica de la toxina) que dificulta la lectura.

Esta dificultad y el uniforme comportamiento de los animales vacunados con antígenos muy activos, nos decidieron a usar el método adoptado en EE. UU. y en Canadá por los laboratorios oficiales; dónde se procede a la determinación del valor antitóxico existente en el suero de un número adecuado de cobayos, sin considerar el valor individual y su variación. La medición se practica por el método de RÖMER o alguna de sus variantes. Cuando el valor antitóxico es elevado se usa la técnica de EHRlich.

IV. — PURIFICACION DEL TOXOIDE

En algunas personas, la inyección de toxoide diftérico produce reacciones locales o generales que, a veces, alcanzan intensidad considerable.

Esta particular sensibilidad, muy común en los adultos, puede explicarse por la existencia de un estado alérgico para sustancias contenidas en el caldo de cultivo, donde, además de la toxina transformada en toxoide, se encuentran también sustancias engendradas por el metabolismo bacteriano y otras que provienen del cuerpo de los microbios. A las cuales, naturalmente, hay que añadir las sustancias extractivas del músculo, la peptona y el formol.

La ocasional sensibilidad a lo que no deriva del microbio (sustancias extractivas del músculo, peptona o formol), no tiene importancia práctica, bien por su escasa frecuencia bien por las leves y efímeras manifestaciones mórbidas que la caracterizan. Entonces, las reacciones provocadas por la vacuna antidiftérica en el hombre, o se deben a la presencia de sustancias alergénicas derivadas del *Corynebacterium diphtheriae*, distintas de la toxina y por consiguiente del toxoide, o son expresión de una propiedad alergénica intrínseca del toxoide. En este último caso la vacunación diftérica es inseparable de la producción de fenómenos alérgicos, mientras que en el primero la alergia será ocasionada por sustancias distintas del toxoide y, por tanto, podrá evitarse su aparición, siempre que se acierte con un método de purificación apropiado.

GLENNY y WALPOLE (1915), describen por primera vez que la toxina diftérica dializada precipita por la acción del ácido acético. WATSON y WALLACE (1924), sin recurrir a la diálisis, consiguen precipitar con

gran purificación la toxina diftérica, cuando ésta es preparada en el medio de DOUGLAS y HARTLEY; procedimiento que, en el mismo año, GLENNY, HOPKINS y POPE aplican a la precipitación y purificación del toxoide. (1) El precipitado que se obtiene está dotado de un poder inmunizante comparable al toxoide bruto y su pureza es 40 veces mayor.

Una vez que así fueran dadas las normas para purificar el toxoide, otros investigadores prosiguieron en este camino y encontraron que las propiedades fundamentales del toxoide bruto permanecen inalteradas en el toxoide purificado por precipitación ácida; de modo que el fenómeno de RAMON y el inmunizante se conservan (WATSON y LANGSTAFF, 1926).

En un trabajo aparecido en 1930, SCHMIDT y KJAER, al comparar el toxoide bruto con el toxoide purificado por precipitación ácida, comunican que la propiedad antigénica de este último es mucho menor que la del primero, si se considera un igual número de Lf. inyectados. Por esta razón y por el poco rendimiento en toxoide purificado, los autores nombrados desechan el método de la precipitación isoleléctrica.

ALDERSHOFF (1926) y GLENNY y POPE (1927), demostraron que el precipitado formado en el fenómeno de RAMON, por la interacción de toxoide y antitoxina, constituye un antígeno muy eficaz y de mucha pureza.

WADSWORTH, QUIGLEY y SICKLES (1932), purifican el toxoide por precipitación con acetona, en frío. La purificación, sin embargo, es de poca monta, pues solo se reduce el N a una tercera parte de la cantidad inicial. No obstante, puede ser considerado como un buen método de eliminación del formol.

Los métodos de purificación fundados en la fijación del toxoide sobre precipitados minerales, tienen su origen en la hoy clásica «Contribution à l'étude de la diphterie» de ROUX y YERSIN (1899), cuando dicen: «El veneno diftérico, como las diastasas, tiene la propiedad de fijarse a ciertos precipitados producidos en el seno del líquido donde está disuelto». Para fijar el veneno, ellos, usaron el cloruro de calcio que da un precipitado de fosfato de calcio o cloruro de aluminio, metal que precipita al estado de hidrato. En la literatura más reciente son GLENNY y sus colaboradores POPE, WADDINGTON y WALLACE (1926) los que figuran como los primeros en intentar la purificación del toxoide diftérico con sales metálicas, las cuales, agregadas al medio

(1) Se trata de las «toxinas modificadas» (GLENNY), cuya toxicidad es tan pequeña que 1 c³ no contiene 1 D. M. M.

de cultivo, producen un precipitado sobre el que se fija el toxoide. La sal que emplearon los investigadores ingleses, fué el alumbre de potasio y el precipitado que se formaba contenía la totalidad del toxoide. Este es el método que, estudiado más tarde por GLENNY y BARR (1931) y con gran precisión por M. LLEWELLYN SMITH (1932), ha servido de base a HAVENS (1933) y a otros para la preparación de una vacuna que ha alcanzado rápida boga en la América del Norte.

La purificación de substancias biológicamente activas, tales como las enzimas, hizo progresos extraordinarios cuando se aplicaron los métodos introducidos por WILLSTÄTTER (1922-1928), los cuales están fundados en la preparación y en el conocimiento de las propiedades adsorbentes de diversos tipos de hidrato de aluminio. De este progreso se beneficiaron luego los métodos de purificación de otros cuerpos también biológicamente activos, entre los cuales las toxinas.

El hidrato de aluminio fué usado por SOMMER y MEYER (1926), para purificar toxina botulínica y por LINDERSTRÖM, LANG y SCHMIDT (1930), en la purificación de la toxina diftérica.

En este mismo año SCHMIDT y HANSEN, describen un procedimiento para la purificación del toxoide diftérico. Consiste en la elución del toxoide adsorbido sobre hidrato de aluminio (C de WILLSTÄTTER) y sucesiva decoloración con carbón. El toxoide obtenido es 100 veces más puro (relación de N por cada Lf.) y el rendimiento del método un 40 %. Análogos resultados han sido comunicados por M. LLEWELLYN-SMITH (1932) y por SCHMIDT y HANSEN, en memorias publicadas en 1933.

La purificación de los antígenos usados para inmunización fué intentada por nosotros hace años (SORDELLI y SERPA, 1924), sin que de los resultados derivaran beneficios prácticos. El interés despertado por la vacunación antidiftérica en la R. Argentina y la publicación de los trabajos de SCHMIDT (1930) y de JENSEN (1931), nos hizo retomar el estudio del tema.

Así, los ensayos de purificación del toxoide por adsorción sobre hidrato de aluminio, nos convencieron rápidamente de las dificultades que presentaba la aplicación de este método a la rutina de la elaboración de la vacuna en gran escala y, a pesar de las tentativas de simplificación, resolvimos abandonarlo dado su impracticabilidad en la sección fabril de nuestro Instituto.

En estos experimentos (1931), que nos permitieron comprobar parcial o totalmente los hallazgos de SCHMIDT, está el punto de partida de nuestros trabajos posteriores. Y queremos significar aquí nuestro agradecimiento al investigador danés, quien nos hizo conocer, antes de publicarlas, sus memorias acerca de la purificación del toxoide por adsorción sobre alúmina.

A pesar de los antecedentes desfavorables a la purificación del toxoide por precipitación ácida, no obstante el hecho de que el mismo GLENNY, descubridor del método en 1924, no lo utilizara para purificar la vacuna antidiftérica, nosotros, en 1932, decidimos iniciar sistemáticamente su estudio.

Como los toxoides preparados por diversas técnicas, tienen diferentes propiedades biológicas y físico-químicas, juzgamos poco útil referir las incidencias y fracasos de los experimentos que, en su conjunto, nos permitieron llegar a un procedimiento cuya aplicación práctica consideramos punto menos que perfecta.

Nuestro método es aplicable a toxoides de reciente o antigua data, provenientes de una sola elaboración o de mezclas de varias series.

Cuando se trata de la precipitación de una gran cantidad de toxoide, conviene hacer primero una mezcla homogénea y enseguida determinar en una muestra de ésta la cantidad óptima de ácido que, luego, en la proporción calculada, se agregará a la masa total del toxoide o a sus fracciones. (Ver técnica).

La purificación es enorme. En efecto, de un residuo orgánico no volátil de 2.000 γ para 1 Lf se llega a uno de 10 γ para 1 Lf del toxoide purificado. En casos menos favorables, hemos obtenido una purificación expresada por el hecho de disminuir el residuo orgánico no volátil desde 3.000 γ por Lf en el toxoide bruto a 25 γ por cada Lf del toxoide purificado. La pérdida media es del 20 %, si se considera el valor floculante, e igual o menor de considerar su propiedad fundamental, esto es la capacidad vacunante. Demás está decir que la inocuidad del toxoide original no disminuye, antes bien es dado ver una reducción de la toxicidad cuando los toxoides brutos son todavía tóxicos.

Resultados análogos a éstos, se obtienen siempre con todos los toxoides que se purifican mediante la correcta aplicación del método que comunicamos. Tal lo confirma nuestra experiencia de 3 años.

Los toxoides purificados por precipitación ácida, dan soluciones teñidas de rojo, a veces intensamente. Aunque esta coloración no puede ser un índice de escasa pureza, es fácil el inclinarse a buscar un procedimiento mediante el cual se consiga una mayor purificación o, por lo menos, la decoloración del toxoide precipitado por ácido.

SCHMIDT usa el carbón con muy buenos resultados. Nosotros hemos sido menos afortunados; seguramente por no emplear la clase de carbón apropiada.

En cambio, hemos podido convencernos de la eficacia, como decolorante cuando menos, del hidrato de aluminio γ de la forma C, preparada según la técnica de WILLSTATTER. El *modus operandi* que aconsejamos es la determinación de la dosis óptima en un ensayo

COMPARACION DE LA INNOCUIDAD Y DEL VALOR ANTIGENICO DE UN
TOXOIDE BRUTO Y DEL MISMO TOXOIDE PURIFICADO POR ACIDO

Toxoide bruto 55 - 10 Lf por c³.
Toxoide purificado 55 = 150 Lf por c³.

INNOCUIDAD

Toxoide bruto 55:	Peso de los cobayos en g.			
	29. VIII. 32	13. IX	24. IX	29. IX
10 c ³ (100 Lf)	300	360	380	390
10 c ³ idem.	290	390	430	440
5 c ³ (50 Lf)	305	385	420	430
5 c ³ idem.	290	370	420	430
Toxoide purificado 55:	7. XII 32	21. XII	28. XII	9 I 33
10 c ³ (1.500 Lf)	300	320	350	360
10 c ³ idem.	305	320	370	420
5 c ³ (750 Lf)	285	310	330	360
5 c ³ idem.	290	310	330	360

PODER INMUNIZANTE

Cobayos de 250-300 g. de peso. Unos inyectados con 10 Lf de toxoide bruto y otros con 10 Lf de toxoide purificado. Al cabo de 30 días, prueba de su resistencia por inyección de 1/2; 1 y 2 L+ de toxina con 60 D. L. M. × L+.

Toxina inyectada:	Toxoide bruto:	Toxoide purificado por ácido:
1/2 L+	p. ed. No muere.	p. ed. No muere.
1/2 L+	p. ed. idem.	p. ed. idem.
1/2 L+	p. ed. idem.	p. ed. idem.
1 L+	p. ed. No muere.	p. ed. No muere.
1 L+	p. ed. idem.	p. ed. idem.
1 L+	ed. Muere a las 72 h.	p. ed. idem.
2 L+	p. ed. No muere.	p. ed. No muere
2 L+	p. ed. idem.	p. ed. idem.
2 L+	p. ed. idem.	ed. Muere a las 48 h.

Indicaciones: p. ed = poco edema; ed. = edema; h. = horas.

preliminar. Esta dosis está limitada por la excesiva adsorción del toxoide y por la escasa purificación. Bastan, en general, 0.3 mg. de $\text{Al}(\text{OH})_3$ por c^3 de un toxoide de 100 Lf, a un pH de 7.5. El tiempo de adsorción es de 30 minutos a la temperatura de laboratorio.

Tres ensayos protocolizados a continuación, ilustran acerca de la precipitación por el ácido. Además, dan noticia del comportamiento del toxoide precipitado frente al hidrato de aluminio; revelándose una purificación de escasa importancia práctica.

Técnica: 1.000 c^3 se precipitan a pH 3.1 con ácido sulfúrico. El precipitado, separado por centrifugación, lavado con agua dest. (pH 3.1), se suspende en agua y se disuelve adicionándole cuidadosamente Na OH n/1 (pH final = 7.5 y volumen final = 100 c^3). A una parte de este líquido se añade una suspensión de alúmina (C γ), en la proporción de 0,3 mg. por cada c^3 , y se separa el precipitado. El contenido de toxoide de las distintas fracciones se determina por el fenómeno de RAMON.

A pesar de que mediante la decoloración con alúmina no hemos conseguido una verdadera purificación (aumento de la actividad por unidad de peso); en razón de que los líquidos presentaban mejor aspecto y quedaba siempre la probabilidad de que se adsorbieran productos bacterianos de naturaleza alérgica, hemos continuado usando este procedimiento en todas las pruebas posteriores en la preparación de la vacuna.

La reducción de la actividad antigénica sería el único defecto posible de esta técnica; pero tal no sucede, según lo han probado repetidos experimentos, efectuados en diferentes ocasiones (ver protocolos a continuación).

En resumen: la aplicación del método de precipitación ácida permite purificar considerablemente al toxoide diftérico. En el mejor de los casos la pureza del toxoide se hace 200 veces mayor y nunca es menor de 100. Este procedimiento es simple y fácil de aplicar; no reduce el valor antigénico bruto; no modifica desfavorablemente su inocuidad; resulta económico y da un rendimiento medio del 80 %.

La adsorción con una pequeña cantidad de hidrato de aluminio (C γ WILLSTÄTTER), permite prácticamente la decoloración completa del toxoide concentrado. Si bien este procedimiento no puede ser considerado como un método de purificación, con él se consigue decolorar el toxoide, no disminuir su actividad antigénica y aumentar las probabilidades de eliminación de las proteínas bacterianas, en general incriminadas de ser las causantes de las reacciones alérgicas producidas por la vacunación diftérica.

Nº.	Toxoide bruto					Toxoide precipitado					Toxoide precipitado y purificado por Al (OH) ₃				
	Preparado en fecha	Lf/c ³	Total de Lf	Residuo orgánico por c ³ (en γ)	Residuo orgánico por Lf (en γ)	Lf/c ³	Total de Lf	Pérdida en %	Residuo orgánico por c ³ (en γ)	Residuo orgánico por Lf (en γ)	Lf/cc	Total de Lf	Pérdida en % (total)	Residuo orgánico por c ³ (en γ)	Residuo orgánico por Lf (en γ)
448	20-X-33	12.5	12.500	25.600	2.000	100	10.000	20 %	1.020	10.2	71	7.100	42 %	600	8,4
507	11-XI-34	12.5	12.500	28.700	2.300	100	10.000	20 %	1.100	11	71	7.100	42 %	650	9,0
551	14-VI-35	12.5	12.500	29.100	2.300	100	10.000	20 %	2.500	25	83	8.300	34 %	2.000	24

γ = 0.001 mg.

VALOR ANTIGENICO DE UN TOXOIDE BRUTO, DE UN TOXOIDE PRECIPITADO Y DE UN TOXOIDE PRECIPITADO Y PURIFICADO POR ADSORCION CON ALUMINA, COMPARADO MEDIANTE INYECCION DE 5 Lf

La determinación ha sido practicada por inoculación de 5 Lf a cobayos, cuya inmunidad se probó 30 días más tarde, mediante inyección intradérmica de diversas dosis de toxina o por medición del valor antitóxico del suero o por ambos a la vez.

Prueba de inmunidad por inoculación intradérmica de toxina a los 30 días.

Antígeno y nº. de ensayos.	D n. m. inyectadas y % de animales que reaccionaron a la inoculación:					
	3 D. n. m.	10 D. n. m.	30 D. n. m.	100 D. n. m.	300 D. n. m.	1.000 D. n. m.
Toxide bruto (3 ensayos)	37	10	12	13	26	2
Toxide pp. por ácido (3 ensayos)	27	6	11	11	35	10
Toxide pp. por ácido y purific. por alúmina (3 ensayos)	37	15	10	17	11	10

Prueba de inmunidad por elevación del título antitóxico del suero.

Antígeno:	Valor antitóxico en unidades por c ² .			
Toxide bruto	1/100	1/100	1/50	1/50
Toxide precipitado	1/50	1/100	1/25	1/25
Toxide precipitado y purifi- cado por alúmina	1/10	1/200	1/50	1/100

V. — REACCIONES ALERGICAS PRODUCIDAS POR LA VACUNA

Con lo hasta ahora descrito en estas páginas apenas hemos alcanzado el punto desde el cual puede tan solo considerarse la posibilidad de resolver el problema, esto es vislumbramos la esperanza de que la vacuna purificada, al no producir reacciones, permita, por aumento de la dosis, reducir el número de inyecciones vacunantes o que, en el caso de ser indispensables los tres estímulos clásicos, por ausencia de fenómenos reactivos desagradables, no haya ningún obstáculo a la difusión universal de su empleo.

Aunque en esta comunicación no hemos tocado *ex profeso* el tema de la aplicación de la vacuna al hombre y solo nos hayamos limitado a su estudio experimental, ello no es óbice para que recordemos que JENSEN (1931) usó una vacuna purificada por el método de SCHMIDT, administrándola en dosis de 150 y 300 Lf y obteniendo resultados que, si fueron favorables en lo referente a inmunización, se juzgaron del todo inconvenientes por las reacciones generales observadas. Esta no es, sin embargo, la opinión personal de este autor; más, alguna circunstancia ha debido mediar para que la univacunación con este toxoide purificado no se haya difundido. Un pequeño ensayo de vacunación hecho por nosotros usando tres dosis de vacuna purificada por el método de SCHMIDT, así como la inyección en dosis mayores que las habituales (3 casos), nos dieron la convicción de que el procedimiento no constituía un avance suficiente para justificar la sustitución de la vacuna de RAMON, usada corrientemente en nuestro país.

El cambio del largo, difícil y costoso método de purificación, mediante adsorción sobre alúmina y sucesiva elución, por aquel de la precipitación ácida, rápido, simple y económico, que diera en nuestras manos un producto de mayor pureza, abrió ese ya señalado nuevo horizonte a las posibilidades de mejorar la vacuna antidiftérica, manteniéndose siempre, claro está, dentro de las normas clásicas de la vacunación.

Las pruebas de las ventajas de este último procedimiento, es obvio decirlo, solo pueden ser suministradas por el resultado de la aplicación práctica del producto obtenido a la vacunación del hombre. De este modo un estudio experimental, como el presente, solo puede servir para aportar argumentos de probabilidad.

Sin embargo, podemos considerar como pruebas de certeza las ya realizadas con carácter experimental en el hombre. Una de ellas se produjo involuntariamente, cuando los ensayos de vacunar por inhalación y, en ese entonces, nos demostró que la mayor parte de los adultos tienen sensibilidad al toxoide purificado por precipitación ácida («tracazo», reacción febril intensa, sensación de dificultad respiratoria, etc.). La otra se obtuvo por inyección intradérmica de 0,005 c³ de toxoide bruto (prueba de MOLONEY, variante de la anatoxireacción de ZOELLER) o de la cantidad correspondiente en Lf, cuando se aplicaban los toxoides purificados (este ensayo está protocolizado en la pág. 703).

REACCIONES PRODUCIDAS POR INYECCIONES INTRADERMICAS DE 0.005 c³ DE TOXOIDE BRUTO DE 16.6 Lf POR c³, EN 0,1 c³ Y DE CANTIDADES EQUIVALENTES EN Lf DE TOXOIDE PRECIPITADO POR ACIDO Y DEL PRECIPITADO POR ACIDO Y PURIFICADO POR HIDRATO DE ALUMINIO

LAS CIFRAS DEL CUADRO EXPRESAN LAS DIMENSIONES (en cm) DE LA REACCION PRODUCIDA

	24 horas			48 horas		
	Toxoide bruto.	Toxoide precipitado	Toxoide ppdo. y purificado.	Toxoide bruto.	Toxoide precipitado	Toxoide precipitado y purificado
1	1.5 × 1.5	1 × 1	1 × 1	4 × 5	3 × 3	3 × 3
2	0	0	0	0	0	0
3	0.5 × 0.5	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	+	0	0	0	0	0
8	1 × 1	0	0	1 × 1	0	0
1	1 × 1	0	0	1 × 1	0,5 × 0,5	0
10	3 × 1	1 × 1	1 × 1	2 × 2	2 × 2	2 × 2
11	0	0	0	0	0	0
12	+	0	0	0	0	0
13	3 × 3	1 × 1	0,5 × 0,5	4 × 2	3 × 3	2 × 2
14	0,5 × 0,5	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	+	0	0	0	0	0
20	0	0	2 × 2	2 × 2	2 × 2	2 × 2

En resumen, el toxoide purificado por precipitación ácida y sucesiva adsorción, conserva su capacidad de provocar reacciones de tipo alérgico en el hombre; pero siendo esta propiedad menos marcada que en el toxoide bruto, debe considerarse al toxoide purificado como antígeno de mejor calidad, de manera entonces que su empleo representa un progreso real en la vacunación antidiftérica humana.

Sin embargo este progreso no constituye una solución satisfactoria y mucho menos definitiva del problema que nos ocupa. Solo significa la posibilidad de aumentar la concentración del valor antigénico del toxoide y reducir su capacidad alérgica, lo cual equivale, en cierto modo al adelanto que se ha logrado con la producción de mejores toxinas (POPE, 1932; RAMON, 1933).

VI. — ACTIVACION DEL TOXOIDE

RAMON (1926), demostró que la adición de tapioca al toxoide (anatoxina) aumentaba de modo apreciable su valor antigénico y, en el mismo año, GLENNY, POPE, WADDINGTON y WALLACE, probaron que el precipitado que se forma en la toxina por adición de alumbre tiene mayor valor antigénico que el toxoide bruto.

Fué muy grande el interés nuestro por estos procedimientos y los aplicamos a la inmunización de caballos que se lleva a cabo para la producción de sueros; empero, los resultados fueron poco satisfactorios. Debemos reconocer, sin embargo, que los problemas de la inmunización del hombre contra la difteria y los de la inmunización de caballos para que éstos den suero antidiftérico, son fundamentalmente diferentes. Los experimentos de GLENNY y col. (1926), pero sobre todo los de GLENNY y WADDINGTON (1928) y GLENNY y BARR (1931), en los cuales se prueba la mayor actividad antigénica de una sola inyección de toxoide purificado por alumbre en comparación con la del toxoide bruto y especialmente aquellos de M. LLEWELLYN SMITH (1932), sobre la activación mediante varios óxidos metálicos, entre los cuales el hidrato de aluminio, son ya base suficiente para considerar la aplicación de tales preparados más activos al hombre.

S. SCHMIDT (1933) en Copenhague y WELLS GRAHAM y HAVENS (1932) en Montgomery (Alabama, EE. UU.), resuelven, independientemente uno de otros, tomar el derrotero de la activación del toxoide por adición de sustancias inertes, con el objeto de disminuir la dosis o reducir el número de inyecciones. Así, WELLS GRAHAM y HAVENS, (1932) y HAVENS y WELLS (1933), aplican el método de GLENNY y col., aquel de la precipitación del toxoide con alumbre, y en poco tiempo más en los EE. UU. la vacuna preparada de este modo logra una extraordinaria difusión; mientras que SCHMIDT y HANSEN (1933) parten del toxoide purificado por adsorción con alúmina, elución y decoloración con carbón, seguidas por activación mediante adsorción sobre alúmina (C γ).

Elección del activador.

Nos decidimos por la alúmina, tal como lo hiciera SCHMIDT, por ser esta sustancia, según M. LLEWELLYN SMITH, un mejor activador que el precipitado que da el alumbre y porque era muy simple obtener un toxoide purificado de fácil adsorción sobre hidrato de aluminio. De acuerdo a la experiencia de SCHMIDT, y porque así también se infiere

del conocimiento de las propiedades de las distintas formas del hidrato de aluminio, preparadas por WILLSTÄTTER, elegimos entonces la variedad γ de la forma C de la alúmina (ortohidróxido γ).

SCHMIDT activa el toxoide con una cantidad de $\text{Al}(\text{OH})_3$ próxima a los 5 mg. por cada 25 Lf. Nosotros procedimos en forma semejante; usando para ello el toxoide precipitado por ácido; purificado con un mg. de $\text{Al}(\text{OH})_3$ para cada 150 Lf y fijado sobre 5 mg. de alúmina para cada 25 Lf La actividad del toxoide purificado se elevó considerablemente, como lo atestigua el protocolo que sigue:

VACUNACION DE COBAYOS CON TOXOIDE 55 PURIFICADO Y CON TOXOIDE 55 PURIFICADO Y ACTIVADO, MEDIANTE 5 MG. DE $\text{Al}(\text{OH})_3$ PARA CADA 25 LF

Dosis de vacuna inyectada:	Toxoide purificado:		Toxoide purificado + $\text{Al}(\text{OH})_3$	
	Prueba con:	Resultado:	Prueba con:	Resultado:
2 Lf	1 L+	+	1 L+	0
2 Lf	2 L+	+	2 L+	0
2 Lf	2 L+	ed.	6 L+	p. ed.
5 Lf	1 L+	+	1 L+	0
5 Lf	2 L+	ed.	2 L+	0
5 Lf	2 L+	ed.	6 L+	0
10 Lf	1 L+	ed.	1 L+	0
10 Lf	2 L+	ed.	2 L+	0
10 Lf	2 L+	ed.	6 L+	0

Indicaciones: ed. = edema.

p. ed. = poco edema.

+ = muerte.

Los mismos resultados obtenidos con el toxoide 55 activado, se consiguieron también con el toxoide que nos enviara S. SCHMIDT. Quedaba así probada la posibilidad de aplicar a los toxoides precipitados por ácido el recurso de la activación por la alúmina. Por tanto, a todas las ventajas del procedimiento de purificación ácida, sumábase también aquella representada por la considerable elevación de la actividad antigénica por acción del hidrato de aluminio.

La prosecución de los estudios hizo que observáramos en el sitio de la inyección, la aparición de un nódulo indurado de reabsorción difícil que, en la mayoría de los casos, terminaba por abrirse, dejando escapar un pus espeso y sin bacterias. El absceso, drenado, cicatriza con lentitud.

Infelizmente, la inyección de cantidades crecientes de alúmina hasta 5 mg., tanto esterilizada por el calor como obtenida estérilmente, demostró que la evolución natural de las reacciones provocadas en el tejido subcutáneo de los cobayos, era la formación del absceso.

Por tanto, también para esta vacuna podía decirse lo que, en un editorial de «The Lancet» (marzo 1934, pág. 581), se escribió del toxoide precipitado con alumbre, o sea: «La producción de abscesos estériles, aún ocasionalmente, debe ser considerada como una seria desventaja para productos destinados a ser inyectados al hombre». Trátase, en efecto, de una grave dificultad que solo puede eliminarse si se llega a demostrar la poca o nula importancia de tales accidentes; aunque mejor sería se la pudiera evitar con la obtención de una vacuna que no determine la formación de abscesos.

El concepto corriente acerca del mecanismo de activación es muy elemental. Consiste en suponer que el toxoide difunde lentamente desde la zona de inyección, sitio donde queda depositado por influencia del cuerpo que lo retiene. Sobre esta base, bien podrían ensayarse todos los cuerpos que verosíblemente tengan esa misma propiedad siempre que no sean irritantes como lo es la alúmina.

En este sentido, nosotros ensayamos la caseína parcialmente precipitada y las emulsiones de la resina de benjuí. Los resultados fueron desfavorables, hasta el punto que tales sustancias pueden considerarse como depresores de la actividad antigénica. Un hecho, comunicado por C. PICO, acerca de la activación del poder antigénico por acción de la lecitina, no pudo ser confirmado; por el contrario, la actividad del toxoide lecitina fué menor que la del toxoide sin adición alguna.

Nuestros experimentos para conseguir el aumento del valor antigénico de la anatoxina para fabricar suero antidiftérico, han demostrado que el caolín (preparado según la técnica de WILLSTÄTTER), es un excelente activador, si es usado en la dosis de 2 mg. por c³ de toxoide. Agregando 2 mg. de caolín a 30 Lf de toxoide purificado, su valor antigénico se eleva 10 veces y con una dosis doble, es decir 4 mg., se produce un aumento de 20 veces (valores medios obtenidos con 10 cobayos en cada serie). El caolín tiene, sin embargo, el mismo inconveniente de la alúmina; esto es la producción constante de un absceso que se abre. Por lo tanto si su uso tiene algunas ventajas, éstas solo podrán ser demostradas por los resultados de su aplicación en la vacunación del hombre.

Activación por pequeñas dosis de alúmina. — Entre las soluciones posibles a fin de impedir la formación del absceso en el hombre, debe ser considerada la disminución de la dosis de alúmina; sabiendo que

en el cobayo el absceso se produce cuando la dosis de alúmina llega a un cierto valor.

Fué así que intentamos disminuir la cantidad de alúmina, hasta llegar a un mínimo con el cual se conseguía todavía la adsorción completa del toxoide. Esta dosis fué de 2 mg. para cada 25 Lf cuando el pH, antes de la adsorción, del toxoide es 5.4. El toxoide así preparado tiene una actividad antigénica tan elevada como el preparado en un tiempo anterior con 5 mg. para cada 25 Lf. Ya en este rumbo, pudimos comprobar que si se añaden 0.5 mg. de Al (OH)₃ a 30 Lf de toxoide purificado, llevado a pH 5 en presencia de 5 ‰ de NaCl, todo el toxoide es adsorbido. Con la cantidad de 0.3 mg. de alúmina en el líquido sobrenadante, aparece una pequeña cantidad de sustancias precipitables a pH 3.1.

El poder antigénico del toxoide precipitado y aquel de este mismo toxoide activado por 0.5 mg. de Al (OH)₃ (ortohidróxido γ esterilizado), han revelado la misma diferencia considerable a favor del toxoide activado, que ya se ha señalado en páginas anteriores.

ACTIVIDAD COMPARADA DE TRES TOXOIDES

- 1) Toxoide bruto de 20 Lf. por c.³ (Standard).
- 2) Toxoide 30 Lf. por c.³ precipitado por ácido y purificado por alúmina.
- 3) Toxoide precipitado por ácido y purificado por alúmina 30 Lf por c.³. Activado por 1/2 milígramo de alúmina (ortohidróxido γ) por c.³.

Se vacunan 50 cobayos con 5 Lf de cada uno de los tres antígenos por vía subcutánea. Al cabo de un mes se prueba la inmunidad por inyección de 3, 10, 30, 100, 300 y 1.000 D n m de una toxina para la reacción de Schick.

Antígeno:	% de cobayos que reaccionan a la inyección intradérmica de toxina al mes de vacunados con 5 Lf						
	Dosis de toxina en D. n. m.						
	3	10	30	100	300	1.000	3.000 *
Toxoide bruto	40	14	7	21	18	0	0
Toxoide III precipitado y purificado	28	24	10	19	14	5	0
idem + alúmina	0	0	0	0	5	47	48

* Esta dosis no fué inyectada; pero, a los efectos de la comparación se admite que los cobayos que no reaccionan c 1.000 D. n. m., responden a 3.000 D. n. m.

Un nuevo experimento nos permitió demostrar que la dosis de alúmina puede ser reducida a 0.3 mg. para cada 30 Lf, notándose una ligerísima diferencia a favor del toxoide activado por la dosis de 0.5 mg.

ACTIVACION DEL TOXOIDE PURIFICADO POR DIFERENTES CANTIDADES DE ALUMINA

Antígeno	% de cobayos que reaccionan a la inyección intradérmica de la toxina al mes de ser vacunados con 5 Lf.		
	Dosis de toxina en D. n. m.		
	1.000	3.000	10.000 *
Toxoide precipitado y purificado + 0,3 mgs. de Al (OH) ₃ por 30 Lf.	20	40	40
Toxoide precipitado y purificado + 0,5 mgs. de Al (OH) ₃ por 30 Lf.	0	40	60

En resumen: la activación antigénica del toxoide precipitado y purificado, se hace efectiva con dosis muy pequeñas de Al (OH)₃ (ortohidróxido γ) pues bastan 10 milésimas de milígramo para activar considerablemente 1 Lf de toxoide. Pero como la dosis de 16 milésimas de milígramo es algo más eficaz que la anterior, por eso se la escoge para los preparados destinados al uso humano.

Hasta este momento, hemos cotejado la capacidad antigénica de los diversos preparados, por determinación de la inmunidad producida con una sola inyección. Este procedimiento tiene absoluta validez para medir la actividad relativa de las vacunas usadas en una sola inyección o, también, para apreciar el valor antigénico intrínseco de un toxoide aplicado a animales carentes de inmunidad; pero, no permite deducir el valor relativo de una vacuna que se inyecta de una vez, con otra que se debe inyectar en dos o tres veces. Además, un toxoide, excelente como primer estímulo, puede no serlo cuando es empleado como segundo estímulo y a la inversa, un antígeno malo como primer estímulo puede ser bueno como segundo estímulo.

En los experimentos relatados a continuación hemos comparado el valor antigénico del toxoide purificado con el del toxoide purificado y activado, cuando se los inyecta dos veces con un intervalo de 30 días.

* Esta dosis no fué inyectada; pero, a los efectos de la comparación, se admite que los cobayos que no reaccionan a 3.000 D.n.m., responden a 10.000 D.n.m.

Entre 1º y 2º estímulo transcurren 30 días				
1er. estímulo	Valor antitóxico probable a los 30 días.	2º. estímulo.	Valor antitóxico a los 30 días del segundo estímulo.	Índice de actividad del 2º. estímulo
5 Lf. toxoide purificado	0.02	5 Lf. toxoide purificado	0,04 Unidad antitóxica (12 cobayos)	2
5 Lf. toxoide purificado	0.02	5 Lf. toxoide purificado activado con 10 γ alúmina por cada Lf	0.5 unidad antitóxica (14 cobayos)	25
5 Lf. toxoide purificado activado con 10 γ de alúmina por cada Lf	0.2	5 Lf. toxoide purificado	5 unidades antitóxicas (12 cobayos)	25
5 Lf. toxoide purificado activado con 10 γ de alúmina por cada Lf	0.2	5 Lf. toxoide purificado y activado con 10 γ de alúmina por cada Lf	5 unidades antitóxicas (12 cobayos)	25

El primer experimento se hizo con dos inyecciones de toxoide purificado; en un segundo ensayo, las dos inyecciones practicadas fueron de un toxoide purificado y activado, mientras en otro, tercero, se aplicó primeramente una inyección de toxoide purificado y luego una segunda de un toxoide purificado y activado, en tanto que el cuarto experimento, primero se inyectó toxoide purificado y activado y después el toxoide purificado. La dosis siempre fué igual (5 Lf) y los días transcurridos entre las dos inyecciones fueron 30. La prueba de la inmunidad se realizó después de 30 días, desde la última inyección.

Cuando la inmunidad conferida por el primer estímulo es muy baja, el toxoide purificado no es buen antígeno si es usado como segundo estímulo. Por el contrario, en el caso de una inmunidad relativamente alta ese mismo toxoide purificado resulta un excelente antígeno.

Cuando se lo usa como segundo estímulo la excelencia del toxoide activado es independiente del grado de inmunidad conferido por la primera aplicación.

Estos resultados demuestran que el valor antigénico «práctico» de un toxoide está condicionado por dos elementos, uno de los cuales deriva de su naturaleza misma y el otro depende del estado de inmunidad previa del animal que se vacuna.

RESUMEN

En esta comunicación se describe un procedimiento de preparación de una toxina diftérica muy activa. Sus resultados son muy regulares.

Con esta toxina se han preparado toxoides antigénicamente uniformes, los cuales han sido usados para la vacunación del hombre en la República Argentina, desde el año 1932.

La conveniente acidificación de estos toxoides, produce el precipitado de una pequeña cantidad de sustancias, en las cuales está contenida la mayor parte de la actividad antigénica. Con esta operación el toxoide se purifica entre 100 y 200 veces. El hidrato de aluminio (ortohidróxido γ de WILLSTÄTTER), adsorbe fácilmente las sustancias coloreadas de este toxoide y aumenta ligeramente su pureza.

Un toxoide purificado, obtenido por precipitación ácida y decoloración por alúmina, flocula como el toxoide original y tiene la misma actividad antigénica por cada unidad floculante (Lf).

La adsorción del toxoide purificado sobre alúmina o caolín, produce una exaltación considerable de la actividad antigénica de aquél, demostrada por la inyección a animales sensibles que carecen de inmunidad natural o adquirida; advirtiéndose que la alúmina, por unidad de peso, es más activa que el caolín.

La propiedad activante de estos compuestos minerales está acompañada de un aumento de la reacción local. Otras sustancias como el benjuí, la caseína y la lecitina, que dan complejos con el toxoide, no exaltan su propiedad antigénica ni dan reacción local comparable a la que producen la alúmina o el caolín.

Una muy pequeña cantidad de alúmina (10 milésimas de milígramo por cada Lf), es suficiente para elevar de manera extraordinaria el poder antigénico del toxoide purificado, si se cuida que el pH esté próximo a 5.5 y la concentración de NaCl sea del 5 ‰. Como 16 milésimas de milígramo de alúmina aumentan un poco más el poder antigénico, hemos considerado a esta cantidad cual dosis útil. Un toxoide activado de esta manera no tiene ya sustancias antigénicas disueltas, es decir que todas ellas se han fijado sobre la alúmina. Esta particularidad puede ponerse en evidencia utilizando el método de RAMON o la acidificación a pH 3.1.

Con la pequeña cantidad de alúmina indicada, se reduce considerablemente la reacción local (induración, formación de absceso, evacuación del pus, cicatrización lenta), muy grande cuando las dosis de alúmina son mayores.

La comparación de los resultados de la vacunación de cobayos,

mediante toxoide purificado y toxoide purificado y activado, en dos veces, con un intervalo de treinta días, ha revelado: 1°. que el toxoide purificado, cuando usado como segundo estímulo, es antígeno mediocre en animales de escasa inmunidad; pero es excelente en animales con mediana o buena inmunidad. 2°. Que el toxoide purificado y activado es tan buen segundo estímulo para animales de escasa como para los de buena inmunidad.

La purificación del toxoide no hace desaparecer su capacidad alérgica, pero esta es menor que aquella del toxoide bruto.

Entre los métodos de medida de la actividad de los toxoides, se destaca siempre, como guía de elaboración, aquel de la floculación (fenómeno de RAMON); pero, para conocer la propiedad vacunante es indispensable acudir al método directo (determinación del grado de inmunidad producido en cobayos). Con los toxoides comunes se puede usar el método de la medición del valor antitóxico del suero sanguíneo o la prueba de la sensibilidad cutánea a la toxina; mientras que con los toxoides activados la aplicación del último procedimiento está limitada por el muy alto grado de inmunidad que ellos determinan.

CONCLUSIONES

1. El toxoide purificado y activado, cuya preparación y estudio experimental se comunica, reúne las condiciones de una buena vacuna y, por tanto, está justificada su aplicación al hombre.

2. Dicho toxoide puede ser considerado como base de un método de univacunación por su elevado valor antigénico.

3. El toxoide purificado constituye un excelente 2°. estímulo en los animales dotados de mediana inmunidad, por lo cual debe ser tenido en cuenta para un método de vacunación de dos dosis.

Técnica de la elaboración de la vacuna antidiftérica

(TOXOIDE ACTIVADO)

Caldo de cultivo. — 5 Kg. de carne de ternera bien desengrasada, molidos en máquina de picar carne, se pasan por un molino desintegrador (Kek). Inmediatamente, agregar 10 L. de agua destilada y poner a hervir la mezcla en una olla de 20 L. de capacidad, sobre una hornalla de gas (la llama debe ser muy fuerte para alcanzar rápidamente la temperatura de ebullición). Hacer hervir 30 minutos. La agitación es indispensable, sobre todo en los primeros momentos; así se evita que la coagulación se haga en masas irregulares. Apenas trans-

curridos los 30 minutos de ebullición, colar por un trapo de queso y filtrar por papel de filtro plegado. Añadir 2 % de peptona Parke Davis y 0.5 % de NaCl. Alcalinizar hasta pH 8.3-8.4, a una temperatura de + 60° C. Transvasar en frascos de 5 L. de capacidad y llevar a 115° C., durante 10 minutos. Filtrar en caliente y distribuir en recipientes apropiados. En éstos, la capa líquida del medio nutritivo debe tener una altura de 1.5 a 2 c. Se esteriliza a 110° C., por 15 minutos.

OBTENCION DE LA TOXINA

El caldo puede sembrarse apenas enfriado. A cada frasco se agrega solución de glucosa (10 % o 50 %), en cantidad suficiente para que el medio contenga 1 ‰ de glucosa. Enseguida, sembrar con 5 ‰ de suspensión de un cultivo apropiado de *C. diptheriae* (cepa Park Williams n° 8, L. P. B.). Mantener la cepa en tubos del mismo caldo, a 37° C. y hacer transplantes cada 2 o 3 días. El cultivo («madre») se obtiene transplantando material de la última resiembra en el número necesario de tubos. Este cultivo puede usarse a las 24 o 48 horas. (El material para las siembras de conservación de la cepa o para la preparación de los cultivos «madre», se toma de la película del desarrollo, mediante el asa de platino). El tiempo de incubación es más o menos 7 días y la temperatura 37° C.; pero es conveniente que la permanencia en la estufa sea lo más corta posible.

La filtración de la toxina se hace por papel de filtro plegado, primero, y por bujía Berkefeld después. Estas operaciones pueden ser efectuadas de muchas maneras diferentes. Sin embargo, es indispensable que todo el instrumental usado sea estéril.

Una vez filtrada, se determina el valor Lf de la toxina.

TRANSFORMACION DE LA TOXINA EN TOXOIDE

La dosis de formol es constante para una toxina determinada, preparada de idéntica manera y cuyo pH final es prácticamente igual.

A la toxina obtenida del modo descrito, agregar 6 ‰ de formalina neutra al 40 %. Incubar la mezcla a 37°-38° C., durante 15 días. Al cabo de este tiempo la toxina ha perdido completamente su toxicidad. Un pH 7.5-8 y la presencia de formalina neutra son los datos que permiten esperar que se trate de un toxoide totalmente atóxico.

Determinar, entonces, el valor Lf, éste, en general, es igual al hallado en la toxina antes de proceder a su atenuación. Practicar la prueba de inocuidad.

PRUEBA DE INOCUIDAD DEL TOXOIDE

Inyectar por vía subcutánea 4 cobayos de 300 g. de peso, 2 de ellos con 10 c³ y los otros 2 con 5 c³ del toxoide en ensayo, o con una cantidad equivalente (caso de un toxoide purificado). Mantener a los animales en excelentes condiciones de alimentación, en jaulas con buena cama. Pesarlos cada 7 días.

En general cuando la reducción o la falta de aumento de peso se verifica dentro de los primeros 15 días, ello significa que se trata de un toxoide tóxico. Prolongar la prueba durante 30 días. Al cabo de este tiempo, el aumento de peso y la ausencia de signos de intoxicación diftérica aseguran de la inocuidad del toxoide.

PURIFICACION DEL TOXOIDE

a) *Precipitación ácida.* — Mezclar uniformemente los toxoides y tomar una muestra de un litro. Agregar a esta muestra una solución de SO₄ H₂ al 20 % v/v hasta pH 3.1. (*color verde* con azul de bromofenol por el método de toque). El pH y la formación, al cabo de 20' más o menos, de un precipitado coposo que tiende a sedimentar, son los signos que permiten reconocer el óptimo de precipitación. Para obtener este resultado se gastan 18 a 20 c³ de la solución de ácido sulfúrico.

Agregar a una proporción dada de la mezcla de los toxoides, la cantidad necesaria de la solución de ácido sulfúrico de acuerdo a la determinación hecha en el ensayo previo. Esperar 20' y centrifugar.

Precipitar otra parte de la mezcla de toxoides mientras se centrifuga el floculado de la primera fracción y continuar de igual manera hasta precipitar todo el toxoide.

El rendimiento de la centrifuga, la velocidad de la floculación particular de cada mezcla y la destrucción del toxoide por la prolongada permanencia en medio muy ácido, son las variables que fijan el volumen de la primera y las subsiguientes fracciones que se elaboran.

Suspender en agua el precipitado centrifugado y agregar lentamente una solución de Na OH n/1 cuidando que la alcalinidad no pase en ningún momento de la correspondiente a pH 7.5.

El precipitado se disuelve fácilmente dando un líquido claro de color rojizo. El volumen de esta solución es igual a una décima del volumen inicial de la mezcla de toxoides.

Todas las operaciones descriptas se hacen a temperatura ambiente. Determinar el valor Lf por el método de RAMON.

El rendimiento medio es del 80 %.

b) *Decoloración por alúmina.* — Determinar en un ensayo previo con 5 o 10 c³ del toxoide concentrado, a pH 7.5, la cantidad de alúmina que quita el color y no reduce en más de un 20 % la actividad. Agregar al volumen total del toxoide la cantidad de alúmina calculada. Agitar varias veces en un tiempo de 30'. Separar el residuo por filtración o centrifugación.

ESTERILIZACION DEL TOXOIDE POR FILTRACION

Filtrar el toxoide por papilla de papel; luego con precaución de asepsia calentar a 57° C. durante 30' y filtrar por bujía Berkefeld W. Las precauciones de asepsia y el calentamiento son necesarias pues por lo menos en nuestra experiencia existe una bacteria banal que atraviesa las bujías. Probar la esterilidad y medir el valor floculante.

PREPARACION DE LA VACUNA ACTIVADA

En un frasco de 10 litros de capacidad que contiene 30 grs. de ClNa y 4200 c³ de agua destilada (esterilizada), añadir asépticamente 2.000 c³ (200.000 Lf) de toxoide precipitado y₁ purificado, previamente filtrado y de cuya esterilidad se tiene certeza. Agregar una cantidad de HCl calculada para llevar el pH a 5.5 y disuelta en 150 c³ de agua destilada estéril. Por último añadir 335 c³ de una suspensión estéril de ortohidróxido γ con 10 mgs. de alúmina Al (OH)₃ por cada centímetro cúbico.

1 c³ de esta vacuna contiene 30 Lf y medio milígramo de hidrato de aluminio.

Como la parte activa sedimenta con gran rapidez, el envase de la vacuna debe hacerse de modo que las ampollas sean llenadas con el líquido uniformemente agitado. Para esto, nosotros hemos usado aire esterilizado por filtración a través de una capa de 50 cm. de algodón.

PREPARACION DEL ORTOHIDROXIDO γ (METODO ORIGINAL WILLSTÄTTER)

En un litro de agua a 65° C. disolver 500 grs. de sulfato de aluminio con 18 moléculas de agua de cristalización; agregar 6.5 litros de una solución que contiene 300 grs. de sulfato de amonio y 430 c³ de una solución de amoníaco al 20 % y que ha sido calentada a 60° C. Agitar durante 15' manteniendo la temperatura entre 58-60° C. Volcar esta suspensión en un recipiente con agua destilada de manera que el volumen final sea de 40 litros, hacer sedimentar y decantar el líquido sobrenadante. Esta operación se repite tres veces y la cuar.

to lavaje se hace agregando al agua 80 c³ de una solución de amoníaco al 20 %. Volver a repetir estos lavajes entre 10 y 20 veces hasta que el líquido sobrenadante quede libre de sulfatos.

PREPARACION DEL ORTOHIDROXIDO. (En parte transcripta de la técnica aconsejada por S. Schmidt 1933).

Una solución caliente de 340 grs. de alumbre amoniacal (sulfato de aluminio y de amonio) en 500 c³ de agua, se vuelca *de una sola vez* en 3.250 c³ de una solución que contiene 100 grs. de sulfato de amonio y 215 c³ de agua amoniacal con 20 % de NH_3 . Agitar fuertemente durante la precipitación y durante 15 minutos después. Cuidar que la temperatura no baje de 60° C. El precipitado que era muy voluminoso al principio se hace floconoso durante la agitación. Volcar la mezcla en un vaso de vidrio cilíndrico, que contiene 16 litros de agua destilada. El líquido se clarifica rápidamente y en general la mezcla se puede decantar, a los 30'. Añadir agua hasta completar el volumen de 20 litros, decantar nuevamente, repetir esta operación cada 30'. En 1 cuarto lavado agregar 40 c.c. de amoníaco al 20 % y dejar sedimentar durante 6 horas. Empezar de nuevo el lavado con agua y repetirlo otras cuatro veces. El último lavado de esta serie se hace con agua que contiene 15 c.c. de amoníaco al 20 % y dura 12 horas. Después de la decantación se reinician los lavados con agua pura que continúan hasta que el agua utilizada se enturbia, momento en que la mayor parte de los electrolitos se han eliminado. Se hacen dos lavados más y se deja el hidróxido de aluminio bajo una capa de agua. Se determina el residuo seco se calcula la proporción de $Al(OH)_3$ y se diluye la suspensión hasta que cada c³ contenga 10 mgs. de hidrato aluminio. Se distribuye en frascos apropiados y se esteriliza por 30' a 110° C.

PRUEBAS DE ACTIVIDAD DEL TOXOIDE

a) *Determinación del valor Lf (RAMON)*. — Mezclar una cantidad fija de antitoxina tipo (Sordelli, Ferrari 1934) con distintas cantidades de toxoide. Poner los tubos a 55° y determinar la floculación óptima. Un simple cálculo permite conocer el valor de Lf. Este es el mejor procedimiento para conocer la actividad de la toxina, la transformación regular de ésta en toxoide y el grado de eficacia de los métodos de purificación. Los toxoides purificados floculan bien y rápido si se los ensaya en soluciones concentradas (50 a 150 Lf. por c³).

DETERMINACION DIRECTA DE LA ACTIVIDAD ANTIGENICA.

I. - *Toxoide sin activar.* — Inyectar a 14 cobayos de 300 grs., de piel blanca, por vía subcutánea una cantidad de toxoide correspondiente a 5 Lf. A los 30 días extraer de cada cobayo mediante punción cardíaca sobre citrato de sodio 1 c.c. de sangre. Centrifugar la mezcla de las muestras de sangre y medir su valor antitóxico por algunas de las variantes del método de Römer. Probar la sensibilidad cutánea por inyección de 1, 3, 10, 30, 100, 300, etc. de una toxina apropiada para la reacción de Schick.

Un buen toxoide inmuniza por lo menos un 50 % de los cobayos con intensidad suficiente para que los animales no reaccionen con 3 y 10 D n m de toxina y da además un mínimo valor medio de antitoxina circulante en el plasma igual a 1/50 de U. A. por c.³

II. - *Toxoide activado.* — Inyectar 14 cobayos de 300 grs. y de cualquier pelaje con 5 Lf de toxoide. Al cabo de 6 semanas sangrar del corazón y medir el valor antitóxico medio, que no debe ser inferior a 1 unidad por c.³. Se puede usar el método de Ehrlich.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ALDERSHOFF.: Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. I. 10. 1926. ibid II. 3533. 1929. citado por H. SCHMIDT. *Die aktive Schutzimpfung gegen Diphtherie.* (Klinische Fortbildung, 1934).
- (2) BEHRING, E. von.: Ueber ein neues Diphtherischutzmittel. *Deutsch. med. Wochr.* XXXIX, pág. 873, 1913.
- (3) DOUGLAS.: On a method of Making cultivation media without prepared peptones and on a peptone free medium for growing tubercle bacilli. *The Lancet*, II, pág. 391, 1914.
- (4) GLENNY, A. T., ALLEN, K. y HOPKINS B. E.: Testing the antigenic value of diphtheria toxin-antitoxin mixtures. *Brit. Jour. of Exp. Path.* IV, págs. 19-27, 1923.
- (5) GLENNY, A. T. y BARR, M.: Alum-toxoid precipitates as antigens. *Jour. Path. Bact.* XXXIV, págs. 118-119, 1931.
- (6) GLENNY, A. T. y HOPKINS, B. E.: Diphtheria toxoid as an immunizing agent. *Brit. Jour. Exp. Path.*, IV, págs. 283-288, 1923.
- (7) GLENNY, A. T., HOPKINS, B. E. y POPE, C. G.: Notes on modification of diphtheria toxin by formaldehyde. *Jour. Path. and Bact.*, XXVII, págs. 261-270, 1924.
- (8) GLENNY, A. T. y POPE, C. G.: Diphtheria toxoid-antitoxin flocules. *Jour. Path. and Bact.*, XXX, págs. 587-592, 1927.
- (9) GLENNY, A. T., POPE, C. G. y WADDINGTON, H.: The measurement of the combining power of diphtheria toxin and toxoid with antitoxin in relation

- to their antigenic efficacy. *Jour. Path. and Bact.* XXVIII, págs. 279-303, 1925.
- (10) GLENNY, A. T., POPE, C. G., WADDINGTON, H. y WALLACE, U.: Immunological notes. *Jour. Path. and Bact.*, XXIX, págs. 31-40, 1926.
 - (11) GLENNY, A. T. y SÜDMERSEN, H. J.: Notes on the production of Immunity to diphtheria toxin. *Jour. of Hyg.*, XX, N° 2, págs. 176-220, 1921.
 - (12) GLENNY, A. T. y WADDINGTON, H.: The immunity index method of testing antigenic values. *Jour. Exp. Path. and Bact.*, XXXI, págs. 403-421, 1928.
 - (13) GLENNY, A. T., WALPOLE.: *Bioch. Jour.*, IX, pág. 298, 1915. Citado en Watson y Wallace, 1924.
 - (14) HARTLEY, P.: The value of Douglas's medium for the production of diphtheria toxin. *Jour. Path. and Bact.*, XXV, págs. 479-486, 1922.
 - (15) HAVENS, L. C. y WELLS, D. M.: Precipitated diphtheria toxoid. I. Preparation and antigenic activity. *Jour. Inf. Dis.*, LIII, N° 1, págs. 138-143, 1933.
 - (16) JENSEN.: Immunisation antidiphthérique des enfants par une injection unique d' anatoxine diphtérique purifiée et concentrée. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, CVIII, pág. 528, 1931.
 - (17) LINDERSTRÖM-LANG, K. y SCHMIDT, S.: On the purification of toxins and antitoxines. *Comp. Rend. Trav. Labor. Carlsberg*, XVIII, N° 3, págs. 1-15, 1930.
 - (18) MOLONEY, P. J., FRASER, C. J.: Immunization with Diphtheria toxoid. *Amer. Jour. Publ. Health.*, XVII, pág. 1027, 1927.
 - (19) POPE, C. G.: The production of toxin by *C. Diphtheriae*. Energy Sources. *Brit. Jour. Path. and Bact.*, XIII, págs. 207-217, 1932.
 - (20) RAMON.: Sur la production de la toxine diphtérique de valeur antigène intrinsèque élevée. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, CXII, pág. 8, 1933.
 - (21) RAMON, G.: Flocculation dans un mélange neutre de toxine-antitoxine diphtérique. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, LXXXVI, págs. 661-663, 1922.
 - (22) RAMON, G.: Sur la technique de titrage in vitro du sérum antidiphthérique. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, LXXXVI, págs. 711-712, 1922.
 - (23) RAMON, G.: A propos du titrage in vitro du sérum antidiphthérique par la flocculation. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, LXXXVI, págs. 813-815, 1922.
 - (24) RAMON, G.: La flocculation dans les mélanges de toxine et de sérum antidiphthérique. *Ann. de l' Inst. Pasteur*, XXXVII, N° 12, págs. 1001-1011, 1923.
 - (25) RAMON, G.: Sur la toxine et sur l' antitoxine diphtérique. Pouvoir flocculant et propriétés immunisantes. *Ann. de l' Inst. Pasteur*, XXXVIII, págs. 1-10, 1924.
 - (26) RAMON, G.: Sur le pouvoir flocculant et sur les propriétés immunisantes d' une toxine diphtérique rendu anatoxique (anatoxine). *Comp. Rend. Acad. de Scienc.*, CLXXVII, págs. 1338-1340, 1923.
 - (27) RAMON, G.: L' anatoxine diphtérique. Ses propriétés. Ses applications. *Ann. de l' Inst. Pasteur*, XLII, N° 9, págs. 959-1009, 1928.
 - (28) RAMON, G.: Procédés pour accroître la production des antitoxines. *Ann. de l' Inst. Pasteur*, XL, págs. 1-10, 1926.
 - (29) ROUX y YERSIN, 1889.: Contribution a l'étude de la Diphterie. *Ann. de l' Inst. Pasteur*, III, pág. 273, 1889.
 - (30) SCHMIDT.: Action de l' Hydrate d' aluminium sur des toxines et anatoxines. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinava*, IX, fasc. 3.
 - (31) SCHMIDT, S. y HANSEN, A.: Sur la préparation et sur quelques propriétés de l' anatoxine diphtérique purifiée et concentrée. *Acta pathologica et Microbiologica Scandinava*, suplemento 16, págs. 407-425, 1933.

- (32) SCHMIDT, S. y HANSEN, A.: Ueber die Reinigung und Konzentrierung von Diphtherietoxin und Diphthericanatoxin, mit besonderem Hinblick auf die aktive Immunisierung von Menschen. *Biochem. Zeit.*, CCXXVIII, págs. 263-290, 1930.
- (33) SCHMIDT, S. y KJAER, K. A.: Reinigung und Konzentrierung von Diphtherietoxin und Diphtherie-anatoxin durch ausfällung mit Säuren. *Bioch. Zeit.*, CCXXVIII, págs. 291-299, 1930.
- (34) SMITH, LL. M.: The precipitation of Diphtheria Toxoid by metallic Salts and the antigenic value of the precipitates so formed. *Journ. Path. and Bact.*, págs. 663-679, 1932.
- (35) SMITH, TH.: The relation of dextrose to the production of toxin in bouillon cultures of the diphtheria bacillus. *Jour. Exp. Med.*, IV, págs. 373-397, 1899.
- (36) SOMMER, E. W., SOMMER, H. y MEYER, K. F.: The purification of botulinum toxin. *Jour. Inf. Dis.*, XXXIX, págs. 345-350, 1927.
- (37) SORDELLI, A. y SERPA, S.: Vacunación antidiftérica. *Rev. de la Soc. Arg. de Biol.*, 1924.
- (38) SORDELLI, A. y WERNICKE, R.: Producción de toxina diftérica. *Rev. de la Asoc. Méd. Arg.*, XXXIII, págs. 662, 1920.
- (39) SORDELLI, A. y FERRARI, J.: Los signos experimentales de la unión de la toxina diftérica con la antitoxina. *Rev. del Inst. Bacter.*, VI, pág. 132, 1934.
- (40) WADSWORTH, A., QUIGLEY, J. J. y SICKLES, R. G.: The purification and concentration of diphtheria toxoid. *Jour. Exp. Med.*, LV, N° 5, págs. 815-828, 1932.
- (41) WATSON, A. E. y LANGSTAFF, E.: The purification and some properties of purified diphtheria toxoid. *Biochem. Jour.*, XX, pág. 793, 1926.
- (42) WATSON, A. F. y WALLACE, U.: Concentration of Diphtheria toxin by acid precipitation. *Jour. Path. and Bact.*, XXXVII, págs. 289-298, 1924.
- (43) WELLS, D. M. GRAHAM, A. H. y HAVENS, L. C.: Diphtheria toxoid precipitated with alum. Its preparation and advantages. *Amer. Jour. Publ. Health*, XXII, págs. 648-650, 1932.
- (44) WILLSTÄTTER.: *Berich. d. Chem. Ges.*, LVII, pág. 1082, 1924. Id. LVI, pág. 1118, 1923. Id. LVIII, pág. 2456, 1925.
- (45) ZOELLER, CH.: L' intradermo-réaction a l' anatoxine diphtérique ou anatoxine reaction. La notion d' allergie dans la diphtérie. *Comp. Rend. Soc. de Biol.* LXXXI, págs. 165-167, 1924.

INDICE

Noviembre 1933. N° 1

	Pág.
Monumento y pabellón Pasteur. Breves antecedentes de un homenaje. L. URIARTE	5
La peste en Pampita (Prov. de San Luis). E. PARDAL	18
Onicomicosis producida por <i>Cephalosporium spinosus</i> n. sp. P. NEGRONI	29
Tiña espontánea de la cobaya por <i>Trichophyton laticolor</i> . P. NEGRONI	37
<i>Trichophyton areolatum</i> Negroni, 1929, en la Argentina. P. NEGRONI	40
Sobre la estabilidad de la toxina para la reacción de Schick. F. MODERN	44
La lecitina en el fraccionamiento de los sueros antitóxicos y sobre transformación de pseudo euglobulina. I. PIROSKY y F. MODERN	51

Marzo 1934. N° 2

Pulgas y peste. L. URIARTE	59
Tres brotes pestosos en las provincias de Salta, Jujuy y San Luis. E. SAVI NO	99
Precipitación de la insulina por el ácido clorhídrico. N. LARA	130
Los signos experimentales de la unión de la toxina diftérica con la antitoxina. A. SORDELLI y J. FERRARI	132
Algunos datos sobre el mecanismo de la formación del aerosol Au _F (Zsigmondy) y del papel que en ella desempeña la presencia de vestigios de SN ₂ . R. WERNICKE y R. BIRABEN LOSSON	141
Nuevos datos sobre la influencia de la presencia de vestigios SNa ₂ en ob- tención del oro coloidal por el método al formol (Au _F de Zsigmondy). R. WERNICKE y R. BIRABEN LOSSON	145
La avidéz de los sueros concentrados y sin concentrar. F. MODERN	152
La fijación del complemento en las moniliosis cutáneomucosas. P. NEGRO- NI	159
Valor comparativo de las reacciones biológicas en las moniliosis cutáneo- mucosas. P. NEGRONI	164
Investigación del <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en el eritema nudoso. A. R. ARENA	170
Contribución al estudio de la vacunación preventiva antitetánica del caba- llo. N. V. D'ALESSANDRO	182
La <i>Monilla albicans</i> en la patología humana. P. NEGRONI	193
Nuevo caso de tripanosomosis humana en la ciudad de Catamarca. A. J. GEOGHEGAN	212

	Pág.
Nuevo caso de tripanosomosis humana en Huillapina (Catamarca). A. J. GEOGHEGAM	216
Contenido de yodo en glándulas tiroides y en otros órganos. G. RUFF	220
La hemoglobinuria de los bovinos (estudio anatómico). M. J. KUHN	228
El ácido biliar de la bilis de las serpientes. V. DEULOFEU	230
Nuevo medio de cultivo para el <i>Trypanosoma cruzi</i> Chagas, 1909. H. BONACCI	242

Julio 1934. N° 3

Estudio acerca de la anquilostomosis en la provincia de Corrientes. F. FÜLLEBORN, R. L. DIOS y J. A. ZUCCARINI	249
Un nuevo brote de peste en Recreo (prov. de Catamarca). E. SAVINO	295
Importancia de la desratización permanente y el saneamiento en la profilaxis de la peste bubónica. F. ALBORNOZ	304
Brote de peste en la prov. de Córdoba. J. M. DE LA BARRERA y M. ARZENO	330
La <i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i> en las ratas de la Argentina. E. CHIODI	342
<i>Salmonella enteritidis</i> (Gärtner) var. Chaco n. var. agente de paratifoidea. E. SAVINO y P. MENENDEZ	347
Sobre <i>Ixodoidea</i> de la República Argentina. R. DIOS y R. KNOPOFF	359

Noviembre 1934. N° 4

Contribución al estudio de la flora de la gangrena humana. Un nuevo bacilo anaerobio. A. SORDELLI, S. SORIANO, J. FERRARI y A. TORINO	413
Oligoquímica. R. WERNICKE	434
Acerca de la peste bubónica en la Argentina. L. URIARTE	446
Paludismo y parásitos intestinales en Territorio de Misiones. R. DIOS, E. T. W. DE SOMMERVILLE, H. BONACCI, A. ALDAO y R. BARBA	458

Marzo 1935. N° 5

Estudio sistemático de algunas bacterias esporuladas aerobias. ANGELA M. de SORIANO	507
Brote de peste pulmonar en Santa Rosa (Prov. de San Luis). E. PARDAL	613
Una epidemia de neumo peste en 1913. L. URIARTE, R. ARGERICH y R. PASSALACQUA	651
Un brote de neumo peste en Merou (Prov. de Entre Ríos). M. I. BATTAGLIA y L. URIARTE	661
Flora micológica de la vagina de mujeres no embarazadas. P. NEGRONI	668
La cápsula de la <i>Mycotorula albicans</i> (Ch. Robin, 1853). P. NEGRONI	671
<i>Salmonella enteritidis</i> (Gärtner) y sus variedades. E. SAVINO	677
Vacunación antidiftérica. Su estudio experimental. A. SORDELLI, E. SAVINO y J. FERRARI	687