

## Estudios sobre difteria X

### Acerca del fenómeno de Behring

Por A. SORDELLI, A. MANZULLO, J. P. FERRARI y R. NAVARRO VIOLA

---

Prosiguiendo los estudios de la patogenia de la difteria y con el objeto de encontrar una interpretación plausible de las diferentes formas clínicas de esa enfermedad, sobre todo las malignas e hipertóxicas, se realizaron experiencias para reproducir el fenómeno de Behring con la finalidad principal de obtener cobayos hipersensibles a la toxina para hacer con ellos experimentos vinculados a la naturaleza del problema en estudio.

Una variante de ese fenómeno podría servir además para explicar la sensibilidad a la difteria de ciertos sujetos cuya sangre contiene una cantidad de antitoxina superior a la del umbral de receptividad.

Los pocos individuos de ese grupo daban una reacción cutánea positiva a la toxina diftérica y padecían de un proceso que clínica y bacteriológicamente era difteria. Esto que a primera vista parece ilógico, es comparable al fenómeno paradójico que Behring observó en los animales. Si se pudiera demostrar que esa disociación entre inmunidad antitóxica y sensibilidad a la toxina es constante en los enfermos de difteria con antitoxina circulante, se deberá modificar parcialmente la doctrina de la inmunidad diftérica, introduciendo como corrección el de la hipersensibilidad individual.

Los hechos experimentales que se exponen en este trabajo contradicen de una manera muy evidente los expuestos por Behring y como se trata de una cuestión, a nuestro entender, de la mayor importancia, no queremos dar a este relato por el momento, otro carácter que el de una simple exposición de resultados experimentales. Hay que hacer notar que en los trabajos de Behring los fenómenos observados por ese investigador fueron muy claros, mientras los descritos por otros que le siguieron lo son menos, y por último los nuestros niegan su existencia.

Entregado para publicarse en abril de 1943.

Por tanto no se trata ya de conocer la existencia del fenómeno sino de saber por qué razón no se le puede reproducir con los recursos que actualmente disponemos, lo que equivale a decir que el método para producir el fenómeno descrito por Behring no está suficientemente definido por los datos publicados.

Entre las hipótesis posibles, para explicar la falta de realidad de ese fenómeno podemos suponer:

1° — Que los resultados obtenidos por Behring sean debidos a un error, cosa poco verosímil.

2° — Que las toxinas obtenidas en aquel tiempo, por la naturaleza de la bacteria o del medio de cultivo o del método de prepararlas, fueran esencialmente distintas de las que se obtiene actualmente.

3° — Que los animales usados, (raza, peso, edad) o las condiciones de temperatura ambiente, alimentación, etc., son importantes en la determinación del fenómeno.

En los experimentos de Behring se puede ver de manera clara que por la repetición de las inyecciones, los animales se hacen cada vez más sensibles al tóxico; en un caso, el del caballo Fritz, los fenómenos de hipersensibilidad se manifiestan por intoxicación y muerte con dosis muy pequeñas de toxina, y algo semejante ocurre con los dos cobayos cuyos protocolos muestran que hasta 1/400 de la D.L.M. es capaz de producir muerte con intoxicación diftérica.

En cuanto a la hipersensibilidad observada en otros casos, mejor dicho a la permanencia de la sensibilidad celular, los únicos signos que la demuestran son la elevación grande de temperatura por inyección de pequeñas cantidades de toxina. Menciona también Behring, sin exponer protocolos, que ciertos animales que contienen una cantidad muy grande de antitoxina, morirían con una cantidad ínfima de toxina y mucho menor que la que puede ser neutralizada por la antitoxina circulante. Es natural que la mezcla de esa toxina con la antitoxina circulante de aquel animal hipersensible, si fuera inyectada a un animal normal, no produciría ningún efecto tóxico.

Estos hechos, pueden fundamentar la hipótesis del aumento de la sensibilidad celular (\*) independientemente de la producción de antitoxina, es decir de la inmunidad. Parece innecesario complicar el asunto introduciendo la hipótesis de la insensibilidad celular co-

(\*) Behring admite que durante la inmunización se puede producir un triple fenómeno: 1° aumento de la sensibilidad celular; 2° reducción de la sensibilidad celular (insensibilidad); 3° aparición de anticuerpos capaces de neutralizar el tóxico.

mo un resultado de la inmunidad para el caso presente, por lo menos.

Por otra parte, los experimentos comunicados por Behring y Kitashima, con la excepción de 2 cobayos y de un caballo (Fritz), son poco probatorios de la existencia de una hipersensibilidad. Además el número de animales usados es escaso, y las conclusiones, tan interesantes, que fluyen de los resultados, pueden provenir de un factor accidental importante pero no determinado.

En cuanto a los experimentos de Nicolle, que utiliza cobayos, no se pueden considerar como demostrativos de los fenómenos de hipersensibilidad, pues si bien es cierto que a la 40ª inyección 2 cobayos sobre 4 mueren, la cantidad total de toxina inoculada es más de  $\frac{1}{2}$  D.L.M. y debemos considerar que la D.L.M. que usa es la cantidad de toxina que mata a un cobayo en 2 días y medio y por tanto no es de asombrarse que con la mitad de esta dosis los animales mueran en 4 ó 6 días después de la última inyección; por otra parte sólo 2 de los cobayos mueren y los otros 2 se inmunizan.

Zironi repite las mismas experiencias y establece que la hipersensibilidad se produce más rápidamente si se usan dosis mayores que las empleadas por Behring y Nicolle. La suma de esas cantidades está muy cerca de la D.L.M. y no es de extrañarse que los cobayos mueran con lesiones diftéricas. Kretz cita la experiencia hecha en un caballo, llamado Irene, que después de recibir durante 2 meses 700 cc de toxina diftérica, con sólo 50 cc de toxina, reacciona fuertemente con gran infiltración, fiebre y mal pulso.

Vladimiroff, trata de repetir la experiencia de Behring con toxina tetánica en cabras y provoca una enfermedad que no es precisamente el tétano y por lo tanto resultaría difícil juzgar este fenómeno como de hipersensibilidad en el sentido de Behring; no así en las lauchas que parecen presentar tal fenómeno por la inyección de toxina tetánica.

A continuación se exponen los resultados experimentales logrados en el estudio del fenómeno de Behring.

a) La experiencia que relatamos a continuación ha sido realizada en forma tal que prácticamente es la repetición de las comunicadas por Behring y Kitashima de modo que su resultado debiera haber sido el mismo que el observado por aquellos autores.

Se usa una toxina diftérica N° 1002 cuyo  $L_+$  es 0,08 y cuya D.L.M. es 0,002 para cobayos de 300 gr (cepa Park W 8) (Ver determinación de dosis letal mínima).

DETERMINACIÓN DE DOSIS LETAL MÍNIMA DE TOXINA DIFTÉRICA 1002 EN COBAYOS DE 300 GRAMOS

2 cc. de 1/1.000 se consideran D. L. M. para Behring

Toxina 1/1.000

26-XII-41

Cantidad	Cobayo N°	Días							
		27	28	29	30	31	1	2	
1 cc.	801	0	g. ed	ed	N	esc	g. N		
1 cc.	886	0	g. ed	ed	ed	ed	ed		
1,20 cc.	877	p. ed	g. ed	ed	+				
1,20 cc.	870	p. ed	g. ed	ed	+				
1,40 cc.	833	p. ed	g. ed	ed	ed	+			
1,40 cc.	859	p. ed	g. ed	ed	ed	ed		+	
1,60 cc.	891	p. ed	g. ed	ed	+				
1,60 cc.	894	p. ed	g. ed	ed	ed	ed	ed	N	

Toxina 1/500

29-XII-41

Cantidad	Cobayo N°	Días					
		30	31	1	2	3	4
0,80 cc.	880	p. ed	ed	ed	N		+
0,80 cc.	854	p. ed	ed			+	
0,90 cc.	874	p. ed	ed			+	
0,90 cc.	835	p. ed	ed		+		
1,05 cc.	842	ed	ed		+		
1,05 cc.	849	ed	ed	+			
1,15 cc.	826	ed	ed	+			
1,15 cc.	812	ed	+				

1<sup>er</sup> EXPERIMENTO

El 30 de Diciembre se inyecta 8 cobayos de 300 gramos con 1/400.000 de D.L.M. de toxina en 1 cc y se vuelve a inyectar 18 veces duplicando en general la dosis cada vez, en un tiempo total de 30 días. Al mismo tiempo que se inyectaban los animales del experimento se hacía lo propio con dos testigos con la misma dosis.

Las primeras 13 inyecciones fueron practicadas diariamente, llegando a 1/78 de la D.L.M.; en ese momento sobre 8 animales, 5 presentan pequeño edema y los testigos también. Desde la apari-

1er. Exp

Dosis inyectada en D.L. M.	1/400.000	1/200.000	1/100.000	1/50.000	1/20.000	1/10.000	1/5.000	1/2.500	1/1.250	1/625	1/312	1/156	1/78
Día del mes	30-XII	31-XII	1-I	2-I	3-I	4-I	5-I	6-I	7-I	8-I	9-I	10-I	11-I
Días desde el comienzo de exper.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
730	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
720	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n
771	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n
797	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
758	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n
784	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n
780	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n
731	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n
Testigos . . . . .	766	0	0	737	0	0	790	0	0	610	0	0	776
	714	0	0	762	0	0	728	0	0	708	0	0	606
		717	0	0	794	0	0	652	0	0			611
		742	infec.										
			+	0	701	0	0	617	0	0			632
			713	0	0	781	0	0	630	0	743	0	0
			725	0	0	727	0	0	647	0	796	0	0
												645	0
												775	0

n = nódulo  
N = necrosis

ENTO

		1/78		1/78	1/39		1/20		1/20					
12-I	13-I	14-I	15-I	16-I	17-I	18-I	19-I	20-I	21-I	22-I	23-I	24-I	25-I	26-I
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
p. ed	p. ed	ed	p. ed	p. ed	p. ed	N	0	0	0	0	0	0	0	0
p. ed	p. ed	ed	p. ed	ed	p. ed	p. ed	0	p. ed	m. ed	m. ed	ed. N	p. ed	p. ed	N
n	g. ed	ed	ed	ed	p. ed	p. ed	0	p. ed	ed	ed. N	N	p. ed	N	N
n	g. ed	ed	ed	ed	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed	0	p. ed	0	p. ed	N	N
N	g. ed	ed	ed	ed	p. ed	p. ed	0	+no dift	—	—	—	—	—	—
p. ed	ed	ed	ed	ed	p. ed	p. ed	0	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed	ed	N
p. ed	ed	ed	ed	ed	ed	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed	0	N	N
p. ed	ed	ed	ed	ed	p. ed	p. ed	0	0	p. ed	ed. N	ed	ed	ed	N
0	0	0												
p. ed	p. ed	p. ed												
p. ed	p. ed	ed												
p. ed	p. ed	p.ed.N												
—	—	578	rojo	p. ed	p. ed	0								
—	—	530	p. ed	p. ed	0	0								
rojo				565	0	0								
rojo				571	0	0								
					751	0	ed	p. ed	0					
					538	0	p. ed	p. ed	0					
									512	p. ed	ed	N	N	
									527	0	p. ed	N	N	

ción del primer edema las inyecciones se hacen cada tres días repitiéndose 3 veces la dosis de 1/78 D.L.M. Al llegar a la dosis de 1/20 D.L.M. muere un cobayo sin lesiones diftéricas, es decir después de 17 inyecciones. A la 18ª inyección todos los cobayos presentan necrosis, inclusive los testigos (1/20 D.L.M.) y muere un cobayo con lesiones diftéricas. A los 25 días de la primera inyección, se sangran los animales para dosar antitoxina circulante, teniendo todos ellos menos de 1/300 de unidad.

En ningún momento se notó diferencia importante entre las reacciones de los testigos y la de los animales del experimento.

### 2º EXPERIMENTO

b) 19 de Enero: Se hace 3 grupos de dos cobayos cada uno a los que se inyecta con 1/5, 1/10 y 1/20 de la D.L.M. de la misma toxina anterior.

Los dos cobayos inyectados con 1/5 de D.L.M. y que reaccionaron con gran edema, son reinyectados al tercer día uno con 1/10 y otro con 1/20 de D.L.M. Uno de ellos, el que había recibido 1/5 y 1/10 de D.L.M. murió al octavo día sin lesiones diftéricas.

El segundo grupo inyectado con 1/10 se vuelve a inyectar al tercer día con 1/10 y 1/20 respectivamente; el primero tiene necrosis mientras el segundo no tiene reacción.

La serie de los que habían recibido 1/20 D.L.M. tiene pequeño edema al primero y segundo día. Al tercer día se inyecta a uno 1/5 y al otro 1/10 y aparece un edema que dura pocos días. Los testigos con 1/5, 1/10 y 1/20 de la D.L.M. presentan las mismas alteraciones que los animales de la experiencia.

Las reacciones producidas por una misma dosis de toxina son iguales tanto en la primera como en la segunda inyección.

### 3º EXPERIMENTO

c) Esta experiencia se hace inyectando en vez de toxina extracto de gérmenes preparados siguiendo la técnica de O'Meara.

Se usan dos extractos (1 y 2) cuya D.L.M. es para el número 1 de 1 cc y para el número 2 de 2 cc. Se hace dos experiencias una con el extracto número 1 y otra con el número 2, inyectando en total media D.L.M.

Con el extracto número 1 se usa 3 series de cobayos: la primera serie se inyecta todos los días durante cinco días con 1/10 D.L.M. cada vez; la segunda serie se inyecta día por medio, y la tercera cada dos días.

19-I-42 D. L. M.	Cobayo N°	Resultado de la 1a. inoculación	
		20-I-42	21-I-42
1/5	405	g. ed	g. ed N
	495	p. ed	ed
1/10	429	p. ed	ed
	433	0	m. p. ed
1/20	447	p. ed	p. ed
	486	p. ed	p. ed
Cobayos testigos .....			N° 600 N° 534 N° 523

1/5 D. L. M. = 1/2.500

1/10 D. L. M. = 1/5.000

1/20 D. L. M. = 1/10.000

N = Necrosis.

\* I = Reacción de la 1a. inyección.

\*\* II = Reacción de la 2a. inyección.



## 2° EXPERIMENTO

Resultado de la 2a. inoculación				
22-I-42 D. L. M.	23-I-42	24-I-42	26-I-42	27-I-42
1/10 1/20	* I. g. ed N ** II. ed I. ed II. p. ed	ed N ed ed N ed	ed N p. ed ed N p. ed?	ed N p. ed N ed N p. ed
1/10 1/20	I. ed II. p. ed I. p. ed II. 0	ed p. ed ed 0	ed N p. ed p. ed N 0	ed N p. ed p. ed N 0
1/5 1/10	I. p. ed II. ed I. ed II. p. ed	p. ed ed ed p. ed	0 ed N p. ed N 0	0 ed N p. ed p. ed
1/20 1/10 1/5	m. p. ed ed ed	p. ed g. ed g. ed	p. ed g. ed g. ed	N ed ed

3er. E

*Cobayos inyectados t*

<i>Fecha</i>	29 x	30 x	31 x	1 x	2 x	3	4
<i>Extracto 1</i>							
346	—	ed	ed	ed	ed	p. ed	p. ed
370	—	p. ed	ed	ed	ed	p. ed	p. ed
<i>Extracto 2</i>							
394	—	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed
377	—	ed	ed	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed

*Cobayos inyectados dia*

<i>Fecha</i>	29 x	30	31 x	1	2 x	3	4 x
<i>Extracto 1</i>							
375	—	p. ed	p. ed	ed	p. ed	ed	p. ed
396	—	ed	ed	p. ed	p. ed	ed	ed
<i>Extracto 2</i>							
305	—	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed
391	—	0	0	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed

*Cobayos inyectados con dos día*

<i>Fecha</i>	29 x	30	31	1 x	2	3	4 x
<i>Extracto 1</i>							
362	—	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed
392	—	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed	p. ed
<i>Extracto 2</i>							
348	—	0	0	0	p. ed	p. ed	p. ed
338	—	ed	ed	p. ed	ed	ed	p. ed

x = días en que se practica la inoculación.

ENTO

s días con 1/10 de D.L.M.

5	6	7	8	9	10	11	12	13
p. ed p. ed	p. ed p. ed	p. ed +	0	0	0	0		
p. ed p. ed	p. ed m. p. ed	0 0	0 0	0 0				

edio con 1/10 de D.L.M.

5	6 x	7	8	9	10	11	12	13
ed ed	p. ed p. ed	ed p. ed	p. ed p. ed	p. ed p. ed	p. ed p. ed	p. ed 0	0 0	0
p. ed p. ed	p. ed p. ed	p. ed p. ed	p. ed p. ed	0 0	0 0	0 0		

intervalo con 1/10 de D.L.M.

5	6	7 x	8	9	10 x	11	12	13
ed ed	p. ed p. ed	p. ed p. ed	p. ed p. ed	p. ed p. ed	p. ed p. ed	p. ed p. ed	ed ed	p. ed p. ed
ed ed	0 0	p. ed p. ed	p. ed p. ed	0 p. ed	0 0	p. ed. p. ed.	0 p. ed.	0 p. ed

En todos los animales desde la primera inyección aparece un edema que luego va desapareciendo paulatinamente. Uno de los cobayos que recibió todos los días la inyección muere al 4° día de la última, pero se aísla un germen de sangre del corazón y las lesiones no son de difteria.

Con el extracto número 2 se hace lo mismo, inyectando cada día 0,2 cc. Los cobayos que se inyectan con dos días de intervalo presentan menos reacción que los inyectados diariamente.

Estos resultados revelan que la sensibilidad del cobayo no crece por la repetición de las inyecciones de toxina hasta los 15 días de la primera inoculación.

#### 4° EXPERIMENTO

d) En esta experiencia se ha usado 7 cobayos a los que un mes y 4 días antes se había inyectado 1 cc de extracto según O'Meara por vía subcutánea. La sangre de estos animales tenía menos de 1/300 de U.A. circulante; se les inyecta 0,001 de la toxina o sea media D.L.M. por vía subcutánea (toxina 1002), todos ellos presentan mayor o menor edema, que va aumentando paulatinamente para disminuir en unos y necrosarse en otros. Al tercer día de la inyección muere un cobayo con lesiones diftéricas; al cuarto día inyección muere un cobayo con lesiones diftéricas; al 6° y 15° mueren otros dos sin lesiones.

Estos resultados no difieren sensiblemente de los que se obtienen inyectando animales normales con la misma cantidad de toxina.

#### 5° EXPERIMENTO

e) En esta experiencia se trata de reproducir el fenómeno de Kretz, imitando la forma de su realización. Se preparan mezclas neutras de toxina-antitoxina (1 U.A. + 1 Lf) que en la dosis de 0,1, 0,01 y 0,001 de Lf se inyecta por vía intradérmica en 0,1 cm<sup>3</sup> a cobayos sensibilizados en la experiencia primera 13 días antes, son 13 inyecciones de toxina; además se inyectó un animal sensibilizado con una dosis de toxina, (testigo de la experiencia N° 1) y un cobayo normal. Todos los cobayos presentaron como única reacción un pequeño nódulo, no observándose diferencia entre los testigos y los animales sensibilizados.

4° EXPERIMENTO  
(Inyección de 1/2 D. L. M.)

Cobayo	Valor U. A.	3-II	4-II	5-II	6-II	7-II	9-II	10-II	11-II	12-II	13-II	15-II	18-II
807	— 1/300	p. ed	ed	ed	ed	ed	ed	ed N	ed N	ed N	+		
882	— 1/302	p. ed	p. ed	p. ed	ed	ed	+	suprarrenales ±, no hay otra lesión diftérica (edema benigno)					
830	— 1/301	0	p. ed	p. ed	ed	ed	ed	ed N	p. ed N	p. ed N	N	N	
900	— 1/300	p. ed	ed	g. ed	ed	ed	ed	ed N	ed N	ed N	ed	N	+
896	— 1/310	p. ed	ed	g. ed	ed	ed	ed	ed N	ed N	p. ed N	N	N	
761	— 1/300	0	ed	ed	+	suprarrenales ±, no hay otra lesión de difteria (edema benigno)							
871	— 1/300	p. ed	g. ed	+	con lesiones diftéricas								

## 5° EXPERIMENTO

	0,1 Lf	0,01 Lf	0,001 Lf
<i>Cobayo N° 720</i>			
1er. día .....	n	n	n
2° » .....	n	n	n
3er. » .....	n	n	n
<i>Cobayo N° 784</i>			
1er. día .....	n	n	n
2° » .....	n	n	n
3er. » .....	n	n	n
<i>Testigo N° 775</i>			
1er. día .....	n	n	n
2° » .....	n	n	n
3er. » .....	n	n	n
<i>Cobayo sano N° 734</i>			
1er. día .....	n	n	n
2° » .....	n	n	n
3er. » .....	n	n	n

n = pequeño nudo.

## 6° EXPERIMENTO

f) Se usa dos cobayos del experimento N° 1 (después de 13 días), dos testigos del mismo experimento y 2 cobayos nuevos, inyectándolos por vía intradérmica con toxina. Todos los cobayos reaccionan de la misma manera; dan reacción positiva con la dosis de 1/1000 a 1/2000 de la D.L.M. y no dan reacción con 1/4000.

## 6° EXPERIMENTO

Cobayo N°	Dosis letales mínimas		
	1/1.000	1/2.000	1/4.000
Seunlizado 730	++	++	0
Seunlizado 780	++	+	0
Testigo 611	++	++	0
Testigo 632	++	+	0
Sano 764	++	+	0

### CONCLUSIONES

1° — De nuestras experiencias se deduce que no es posible conferir hipersensibilidad diftérica a los cobayos (fenómeno de Behring) por inyección de toxina diftérica en las condiciones experimentales expuestas.

2° — Los cobayos inyectados varias veces con toxina no contienen antitoxina diftérica en la sangre.

### BIBLIOGRAFIA

- (1) BEHRING. — *Deutsche Med. Woch.*, **19**, 1253-56. 1893.
- (2) BEHRING y KITASHIMA. — *Berliner Klin Woch*, N° 6, 1901, pág. 157.
- (3) NICOLLE. — *Annales Inst. Pasteur*, **22**, 28, 1908.
- (4) ZIRONI. — 1923, pág. 311, en *Anafilassi*, Inst. Seroterapico Milanese.
- (5) KRETZ. — *Kraus y Levaditti*, **2**, 23, 1909.
- (6) VLADIMIROFF. — *Zeits. f. Hyg.*, **15**, 405.