

**UNIVERSIDAD CENTRAL (MADRID)
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**La vacunación antidiftérica por la anatoxina específica :
(estudio clínico en relación, especialmente, con la profilaxia
infantil)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Florencio Moreno de Vega y Soler

Madrid, 2015

R. 52608.

TA 910

-1-

**LA VACUNACIÓN ANTIDIPTÉRICA
POR LA ANATOXINA ESPECÍFICA**

*(Estudio clínico en relación, especial-
mente, con la profilaxia infantil)*

Teste de Doctorado

por

FLORENCIO MORENO DE VEGA Y SOLER



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5315110124

A LA SACRADA MEMORIA DE MIS PADRES

A LA MEMORIA DE MI MAESTRO,
EL DOCTOR L L O R E N T E,
ACREEDOR A LA OFRENDA DE TODO
ESTUDIO ESPAÑOL SOBRE DIFTERIA

v

A LOS DOCTORES J. y J. MEGIAS,
DIGNOS CONTINUADORES DE LA OBRA
DE LLORENTE, QUE TANTO HONOR ME HACEN
ADMITIENDO MI MODESTA COLABORACION Y
MERCED A CUYO CONCURSO HE REALIZADO ESTE TRABAJO

Señores Profesores:

Desde 1895 en que Roux instituyó la sueroterapia específica, la mortalidad por difteria ha decrecido notablemente y la morbilidad misma se ha reducido ante su influjo. Pero como la acción profiláctica del remedio de Roux es pasajera y la acción curativa, está sujeta, como todo hecho biológico, a la mudanza tan alejada de lo absoluto, se imponía intentar en esta enfermedad el ideal común a toda la patología infecciosa: la profilaxis duradera. Esta profilaxis fué lograda por Behring en la especie humana mediante una vacuna que tenía precedentes experimentales y que fué el punto de partida de una fecunda investigación, especialmente por parte de los americanos.

Se había conseguido lo fundamental: la inmunidad. Pero faltaba todavía que esa inmunidad se instalara en plazos breves y, sobre todo, que la estabilidad de las vacunas pusiera al abrigo de todo

peligro. Y este fué el triunfo de Ramon que supo ir más allá en la aplicación de hechos ya del dominio de la Biología.

Nosotros que tuvimos por maestro a Llorente y en cuyo Instituto hemos seguido atentamente el progreso del estudio acerca de la difteria, hemos creído un deber elegir como tema para el trabajo que sella la terminación de nuestra vida escolar, esta cuestión que encierra una novedad íntimamente relacionada con lo que ha sido objeto de nuestra labor médica y con la más singularizada aportación de nuestro maestro; trabajo modestísimo, como nuestro, pero fervorosamente realizado, como por quien aspira al asentimiento de superior jerarquía.

Y antes de entrar en materia quede consignado aquí mi respetuoso recuerdo a mis maestros universitarios, algunos ya desaparecidos, a todos debo eterna gratitud por lo que pude ser. No pudieron hacer más por mí, ni puedo decir más en su honor.

**LA VACUNACION ANTIDIFTERICA ANTES DEL DESCUBRIMIENTO DE LA
ANATOXINA**

La idea de conferir inmunidad activa para la difteria es intento cristalizarla desde un principio recurriendo a la toxina sin modificar. Dzerjgowski trabajó en éste sentido en 1902 sin lograr mas que debilísimas cantidades de antitoxina. Este mecanismo exige mucho tiempo y muchas inyecciones. Su valor práctico es nulo, pero la posibilidad de lograr la inmunidad exclusivamente por la toxina es un hecho cierto modernamente comprobado (Opitz, Bieber y Bauer).

En fecha reciente se ha resucitado, en cierto modo, por Böhm (7) el procedimiento de Petruschky (1912), Ambos han recurrido a los bacilos para inmunizar. Petruschky empleó bacilos muertos incorporados a una pomada y Böhm emplea bacilos vivos que inocula por escarificación, como se hace con la vacuna Jenneriana. Los resultados que obtuvo el primero fueron poco favora-

bias, y los del segundo estén en periodo de comprobación; pero en teoría, cuando menos, repugna a la razón la inocuidad de una escarificación con bacilos vivos, sobre todo por lo que respecta a la posibilidad de auto o hetero-inoculaciones.

Desde muy lejana fecha se ha asociado la toxina y el suero específico para la inmunización de los animales (Behring y Wernicke en 1892, Babés en 1895, Park en 1905) y T. Smith vió la extensión del procedimiento a la especie humana. Sin embargo, no se llega a un estudio metodizado hasta Behring en 1913. Poco después la escuela americana, a cuya cabeza hay que colocar a Park y Zingher, emprendió la investigación que llegaron a metodizar después de una amplísima experiencia.

Así, pues, cuando en 1925 surgió el descubrimiento de Ramon, la vacunación antidiftérica se practicaba mediante mezclas de toxina y antitoxina diftéricas. Estas mezclas eran subneutras

neutras, debilmente antitóxicas o acentuadamente antitóxicas. A las primeras correspondían las vacunas de Behring, Park y Zin- gher; a las segundas las de Blum y Bieber y a las de los dos últimos grupos las de Löwenstein y de Ranaut y P. Levy; advir- tiendo que estos procedimientos fundamentales se han modificado por numerosos experimentadores existiendo tantas fórmulas como médicos han trabajado en profilaxia diftérica.

Las mezclas vacunaban; algunas en un periodo mayor del que a priori establecieron sus autores. El problema fundamental estaba resuelto. Ahora bien, ¿en que condiciones vacunaban?

La idea directrix era modificar la menos posible las to- xinas; por eso se terminó por donde logicamente se debía haber empezado, puesto que las mezclas hiperantitoxicas, que han sido las últimas en utilizarse, parecia lógico que por su inocuidad hubieran sido el primer recurso de la profilaxia. Nada de esto

se hizo, precisamente, porque todo se cifraba en no modificar la toxina. La experiencia decía que la mezcla mas toxica inmunizaba mejor, cuando la experimentación era todavía limitada, pero cuando se amplió debidamente se modificó este concepto.

Facunaban las mezclas y, refiriéndonos a la impenente experiencia de Park y Zinnger, lo hacian en un periodo que oscilaba entre una y seis meses, cifras en cuanto al periodo máximo iguales a las señaladas por Renault y Levy para su vacuna hiperantitóxica.

Exigian estos métodos, en términos generales, tres inyecciones, y se conseguia el 85% de inmunizaciones según Park y del 80 al 90% al decir de Renault y Levy, citando con esto los trabajos que eran de reciente fecha cuando apareció el descubrimiento de Ramon.

Desde luego la garantia de la inmunización la presentaban

las estadísticas de morbilidad y mortalidad que comprobaban las profundas diferencias entre los lotes vacunados y los lotes indefensos ante las epidemias, pero la mayor parte de los testimonios de protección los ha prestado la reacción de Schick, y, en menor escala, por lo laborioso del procedimiento, la determinación de las unidades antitóxicas en el suero de los vacunados.

¿Tenía peligros el empleo de las mezclas? Quien considere la evolución ^{que} del método ha seguido desde Behring hasta Renáult y Levy, o sea haciendo el producto cada vez mas rico en antitoxina, siendo así que en un principio parecían todos convenir en la excelencia de la mayor toxicidad para el fenómeno de la inmunización, comprenderá que el procedimiento estaba muy lejos de ser inocente. Aparte las reacciones locales, inflamatorias, elevación térmica y malestar, de carácter

pasajero, privativos de muchos procedimientos profilácticos, se han registrado casos de fenómenos graves y mortales consecutivos a la vacunación por el método de las mezclas.

El peligro radica en que se trata realmente de una mezcla y no de una combinación verdadera. De aquí que en circunstancias poco precisadas se hagan tóxicas. Ejemplos: los seis casos de muerte acaecidos en Dallas (Estados Unidos) a consecuencia de la vacunación por mezclas; los fenómenos graves producidos por mezclas congeladas en cuya génesis han arrojado tanta luz los trabajos de Anderson y Leonard que atribuyen importancia a la forma de la antitoxina empleada y a la sustancia conservadora (1); finalmente, el relato de Helmreich (E). (26). Según este autor, con motivo de un caso de difteria surgido en un asilo de Baden en Septiembre de 1924, se vacunó a 40 niños con mezcla hiperneutralizada, según el método de Bussen-Löwenstein y murieron seis con sín-

temas locales y generales de intoxicación difterica, presentando otros de los supervivientes escaras de dimensiones variables. Quedó demostrado biologicamente que algunas ampollas se habian hecho tóxicas por disociación de los componentes. Con éste motivo Pirquet informó al consejo superior de Higiene diciendo que como la difteria desde 15 años antes no habia sido grave en Austria, no procedia sustituir la sueroterapia preventiva por la vacunación activa y se publicó un decreto prohibiendo esta.

Se habia señalado otro inconveniente al método de las mezclas. Nos referimos a la posibilidad de sensibilizar para el suero que en procesos posteriores fuera preciso administrar. Esto que ha sido sin duda algo exagerado, seria lo de menos. Aparte el método de Park y Banzhaf que reduce el peligro al minimo (50) podia obviarse este inconveniente empleando antitoxina de

suero de especie animal menos usada que el caballo.

El método de las mezclas unia per consiguiente a su complicada preparación, la acción lenta y la posibilidad de contingencias desagradables.

Faltaba, pues, que la vacunación antidiptérica pudiera hacerse con un producto estable que una vez comprobado no se modificara mas, si acaso, que en el sentido de perder actividad; nunca en el de acrecer su toxicidad. Esto es, desde luego, lo mas importante del método cuyos resultados de nuestra experiencia expendremos después.

-15-

L A A N A T O X I N A

Cuando se hicieron públicos los trabajos de Ramon, era ya muy conocido el ^{mét.} ~~manejo~~ de la preparación de su vacuna. La toxina modificada por el calor simplemente (65°-70°) había sido empleada por Karl Fraenkel en 1890, para inmunizar a los animales, con resultados positivos; procedimiento recomendado recientemente por Potts, incluso para el hombre. Se conocía también la acción atenuadora de ciertos cuerpos químicos sobre las toxinas diftéricas y tetánicas. Anderson (1907) había observado que la adición de formol (5%-5%) a las toxinas diftéricas y tetánicas hacía a estas sustancias inactivas para el cobayo. Glenn y Südmersen en 1921 observaron que el formol priva a la toxina diftérica de su poder tóxico para el conejo de Indias, inmunizándole a su vez, y Glenn y Hopkins en 1923

(22) publicaren un método de vacunación a base de la toxina modificada por el formaldehído, mezclada con toxina activa, pensando todavía en la necesidad de la toxina libre. Al 1921 corresponden las observaciones de Löwenstein y Eteler y Silvershtein, sobre la modificación de la toxina tetánica por el formol de modo que perdida la toxicidad goza de propiedades inmunizantes. Finalmente, la acción que en el mismo sentido ejerce el tódo (Behring empleó el tricloruro de tódo y Roux y Martin el líquido de Gram) cuya propiedad ha tenido aplicaciones en las primeras inoculaciones de la inmunización de los animales denantes de suero antidiftérico, es un hecho muy conocido.

El mérito de Ramon consiste en haber descubierto la estrecha relación del poder floculante, tóxico y antigénico de la toxina diftérica y en haber demostrado la posibilidad de hacer atoxi-

es una toxina sin menoscabo de la propiedad floculante, lo que permite valorar su poder antigénico (inmunizante), habiendo perdido el poder tóxico. Además, a Ramon corresponde, también, la prioridad en el ensayo en la especie humana de éstas toxinas modificadas por agentes físico-químicos.

Concretando diremos que Ramon en 1923 descubrió que la toxina diftérica modificada por el formol (3 por mil) y el calor durante cuatro a seis semanas, perdía su poder tóxico pero conservaba el floculante frente a la antitoxina y el antigénico (56). Además, el producto así obtenido que denominó anatoxina, confería inmunidad al cobayo y permitía esperar que la conferiera a la especie humana (55). Este intento pudo realizarse basándose en la inocuidad de la anatoxina. Ramon hizo el ensayo en sí mismo administrándose 0,25 c.c. subcutáneamente, sin experimentar otros fenómenos que ligero enrojecimiento local. Per

otra parte, 6 c.c. o mas de anatoxina inocularos al cobayo no producan en este animal la menor alteración.

La conjuntivo-queratitis que puede provocarse en el cobayo, previa acción de la bilis, por el contacto de los bacilos diftéricos y que no se produce administrando antitoxina (Zoeller y Manoussakis) (80), es también evitada por la anatoxina, inyectando al animal dos veces un c.c. del producto (Zoeller). No tiene acción, sin embargo, sobre la infección constituida, como ha comprobado Zoeller (79). No obstante, si se asocia la anatoxina al suero, se cura antes la lesión que con el suero solamente.

La anatoxina es muy estable. Conserva su poder floculante largo tiempo aun a 20° de temperatura. Además, en contraposición a la toxina, puede ser calentada a 65°-70° sin perder

su poder de inmunizar y floccular (57). Esto es muy interesante por que permite tindalizarla.

Puede transformarse también la toxina diftérica en anatoxina por otras substancias que el formol; Berthelet y Ramon (5) han ensayado la acroleína, el aldehído crotonico, el aldehído etílico y la uretropina, si bien se han mostrado como menos aconsejables. Picoó y Miravent (53) han estudiado también otros aldehídos que el formol y han hecho experiencias con el aldehído etílico y el benzaldehído que, en efecto, atenuan in vitro la toxina diftérica. Estos últimos autores buscaban la atenuación in vivo y han obtenido resultados interesantes empleando productos de hidrólisis de la glucosa por los alcalis y el calor, que gozan, entre otras, de la función aldehídica. El logro perfecto de sus intentos resuelve la quimioterapia de las toxemias.

Anatoxina parece ser también el producto de la actuación sobre las toxinas diftérica y tetánica del jabón de aceite de ricino (ricinoleato sódico), estudiado primeramente por Larson y Nelson, de indudables propiedades inmunizantes sobre los cobayos y conejos y cuyos buenos resultados de la aplicación al hombre constituye el objeto de una reciente nota de Larson y Howard Eder (31).

Baritin y sus colaboradores (3) han profundizado en el mecanismo de la pérdida de la toxicidad de la toxina diftérica. Como los aldehidos se unen al grupo amino de los aminoácidos sin afectar al grupo carboxílico, que permanece libre, con acidificación del medio; así, según los autores citados, se verificaría la acción de los aldehidos sobre la toxina diftérica; es decir, combinándose con sus grupos amino, sin

reversibilidad de acción, como lo prueba la posibilidad de hacer tóxica la anatoxina por adición de sosa. A su vez dichos experimentadores han conseguido también anular la función tóxica de la toxina diftérica por adición de ácidos cuyo efecto se produce a un pH determinado (5,5-4) y de bases que actúan sobre el grupo carboxílico, verificándose en ambos casos una reacción reversible.

En los trabajos precedentes a los de Raan se atribuyen a las toxoides las propiedades inmunizantes de las toxinas modificadas del modo expuesto. Toxoide denominan Glenn y Hopkins (22) a la toxina modificada por el 0,1 por ciento de formal, y a la riqueza en toxoides opina Nelis (49) que está ligado al poder antigénico de la anatoxina. Sin embargo, el mismo autor cree que radica también, en parte, dicho poder en

otros factores, fundándose en que es posible obtener cierta inmunidad en un periodo de alrededor de dos meses en lotes de cobayas que son inyectadas con toxina modificada por estancia de seis meses en estufa, por acción del oxeno o por la del oleato de sosa. Los productos resultantes, desprovistos de poder tóxico, no contienen toxoides (susceptibles de neutralizar una fracción de antitoxina) a excepción del último que ostenta indicios y no obstante goza de cierto valor antigénico.

Igualmente inclina a pensar en el factor toxoide de la anatoxina, las experiencias de Schroder y Park (72) que reflejan ejemplos de acción inmunizante desplegada por aquel factor al mismo tiempo que no dudan en atribuir el poder inmunizante de las mezclas a la reducción al estado de toxoide, así como a la combinación del todo con la toxina en las antiguas mezclas

de Behring.

Ramen, a pesar de esto, olama contra este modo de ver y aduce que no hay nada de común entre las anatoxinas confeccionadas por el calor prolongado o por calor y el formaldehído y las toxoides, pues aquellas gozan de tres caracteres peculiares: inocuidad, poder floculente y poder inmanizante y las toxoides no se han caracterizado jamás sino por la propiedad de neutralizar la antitoxina libre (58). El como del fenómeno es por lo tanto obscuro. La lectura de lo mas recientemente publicado sobre el problema induce a pensar en hechos que acaso aclarare en breve plazo la fisico-química.

LOS TRABAJOS CLINICOS ACERCA DE LA ANATOXINA

Los primeros trabajos clínicos.— Los primeros trabajos clínicos publicados sobre anatoxina corresponden a Martín, Darre, Loiseau, Laffaille, Reubinevitoh y Zoeller (39,11,66,78) ^{que} ensayaron en la especie humana este producto tan estable, incluso para el cobayo (6 c.c. en inyección subcutánea) y creador en el mismo animal de una inmunidad ^{tal} que previene la conjuntivo-queratitis experimental y que 10 a 15 días después de administrarle una inyección de 1 c.c. soporta varias dosis mortales de toxina diftérica.

Martín relata los trabajos de la Comisión que experimentó el producto, que en resumen obtuvo el 86% de inmunizaciones con

dos inyecciones de 0,5 c.c. y 1 c.c. distanciadas por 8 días de intervalo. Los no inmunizados con éstas dos inyecciones se inmunizaban con una tercera inyección de 1 c.c.

Darré, Leiseau y Laffaille, estudiaron la producción de antitoxina por la acción de la anatoxina, que en los sujetos con Schick negativo y mediante dos inyecciones de 0,5 c.c. y 1 c.c., y, en ocasiones, una de 0,5 c.c. era muy ostensible en plazos a veces muy breves (8 a 9 días). En los individuos con Schick positivo era menos marcado el fenómeno.

La reacción local, según estos autores, era ligera o nula. En una ocasión observaron viva reacción en un convaleciente de difteria (placa inflamatoria dolorosa y reacción ganglionar durante 3 días) explicando el fenómeno en un trabajo posterior (12) como resultado de reacción ante un coloide heterógeno; modo de ver, a nuestro juicio, que podría modificarse a la luz de

las modernas concepciones de Zoeller.

La curva térmica experimenta en los casos observados por Darré y sus colaboradores, dos o tres elevaciones, rara vez superiores a 38°, entre 6 y 40 horas posteriores a las inyecciones de anatoxina, que aconsejaban fueran dos (de 0,5 c.c. y 1 c.c.) con 15 días de intervalo.

El trabajo de Roubinovitoh, Lefseau y Laffaille se basó en la inmunización controlada por la reacción de Schick, que practicaron de 14 a 40 días después de una primera inyección de 0,5 c.c. de anatoxina; 16 a 25 días después de una segunda inyección de 1 c.c., en los casos que con la primera no se inmunizaban, y 18 después de la tercera (de 1 c.c.) cuando la segunda tampoco había triunfado. En el 98,8% la reacción de Schick se hizo negativa en menos de 70 días. Los vacunados no presentaban

reacción local en el 80% de la primera inyección y en el 60 de la segunda. En el resto aparecía ligero empastamiento y rubefacción locales que en dos o tres días desaparecían. Observaren reacciones mas energicas, con placa de edema duro, sobre todo en los casos de pseudo-reacción de Schick. La reacción térmica en la primera inyección rebasaba los 39° en un 10%.

La aportación de Zoeller se referia a la vacunación en el adulto que practicó mediante 3 inyecciones de 0,5 c.c., un c.c. y 1,5 c.c., deduciéndose del estudio en cuestión que con este proceder en seis semanas se inmunizaban todos los sujetos receptivos.

En Octubre de 1924 Henseval y Nelis (27) dieron cuenta de una estadística de 20 niños con Schick positive vacunados con dos inyecciones de 0,5 c.c. y 1 c.c. de anatoxina, adminis-

tradas con 20 días de intervalo. En 16 de estos vacunados se repitió el Schick a los 35 días de la primera inyección siendo negativa en 15.

Finalmente, como una de las aportaciones de mayor interés puede considerarse la de Zingher, tan decidido defensor del método clásico de las mezclas, que ha encontrado positivas ventajas del procedimiento de Ramon sobre sus precedentes (89).

Modificaciones al método primitivo de vacunación por la anatoxina.— En los dos años transcurridos después de estos primeros trabajos, se han confirmado los puntos fundamentales, a saber: 1º.—La estabilidad y la inocuidad de la anatoxina. A los 12 meses de preparada se comporta con el cobayo del mismo modo que inmediatamente después de su preparación (Barikin, Kulikow, etc.) (3). Además, jamás ha experimentado reacción reversible que la haga tóxica, como es lógico deducir de la multiplicidad de inyecciones administradas. Hasta Mayo de 1926, Martín, Lefseau y Laffaille (41) tenían noticia de 8000 vacunados en Francia, sin que se haya observado accidente alguno de gravedad. Hay que sumar a esta cifra los trabajos realizados fuera de Francia por Nelis (49), Nasse (48), Barikin y sus colaboradores (3), Glouxeman, Solovieff, Gladstern (23) etc. 2º.—La eficacia de la anatoxina.— Todos los que han seguido la marcha de

la inmunización en los vacunados, han comprobado la eficacia de la anatoxina, controlada unas veces por la reacción de Schick y otras por la dosificación de las unidades antitòxicas del suero sanguíneo. Noventa y ocho por ciento de inmunizaciones obtuvo Masse (48) a los 2 meses de la primera inyección de anatoxina, de las dos que aplicó con 20 días de intervalo a 108 niños con Schick positivo. Noventa y siete por ciento obtuvo Barikin (3) a las 5 semanas de la última inyección de anatoxina, de las dos que administró con 3 semanas de intervalo a 78 niños con Schick positivo. Darré, Loiseau y Laffaille (13) empleando el método de Römer han comprobado en tres vacunados que al cabo de un año, aproximadamente, contenía el suero sanguíneo 9, 5 y media unidad; es decir, cuando menos una cantidad superior a 1/30 de unidad, que es suficiente para as-

gurar la inmunidad. Y, desde luego, indiscutiblemente eficaces han sido los resultados obtenidos por Zoeller (86) Lereboullet, Boulangier-Pilet, Gournay, Lesné, Reubinevitch, Loiseau y Laffaille (52 y 67) en este periodo de dos años que ha mediado entre las primeras publicaciones y el comienzo de nuestras experiencias. Pero estos últimos autores han realizado su labor con otro criterio, producto de la experiencia adquirida en todo el tiempo indicado. Y es que ha experimentado el primitivo procedimiento una modificación importante: el número de inyecciones y sus intervalos. Las primeras estadísticas por su pequeñez no permitieron juzgar en buenas condiciones. Después se ha visto que si bien muchos individuos se inmunizaban con dos inyecciones, otros necesitaban tres para lograrlo y al decir de los más recientemente publicado por

los franceses, esta triple administración consigue el 100% de inmunizaciones.

Otra modificación importante es la duración de los intervalos entre las inyecciones. La experiencia ha demostrado la conveniencia de espaciarlas bastante. Según Zeeller dos inyecciones muy próximas rinden poco mas que una sola. Deben espaciarse tres semanas. De este modo la primera inyección que crea lo que llama Zeeller la reactividad adquirida podrá en mejores condiciones manifestar el resultado de dicha reactividad con las inyecciones sucesivas. Juega en esto un gran papel el factor individual, modificable por los contactos microbianos anteriores.

LAS PRUEBAS BIOLÓGICAS PARA DETERMINAR LA INMUNIDAD

PRODUCIDA POR LA ANATOXINA DIFTÉRICA.

Para juzgar la inmunidad creada por el experimentado procedimiento vacunante de las mezclas, se empleó la investigación de la proporción de antitoxina de la economía del vacunado, porque la experiencia, dilatada sobre todo en Norte-América, había demostrado que éste dato podría ser un mero testigo de resistencia ante la infección diftérica, pero era un testigo de indudable utilidad.

En efecto, en bacteriología diftérica la seroaglutinación y la desviación del complemento, implican la necesidad de un suero antimicrobiano conseguido tras laboriosa preparación de los animales donantes; en definitiva servirán dichos métodos para

clasificar razas microbianas pero no para nuestro objeto, puesto que tan alto grado potencial antimicrobiano no puede esperarse de la sangre problema que hemos de investigar.

En cambio, la valoración de las unidades del suero sanguíneo por el método de Römer, bien interpretado, y sin intentar de él la exactitud matemática que es imposible pedir a los procedimientos biológicos, podrá prestarnos no ya el dato cualitativo, en cierto modo, de la reacción de Schick, sino un dato cuantitativo de interés.

Reacción de Schick y valoración de unidades por el método de Römer, fueron en un principio nuestros medios de apreciar el grado de inmunidad conseguido en nuestros vacunados; pero en Julio de 1926 el trabajo de Decamps (14) nos invitó a ampliar nuestros medios de observación con la reacción de desviación del complemento que dicho autor preconiza.

En este capítulo expondremos nuestra experiencia acerca de los tres métodos, con la aportación personal referente a la técnica, y fundamentaremos nuestra elección por el procedimiento adecuado a la clínica.

Reacción de Schick. - *Es un asunto muy tratado y muy debatido. De la controversia ha nacido el puesto que corresponde a la prueba llevada a la clínica por Schick (1915) fundándose en las experiencias de Römer.*

La reacción de Schick ha tenido muchos detractores. Se la ha tachado de inespecífica fundándose en que se puede hacer negativa por inyección de suero no antidiptérico (Spolvirin) y en la falta de paralelismo con la proporción de antitoxina circulante. El primer argumento afectará a la génesis del fenómeno de la prueba de Schick, pero no a su valor clínico. El

segundo debe ser interpretado: la valoración de la antitoxina circulante dista mucho de ser exacta y no se prestan éstas determinaciones a formar un juicio definitivo.

Los argumentos en contra expuestos por Wolff-Eisner afectan también al mecanismo del fenómeno. Dicho autor concede importancia no solo a la cantidad de antitoxina circulante sino al poder de acarreo de los capilares para el plasma portador. Por eso se pronuncia en favor de los métodos que permiten la combinación in vitro de la toxina con la antitoxina. Niega, además, Wolff-Eisner que toda la importancia de la inmunidad antidiftérica resida en la antitoxina, invocando el poder bacteriocida y los procesos no específicos, cuya opinión en parte confirma Park por la observación de propiedades bacteriocidas para el bacilo de Loeffler con ausencia de antitoxina en el suero sanguíneo de niños inmunizados para la difteria por haber sufrido la infe-

ción.

Però al lado de estas objeciones, la dilatada experiencia de estos catorce años no arroja un caso verdaderamente demostrativo de fracaso absoluto en la significación de la reacción de Schick. Aquí lo primordial es que un individuo Schick-negativo no llegue a padecer la difteria o padezca una forma banal, y esto en las colectividades que han padecido focos epidémicos ha sido la regla general en las estadísticas nacionales y extranjeras (Vincent, Graaf y Ginsberg, Renault y Levy, Bundesens, Guinon, Merry, Pillard y Zoeller, Dudley, Park, Zingher, Bravo, Muloyerre y Tapia, etc.)

Radique donde sea la esencia del fenómeno de la inmunidad antidiftérica, lo positivo es que la antitoxina desempeña un papel de primer orden y si no lo es todo, es una mayor par-

te, cuando menos en nuestro caso, de las posiblemente inmunizados, representa un testigo bastante fiel. Así puede establecerse que un individuo Schick positivo contiene en su sangre menos de 1/30 de unidad por c.c. y es receptible, siquiera todas las infecciones diftéricas no tengan la misma virulencia y pueda triunfar el sujeto aun con Schick positivo.

Naturalmente que la antitoxina no lo es todo en la inmunidad antidiftérica. El hecho de encontrarse portadores de bacilos virulentos con Schick positivo sin lesión olínica, nos dice ya que existen otros factores; acaso la defensa local lograda experimentalmente en la conjuntiva y la córnea del cobayo por Bowen (8) y no conseguida por Zoeller y Manoussakis (81). Pero este hecho mismo no va en contra de nuestro criterio. Tal caso hubiera conducido a considerar como receptivo a un inmunizado. Es el

hecho sin peligro. En cambio no se ha demostrado que un individuo Schick-negativo padezca una difteria grave, tóxica.

Errores de la reacción de Schick debidos a la técnica.-

La exacta valoración de la toxina, es primordial. Hay que hacerla empleando muchos cobayos de condiciones biológicas muy próximas. No basta valorar bien la toxina si no está bien estabilizada. Además, el continente de las toxinas tiene que ser de vidrio neutro; un vidrio alcalino es fuente de deterioro para la toxina (Park). La dilución tiene que ser reciente.

Aun contando con una toxina irreprochable podemos obtener errores por la técnica de la inyección. Sobre todo haciendo la inyección a extensas colectividades es muy fácil incurrir en una técnica defectuosa.

Hay individuos en quienes se obtiene con mayor dificultad una inyección intradérmica correcta. Jamás nos daremos por sa-

tiempos sino hemos obtenido la elevación blanca bien característica. Sin saber por qué, en algunas personas aun no habiendo conseguido la elevación o se^N aun habiendo depositado la toxina algo mas profundamente, la reaccion se manifiesta bien, pero en la inmensa mayoria de los sujetos la prueba de Schick solo dá signos manifiestos a consecuencia de inyecciones intradérmicas perfectas. He aquí un caso muy demostrativo observado por nosotros: H. J. seis años. Se le practica inyección de tóxima en el brazo derecho y de toxina calentada en el izquierdo.

A las 48 horas se observa en el brazo izquierdo zona roja; en el derecho nada. Al tercer día nada en ambos brazos. Esto era paradójico. Una pseudo-reacción tenia que manifestarse también en el brazo derecho. Sospechamos una técnica incorrecta

y se repitió la prueba cuidando mucho la práctica de la inyección. El resultado fué concordante con lo que la lógica imponía.

Errores debidos a la lectura.- Se ha dicho muchas veces que la pseudo-reacción de Schick es pasajera, estableciéndose que basta con dos lecturas: a las 24 horas (pseudo-reacción) y al tercer día (reacción positiva). También se ha dicho que a un observador adiestrado le es suficiente con realizar la inyección con toxina fría. Todo esto ocurre muchas veces, pero no siempre. Nosotros hemos observado muchos casos de reacción combinada con persistencia de la pseudo-reacción hasta el tercer día y hemos visto también cinco casos de pseudo-reacción pura, intensa, que se prolongó hasta el quinto día. Por consiguiente, no podemos aconsejar la lectura definitiva al tercer día ni su-

eribir la opinión de una sola inyección con toxina sin calentar, prescindiendo de la control-prueba con toxina calentada.

En nuestras referidas observaciones hubiera sido imposible hacer la lectura sin obtener un resultado falso, porque las tonalidades de la placa roja, descritas como distintas en la pseudo-reacción y en la reacción positiva, en numerosos casos presentan marcada analogía.

Conviene siempre, pues, hacer tres exámenes: uno a las 48 horas, otro al tercer día y otro al 5º o 6º día, para eliminar los casos de pseudo-reacción prolongada. Y no solo aconsejamos ésta técnica para la investigación de receptibles, sino para hacer el estudio de los inmunizados por la anatoxina. Hemos visto varios casos en que la vacunación por la anatoxina ha determinado pseudo-reacción. Si en estos casos se hace solamente la intradermoreacción con toxina sin calentar, es posible

llegar a una conclusión errónea. Una pseudo-reacción algo intensa, algo prolongada, puede hacernos pensar en un estado de receptibilidad post-vacunal que no existe. Algunos casos de nuestra estadística, son muy demostrativos, como en su lugar decimos.

Dosificación de las unidades antitoxicas.-

La lesión producida en la piel del cobayo por la anatoxina diftérica constituye un reactivo muy adecuado para la dosificación de las unidades antitoxicas, porque merced a las pequeñas cantidades de toxina que se necesitan practicando la inyección intracutanea, pueden hacerse por lo menos dos pruebas en cada animal.

Hemos seguido, por tanto, el método de Bömer con arreglo a la técnica seguida por Darré, Loiseau y Laffaille (12).

Nosotros hemos operado con el suero patrón del Institute

de Francofort y la toxina estabilizada que empleamos para la reacción de Schick.

En primer lugar hay que determinar la cantidad de toxina que es neutralizada por una décima de unidad antitóxica. Para esto se hace una dilución del suero patrón de modo que en un centímetro cúbico haya una décima de unidad antitóxica, mezclando en una serie de tubos un c.c. de ésta solución con un c.c. de soluciones de distinta concentración de toxina.

Soluciones de toxina.

Toxina		Solución salina	Título
1 c.c.	+	9 c.c.	1/10 (A)
1 c.c. dilución A.	+	0,5 c.c.	1/15 (B)
1 c.c. dilución A.	+	1,5 c.c.	1/25 (C)
1 c.c. dilución A.	+	2,5 c.c.	1/35 (D)
1 c.c. dilución A.	+	4 c.c.	1/50 (E)
1 c.c. dilución A.	+	5 c.c.	1/60 (F)
1 c.c. dilución A.	+	6 c.c.	1/70 (G)
1 c.c. dilución A.	+	9 c.c.	1/100 (H)

Practicadas éstas diluciones se hace la mezcla con el suero antitoxico patrón del siguiente modo.

Soluciones de toxina

**Solución de suero conteniendo
per c.c. una décima de unidad
antitóxica.**

1 c.c. dilución A.	+	1 c.c.
1 c.c. dilución B.	+	1 c.c.
1 c.c. dilución C.	+	1 c.c.
1 c.c. dilución D.	+	1 c.c.
1 c.c. dilución E.	+	1 c.c.
1 c.c. dilución F.	+	1 c.c.
1 c.c. dilución G.	+	1 c.c.
1 c.c. dilución H.	+	1 c.c.

Estas mezclas se colocan en la estufa a 37° y a las 2 horas se trasladan a la refrigeradora donde se dejan durante 24 horas. Entonces de cada una de dichas mezclas se inyecta una décima de c.c., intradérmicamente, en la región abdominal del cobayo, haciendo depilación previamente. Nosotras hacemos cuatro inyeccio-

nes en un mismo animal y verificamos la lectura de los resultados desde el cuarto día en adelante. Supongamos que el resultado obtenido haya sido el siguiente:

Dilución de toxina	Suero-patrón 1/10 de U.A. por c.c.	Lesiones en el cobayo
1/10 = 1 c.c.	1 c.c.	escara (+ + +)
1/15 = 1 c.c.	1 c.c.	escara (+ + +)
1/25 = 1 c.c.	1 c.c.	escara (+ +)
1/35 = 1 c.c.	1 c.c.	escara (+ +)
1/50 = 1 c.c.	1 c.c.	escara (+)
1/60 = 1 c.c.	1 c.c.	edema discreto
1/70 = 1 c.c.	1 c.c.	nada
1/100 = 1 c.c.	1 c.c.	nada

En este caso la cantidad de toxina neutralizada con una dé-

oima de unidad es $1/60$ de c.c. Nosotras elegiamos, sin embargo, para ajustarnos en un todo al procedimiento de Darré, Lotseu y Laffaille, cuyos resultados queríamos comprobar, una cantidad algo mayor ($1/35$ en este caso) con objeto de obtener una lesión bien ostensible. Esto desde luego falsea algo los resultados y nos dará cantidades absolutas de antitoxina inferiores a las verdaderas, pero téngase en cuenta que en nuestro estudio nos interesa los valores relativos, puesto que lo que investigamos es el incremento del valor antitóxico del suero sanguíneo por la acción de la cnc toxina, que hemos de apreciar partiendo de una valoración antes de inyectarla.

Sabida la cantidad de toxina que es neutralizada por una décima de unidad antitóxica, para determinar las unidades de un suero dado, mezclamos con la cantidad de toxina elegida cantida-

das variables de suero problema. Habiendo tomado la cantidad 1/35 (solución B) como tipo, se dispone una serie de tubos con las mezclas correspondientes.

<u>Soluc.tox.1/35</u>	<u>Suero problema(1)</u>	<u>Soluc.salina</u>	<u>Unidades por c.c.</u>
1 c.c.	1 c.c.	0,00	1/10
1 c.c.	0,1 c.c.	0,90	1
1 c.c.	0,05 c.c.	0,95	2
1 c.c.	0,025 c.c.	0,975	4
1 c.c.	0,01 c.c.	0,99	10
1 c.c.	0,005 c.c.	0,995	20
1 c.c.	0,003 c.c.	0,997	33
1 c.c.	0,002 c.c.	0,998	50

(1) Estas cantidades han de ir en un volumen de 1 c.c. Conviene hacer diluciones de modo que no sea preciso tomar las cantidades de suero directamente para completarlas con solución salina.

Los términos intermedios se pueden determinar en una segunda prueba. Una escala mas completa supone un trabajo extraordinario y un gran consumo de animales. Con la pauta que nosotros seguimos se consigue una buena orientación acerca del valor de cada suero, que puede muchas veces ser suficiente y en todo caso en una segunda determinación puede afinarse ya orientados de la proporción de unidades antitóxicas.

Todas las mezclas de esta pauta se someten a la acción de la estufa a 37° durante dos horas y después se dejan en la refrigeradora 24 horas. A continuación se practican las inyecciones intradérmicas en el cobayo (0,1 c.c.) haciendo la observación como dijimos para la valoración de la toxina. De este modo la cantidad de suero que neutralice la acción de la dosis de toxina establecida contendrá cuando menos una décima de unidad antitóxica. Operando como hemos dicho, el poder del suero

es siempre mayor que el que este cálculo indica.

Este método tiene el inconveniente de ser laborioso y exigir extracción de sangre del vacunado. Su exactitud es la suficiente para prestar orientaciones interesantes.

La desviación del complemento.— Inspirándonos en la técnica de Decamps hemos empleado idéntica dosis de antígeno (anatoxina) pero hemos afinado más en la valoración del complemento y en la determinación del poder anticomplementario de los sueros.

Hoytres hace algún tiempo adoptamos una técnica algo complicada, pero muy exacta, para la valoración del complemento (45). El inconveniente de este proceder estriba en la imposibilidad de hacer las pruebas con muchos sueros de no disponer de numeroso personal. Por lo demás, la práctica de nuestro método

nos ha dado excelentes resultados.

Su fundamento consiste en hacer valoración del complemento separadamente en función del sistema hemolítico, del suero y del antígeno. Así sabemos lo que el suero y el antígeno son capaces de absorber y podemos emplear un mínimo de complemento que acentúa la sensibilidad sin temor a reacciones inespecíficas.

Hemos recurrido a muestras de anatoxina del mismo lote que sirvió para la inmunización de nuestros vacunados.

Dispusimos así las pruebas.

Titulación del complemento.

<u>Tubos</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
Comp. 1/10	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25
Sol. salina	1,45	1,40	1,35	1,30	1,25
Gl. r. 5% y sol. suero hemo.					
a. a.	l c.o.	l c.o.	l c.o.	l c.o.	l c.o.
<u>20' Baño 37°</u>					
Resultado	+	+	-	-	-

Dosis mínima complementaria = 0,15.

Titulación del complemento en función del antígeno.

<u>Tubos</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
Comp. 1/10	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25
Anatoxina dif- térica	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Sol. salina	0,55	1,50	1,25	1,20	1,15
Gl. r. 5% y sol. suero hemo.					
a. a.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.
<u>20' Baño 37°</u>					
Resultado	+	±	-	-	-

Cantidad de complemento absorbida por el antígeno=0

Titulación del complemento en función del suero problema.

<u>Tubos</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>
Comp. 1/10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35
Suero	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Sol. salina	0,85	0,80	0,75	0,70	0,65
Gl. r. 5% y sol. suero hemo.					
S. S.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.	1 c.c.
<u>20 º Baño 37º</u>					
Resultado	+	+	-	-	-

Cantidad de complemento absorbida por el suero = 0,10

Por consiguiente, en este caso como la dosis mínima complementaria es 0,15, el antígeno no ha fijado nada y el suero ha absorbido 0,10, la cantidad que emplearemos será 0,25, dosis muy próxima a la que resultaría calculando el complemento por el mé-

todo de Kapsenberg (0,225 en éste ejemplo) prescindiendo del factor suero, pero mas a favor de la especificidad, y algo inferior a la dosis clásica (0,50) pero con beneficio de la sensibilidad.

Nuestros ensayos en investigación de las sensibilizantes halladas por Decamps han recaído en cinco muestras de suero antidiftérico que como mínimo tenían 200 unidades per o.c. y sobre 10 muestras de sangre, de vacunados por anatexina, recogida entre cinco y seis meses después de haberles inyectado la última dosis vacunante. La experiencia propiamente dicha de desviación del complemento la hemos practicado como ahora decimos, suponiendo que la dosis complementaria es la calculada en nuestro ejemplo.

<u>Tubos</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>V</u>	<u>VI</u>
Anatoxina	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5
Suero	0,5	0,4	0,5	0,2	0,1	0
Comp. 1/10	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0
Soluo. salina	0,65	0,65	0,65	0,95	1,05	1 c.c.

Medio hora al baño de 37°

Gl. r. 5% y sol.
suero hemo.

a. c. 1 c.c. 1 c.c. 1 c.c. 1 c.c. 1 c.c. 1 c.c.

Con arreglo a la misma pauta hemos realizado todas las pruebas. Los resultados han sido?

<u>Sueros</u>	<u>Sensibilizatrix</u>
Suero antidiftérico. Lote 21/715	0
" " " 21/716	0
" " " 22/715	0
" " " 23/715	0
" " " 24/715	0
" humano a los 5 meses de la vacunación(adulto)	0
" " " 5 " " " "	0
" " " 6 " " " "	0
" " " 6 " " " "	0
" " " 6 " " " "	0
" " " 5 " " "(niño de 5 años)	0
" " " 6 " " "(niño 6 años)	0
" " " 5 " " "(niño de 8 años)	0
" " " 6 " " "(niño de 11 años)	0

No hemos conseguido, por consiguiente, descubrir las sensibilizadoras de que habla Decamps, sin que nos hayan sorprendido estos resultados negativos. La estabilidad de la anatoxina no nos parece suficiente para mostrar superioridad sobre los antígenos que antes se ensayaron en la desviación del complemento, por lo que a la esencia del fenómeno se refiere. Si la sensibilizadora residiera en la antitoxina, el suero antidiptérico que hemos ensayado hubiera dado reacciones positivas. Si el mecanismo estribara en anticuerpos desconocidos nacidos merced a la anatoxina, hubiéramos también obtenido resultado positivo por que las muestras de suero antidiptérico que hemos empleado proceden todas de caballos inmunizados exclusivamente con anatoxina.

Es lógico que se obtenga tan rotundo fracaso con el suero de caballo, siendo así que los animales son tratados en proporción de peso con cantidades enormemente mayores que los individuos de

la clínica humana, en estos no podíamos obtener resultados mas favorables.

Tampoco podia esperarse que lo intimo de la prueba radicara en los anticuerpos bacilares originados por los gérmenes autelizados en los caldos durante la incubación de la toxina. De ser así no hubieran sido negativas hasta la fecha las pruebas realizadas en investigación de la sensibilizatrix en los sueros preparados por inyecciones de toxina, empleando en la desviación del complemento, como antigeno, bacilos de Löffler. Es verdad que Lambotte y Christiansen han logrado ver positiva la reacción de desviación con antigeno microbiano, pero el suero problema no era antitóxico sino antimicrobiano y preparado con insistentes inyecciones de microbios a los animales donantes, sin que tengamos noticias de éxitos lijeros, en este sentido, con el suero de los enfermos o convalescientes de

difteria.

Nosotros no negamos la posibilidad de los hechos descritos por Decamps, pero podemos asegurar, dada la exquisita corrección de nuestra técnica, que la investigación de las sensibilizatrices con el antígeno anatóxico no es una prueba universal de la importancia que su autor le concede y que es indudablemente inadecuada hasta la fecha para los fines de la apreciación del grado de inmunidad diftérica.

Para apreciar el grado de inmunización de los vacunados por la anatoxina nos quedan, pues, dos procedimientos: uno cualitativo (reacción de Schick) y otro cuantitativo (dosificación de unidades). El método de Schick le hemos empleado para la investigación de receptivos y para apreciar la duración de la inmunidad; es decir, para las prácticas clínicas de profilaxia. El método de las unidades para el estudio cuantitativo de la

reactividad natural y adquirida.

A

LA ANATOXI-REACCION

Zeeller es el autor de esta prueba biológica que consiste en practicar una inyección intradérmica de anatoxina (dos décimas de solución al centésimo) para investigar la existencia de sensibilización para las albúminas de los bacilos de Loeffler. Los casos positivos se caracterizan objetivamente por la producción en el lugar de la puntura, y dentro de las 24 horas siguientes, de una zona roja análoga a la que caracteriza la pseudo-reacción y que desaparece a las 48 horas.

Según Zeeller revela estado alérgico y por el hecho de esta sensibilización los individuos que reaccionan positivamente suelen responder mejor a la vacunación.

Los sujetos con anatoxi-reacción positiva pueden al cabo de cierto tiempo darla negativa. Por lo tanto se pueden observar en la práctica los casos que Zeeller agrupa en el cuadro siguiente:

**Estados de la inmunización Reacción de Schick Anatoxi-reacción
antidiftérica**

Individuo indenne, receptivo	++	-
Primer contacto-Individuo receptivo alérgico	+	++
Individuo alérgico inmuni- zado.	-	+
Individuo inmunizado.	-	-

El Valor práctico de esta prueba radica en lo que ha ayudado para el estudio de ciertos puntos interesantes de la inmunidad diftérica, pues por lo que se refiere a la significación que Zeeller la dá como indicio para abstenerse de vacunar con anatoxina a los sujetos que presentan anatoxi-reacción de gran intensidad, tenemos ya en la prueba con toxina calentada un indicador suficiente.

En efecto, la anatoxi-reacción tiene el mismo mecanismo y

la misma significación que la reacción testigo con toxina calentada en la prueba de Schick. Lo que obra en la piel al hacer la inyección intracutánea con anatoxina es la albúmina del bacilo diftérico e sea idéntico agente que actúa en la inyección de toxina calentada. Por consiguiente, podemos adelantar que puede prescindirse de esta prueba practicando la reacción de Schick con la inyección testigo clásica. Así lo hemos comprobado en nuestra práctica.

Nos pareció de interés hacer una experiencia comparando la anatoxi-reacción, la prueba testigo de la reacción de Schick y una inyección intracutánea del caldo empleado en la confección de la toxina diftérica, en los sujetos que ostentaban energícas y prolongadas pseudo-reacciones.

Es cierto que a las temperaturas que son sometidos los caldos las sustancias proteicas no quedan aptas para la sensibili-

reacción, pero el hecho de recaer algunas de estas acentuadas pseudo-reacciones en afectadas de trastornos de tipo anafiláctico (jaqueca, urticaria, etc.) nos hizo sospechar una susceptibilidad especial para las sustancias extrañas contenidas en el caldo. La experiencia lo dispusimos practicando a los sujetos elegidos y ^{que} por pruebas anteriores sabíamos que reaccionaban intensamente a la inyección intracutánea de toxina diftérica, previamente anulada por el calor, simultáneamente, en el mismo brazo y separado por una distancia conveniente, tres inyecciones intracutáneas: una con toxina calentada (a la dosis del Schick), otra con anatoxina (0,2 c.c. de la dilución al 1%) y otra con caldo (solución 1%).

Obtuvimos el siguiente resultado:

	Intradermo-reacción con toxina calentada	Anatoxi-reacción	Intradermo-reacción con caldo.
P.R. (adulto) Jaquese	+++	+++	-
R.F.C. (adulto)	+++	+++	-
M.J. (adulto)	++ (prolongada hasta el 4º día)	++ (prolongada hasta el 4º día)	+ (desapareció a las 48 horas)
C.R. (adulto) Insuficiencia hepática	++ (prolongada hasta el 4º día)	++ (prolongada hasta el 4º día)	-
M.A. (adulto)	++ (prolongada hasta el 5º día)	++ (prolongada hasta el 5º día)	-
D.R. (adulto) Insuficiencia hepática	++ (prolongada hasta el 5º día)	++ (prolongada hasta el 5º día)	-
M.T. (adulto) Jaquese	++	++	-
M.S.O. (adulto) Urticaria	+	+	-

Esta experiencia nos demostró tres hechos: 1º.-Que no existe ^{la} relación sospechada por nosotros entre los estados patológicos

de tipo anafilactico y la susceptibilidad para las albúminas del caldo. ~~Por consiguiente, la pseudo-reacción y la anatoxi-reacción no son fenómenos anafilacticos.~~ ^{1º}.-Que la pseudo-reacción y la anatoxi-reacción pueden prolongarse mas allá del segundo día; y ^{2º}.-Que es posible una pseudo-reacción o una anatoxi-reacción sin intervención de la albúmina bovina (caso 3). La causa de este último no se nos alcanza. Pudiera explicarse como resultado de la sensibilización que supone la prueba intradérmica a que en días anteriores había sido sometido el sujeto. Pero si admitimos esto tenemos que admitir la posibilidad de sensibilizar en las proteínas sometidas a temperaturas de 120º, hecho negado por los trabajos experimentales de Rosman y Anderson. Es, por tanto, forzoso admitir otra causa ajena a esta posibilidad, por lo demás muy problemática dada

la débil cantidad de caldo que supone la prueba de Schick (0,001/50 en nuestro caso) y el corto espacio de tiempo transcurrido entre ambas experiencias.

Nuestras experiencias acerca de lo referente a la significación de la anatoxi-reacción en el proceso de la inmunización díférica, lo trataremos en el capítulo en que damos cuenta de la reactividad adquirida en su relación con la anatoxina.

**EL DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO DE LA DIFTERIA COMO
ELEMENTO PARA JUZGAR LA EFICACIA DE LA ANATOXINA.**

EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA DIFTERIA COMO ELEMENTO PARA JUZGAR LA EFICACIA DE LA ANATOXINA.

Sen dos cosas muy distintas el diagnóstico bacteriológico de la difteria bajo un punto de vista clínico y bajo un punto de vista bacteriológico. En el primer caso puede bastar un diagnóstico de presunción, en el segundo es imprescindible un diagnóstico de certeza.

Datos de morbilidad y mortalidad, observaciones acerca de la reacción de Schick, consecuencias terapéuticas, todo, en una palabra, lo que se relacione con la difteria, ha sido objeto de interpretaciones erróneas, en numerosísimas ocasiones, por cimentarse en datos bacteriológicos de presunción. En ^{la} lejana fecha hemos visto diagnosticar de difterica, una blefaritis que curó con remedios no específicos en cuyo examen bacteriológico demostramos bacilos del xerosis, que habían

side calificadas de diftéricas por un examen superficial.

También recientemente fuimos requeridos para estudiar bacteriológicamente el exudado faríngeo de un niño que había padecido en un año ocho procesos diftéricos de localización faucial y que en las ocho ocasiones había sido inyectado con suero específico. Aislamos un pseudo-diftérico de tipo Neffman. También en este caso el examen bacteriológico despiestó al clínico.

Son legión los casos de anginas eritematosas, rinitis, laringitis, etc. imputadas al bacilo de Löffler por causas confustenas bacteriológicas.

Por eso creemos de sumo interés hacer hincapié en este punto recomendando la exquisita ponderación de los datos de laboratorio, jamás independizables de la clínica, como aconsejó Llorente desde sus primeras publicaciones.

En el periodo post-vacunal anatóxico interesa mucho, ahora precisamente que el remedio de Ramon atraviesa su era de observación máxima por lo reciente de su empleo, dilucidar si los procesos de apariencia diftérica son en efecto originados por el bacilo de Loeffler. Cabe aquí el mismo concepto que Park (51) exponía con motivo de la inmunidad revelable por una reacción de Schick negativa. Decía dicho autor que aún cuando con un cultivo positivo se considerara como diftérico indudable un proceso, solamente cuando tenga lesiones características.

Donaldson (16) exige mas aun por establecer el diagnóstico de difteria; a saber: 1º.-Síntomas clínicos evidentes; 2º.-Aislamiento de bacilos diftéricos patógenos para el cobayo; y 3º.-Que el suero sanguíneo del paciente antes de la inyección del suero, esté desprovisto de la cantidad de antitoxina precisa

para evitar la afección.

De modo que en el momento actual de nuestros conocimientos no podemos formar juicio acerca de los posibles fracasos de la anatoxina sin armar la clínica con una correcta aportación de laboratorio (ensayo cuidadoso del germen aislado y práctica de la reacción de Schick o dosificación de las unidades antitóxicas del suero sanguíneo).

La contingencia que mas puede inducir a error la constituye el cuadro clínico confundible con el diftérico que recae en un portador. Estos casos no se esclarecen porque cedan al tratamiento, puesto que el hecho de estar vacunados nos inclina a creer en la eficacia de la anatoxina aparte de la existencia de casos espontáneamente curados. Solo puede arrojar luz el estudio del suero sanguíneo (dosificación de unidades) o la prueba de Schick.

En los casos que el proceso sea en apariencia diftérico recas en un portador y que cura sin tratamiento específico, el error de considerarle como gáenuino diftérico sumara indebidamente un nuevo buen éxito a la anatoxina. Por el contrario, cuando la coexistencia de portador y proceso no diftérico tenga un desenlace funesto, podreos desacreditar indebidamente un remedio profiláctico excelente.

Los portadores de bacilos diftéricos genuinos y patógenos no son, por fortuna, tan numerosos como por algunos se ha dicho. En individuos que no han estado en contacto con diftéricos, encuentran Donall y Thurber el 1,75% de 7790 observaciones (17). Wiltchke obtuvo el 16% y el 10% respectivamente en niños menores de 18 meses y mayores de esta edad (76). Park y Beebe hallaron bacilos patógenos ocho veces entre 550 gargantas normales examinadas. (52), Shelly solo consiguió

atolar bacilos de Léaffler virulentos en el 0,5% de sus exámenes realizados (52) y Park comprobó su existencia en el 5% de los escarlatinosos (52).

Desde luego los cuadros clínicos de cierta intensidad tendrán que escapar a los intentos comprobatorios que aconsejamos y ser sometidos al tratamiento específico, que es el camino a seguir en los no vacunados, ante la duda; pero siempre que las circunstancias lo permitan, nos resistiremos a someter a la inmunización pasiva los casos de vacunados con anatoxina que infundan sospechas de difteria, sin las comprobaciones de rigor.

Son nos frecuentes los errores por hallazgos de bacilos diftéricos avirulentos o de bacilos pseudo-diftéricos, producto de exámenes bacteriológicos incompletos.

Per consiguiente, nosotros aconsejamos vivamente el diagnóstico bacteriológico de certeza ni mas ni menos que se realiza en el problema habitual de los supuestos portadores bajo el punto de vista del peligro de los individuos que los rodean.

Nosotros no hemos hallado hasta la fecha bacilos patógenos en las gargantas de los vacunados con anatoxina que han padecido inflamaciones fauciales, pero tenemos noticias de casos de difteria benigna que ha evolucionado favorablemente sin tratamiento, en niños vacunados que figuran en las estadísticas francesas, como en su lugar decimos. Además, no son raras las hallazgos de bacilos patógenos en gargantas de sujetos con Schicknegativó.

La anatoxina, per consiguiente, al igual que la inmunidad natural, no es óbice para el albergue de bacilos virulen-

tos. Esto es interesante señalarlo. Podría pensarse en la incompatibilidad entre vacunado y portador y prescindir de investigar su existencia ante ciertos problemas epidemiológicos de colectividades. Puede, pues, la anatoxina proteger al vacunado contra la agresión de un germen que albergue en su garganta, pero puede este individuo contagiar del mismo modo que un indefenso o un inmunizado espontáneamente.

El exámen bacteriológico del exudado de la región correspondiente, se realizara practicando simultáneamente frotis (2-3) y siembra en suero Loeffler y en agar.

Es buena práctica hacer la siembra inmediatamente, pues aun cuando el bacilo diftérico en el seno del exudado suele soportar la desecación y se pueden obtener buenos resultados sembrando los algodones impregnados, al cabo de 24 horas, esto no ocurre siempre; así Van Riemdijk (64) ha observado que de

veinte algodones impregnados con exudado diftérico, solamente 15 daban cultivo a las 24 horas. El factor humedad influye poderosamente. Si después de la recogida del producto se sumerge el algodón en una mezcla de suero y gelós al 5 por mil, al cabo de 24 horas se obtiene mayor número de siembras positivas que si se hacen estas inmediatamente.

Baumgärtel (4) señaló una fuente de error por imperfecta esterilización de los algodones. Obtuvo por ésta causa un bacilo coloreable por el método de Neisser como el bacilo diftérico, aun cuando Gram-negativo.

Los frotos se colorearán por el método de Gram descoloreando durante un minuto con alcohol. El frote puede orientar acerca de la presencia de bacilos del grupo y además nos informa de la existencia de la asociación fuso-espirilar de Vincent.

En la siembra de suero Loeffler, a las 5 o 6 horas hay reproducción, no perceptible a simple vista, de bacilos todavía sin granos metacromáticos. A las 8 horas puede hacerse ya un diagnóstico, pero debe esperarse a las 16 o 24 horas y en caso negativo hasta las 48. En los convalecientes es frecuente que sea menester este plazo.

Sembrando por agotamiento se puede obtener colonias aisladas que permiten con buena técnica recoger cantidad de bacilos para resembrar y hacer algunos frotis. Estos se teñirán por el Gram decolorando uno por el alcohol durante un minuto y otro durante seis a ocho minutos. El bacilo diftérico se decolora al cabo de éste tiempo, a excepción de los granos metacromáticos, y los pseudo-diftéricos resisten (Boch y Meros (18), Langer y Krüger (50)). Desde luego esto es cierto por lo que se refiere al bacilo de Heffman. Los bacilos tipo cutis, xerecis conjuntival,

serpentigena (1) se comportan a este respecto variablemente y con mas semejanza al diftérico.

En las siembras de garganta la morfología (incluso los granos metacromáticos) y la decoloración por el alcohol tienen bastante valor. Los mismos frotis del exudado tienen cierta importancia en este caso. Se trata, casi siempre, de la diferenciación con el bacilo de Hoffman que tiene los extremos más filados, goza de escasos granos metacromáticos (no pelares) y resiste a la decoloración del alcohol. En cambio cuando el exudado procede de otras regiones, estos datos tienen poco valor. Los pseudo-diftéricos de otra procedencia que la faucial no presentan con relación al diftérico diferencias constantes.

(1) En Inglaterra le aisló Cantley en la rinitis aguda.

Las mayores dificultades diagnósticas se presentan en los casos de bacilos cortos.

La fermentación de los azúcares es muy importante. Nosotros la hacemos sembrando de las colonias aisladas en medio de Thiel. Resulta muy cómodo sembrar por agotamiento y con el producto primitivo (exudado) placas de suero glucosa-ternasol (Costa, Treisier y Dauvergne). De este modo de un modo directo aislamos las colonias que sabemos positivamente fermentan la glucosa y dentro de las 24 primeras horas de la siembra, podemos hacer una diferenciación con el bacilo de Hoffman.

He aquí el comportamiento de los bacilos diftéricos y de los principales pseudo-diftéricos respecto a los azúcares:

Bacilos	Dextrosa	Levulosa	Galactosa	Maltosa	Sacarosa	Dextrina
<i>B. Löeffler</i>	+	+	+	+	-	+
<i>Cutis y xerosis</i>	+	+	+	+	+	-
<i>Hoffman</i>	-	-	-	-	-	-

Los pseudo-diftéricos (*xerosis, cutis*) dan, sin embargo, pruebas inconstantes. El *Hoffman* dá pruebas constantes.

Existen otras pruebas encaminadas a la diferenciación de los bacilos del grupo. Se emplea por muchos la gelós glucosada de Veillon para evidenciar la anaerobiosis facultativa del bacilo diftérico y se ha dado por algunos gran importancia a la acidimetría de los medios de cultivo dextrosados que arrojaría cifras más elevadas en los medios sembrados con bacilo diftérico; prueba que puede afinarse mediante la determinación del pH.

Ninguna de éstas pruebas tiene valor diferencial absoluto. Así, por ejemplo, la anaerobiosis distingue bien el bacilo diftérico del de Hoffman pero los del tipo del xerosis, (cutis, segmentosum) no se diferencian del genuino bacilo de Loeffler. La acidimetría no tiene la constancia apetecida para el objeto que se persigue. La investigación del poder hemolítico de los caldos sembrados con bacilos de Loeffler, tiene mas valor, pero no la creemos imprescindible.

Realmente los datos morfológicos, la resistencia a la decoloración del alcohol, las fermentaciones de la glucosa y sacarosa, nos bastan para con la prueba de la virulencia establecer si se trata de bacilo diftérico tóxico e atóxico, bacilo de Hoffman y bacilos tipo cutis.

	<i>Morfo- logia</i>	<i>Decolora- ción (con alcohol)</i>	<i>Mét. de Neisser</i>	<i>Ferm. de glucosa</i>	<i>Ferm. de sacarosa</i>	<i>Virulencia</i>
<i>B. Löeffler</i>	<i>Extre- mos re- donda- dos</i>	<i>Poca re- sisten- cia</i>	<i>Granos casi constan- tes</i>	+	-	+
<i>B. Hoffman</i>	<i>Extre- mos afila- dos</i>	<i>Resis- tencia</i>	<i>Grans nulos o escasos (no pe- lares)</i>	-	-	-
<i>B. Cutis</i>	<i>Como el b. de Loe- ffler</i>	<i>Poca re- sisten- cia</i>	<i>Como el Löeffler</i>	+	+	-

La aglutinación que modernamente ha dado lugar a la determina-
ción de tipos de bacilos análogamente a como se ha realizado con el
pneumococo y el meningococo, exige una lenta y pacientísima prepara-
ción de los animales donantes de suero (por inculación de bacilos)

y no es, hasta la fecha, una prueba sistematizada. Según Scott, los difteroides no son aglutinados por los sueros diftéricos generalmente, pero el del serosia puede serlo en ocasiones por sueros de ciertos grupos aun cuando a mayor concentración (70). Howard Bailey (28) no consigue aglutinar los pseudo-diftéricos por sus sueros homólogos, ni observa coacción de los sueros preparados con bacilos diftéricos avirulentos sobre los bacilos virulentos. Los bacilos avirulentos son aglutinados por sus sueros homólogos pero en ocasiones también por los heterólogos.

Tampoco la desviación del complemento, nula con suero antitóxico pero positiva con suero antimicrobiano (Lambotte), goza del suficiente crédito para su aplicación a nuestro objeto.

Lo que esclarea toda duda es la patogenicidad para el ce-

bayo que puede hacerse subcutánea o intracutáneamente. Para el primer procedimiento se inyecta 1 c.c. de caldo sembrado 48 horas antes. Hacia el tercer día, el animal perece, ostentando edema subcutáneo y congestión de las suprarrenales. Un cobayo testigo inyectado con suero antidiftérico (mil unidades) además de con el caldo a investigar, resistirá a la inoculación. Si se trata de un pseudo-diftérico, ninguno de los dos animales experimentará alteración alguna.

La prueba intracutánea se hace inyectando intradermicamente (región ventral) 0,1 c.c. de una suspensión de bacilos recogidos de medio de cultivo sólido (el producto microbiano de un tubo de suero Loeffler en 20 c.c. de solución salina). El bacilo de Loeffler origina una lesión necrótica característica y en ocasiones hace perecer al animal. Se emplea también

un conejo testigo inyectado con antitoxina. La prueba intracutánea, sobre todo haciendo las suspensiones microbianas relativamente diluidas para evitar una agresión masiva, permite hacer en un cobayo dos a cuatro pruebas.

Estas pruebas, como decíamos, son decisivas. Los pseudo-diftéricos, sin excepción, son inofensivos para el cobayo. Todo lo mas determinan una ligerísima inflamación o infiltración no neutralizable por el suero antidiftérico y, desde luego, sin producción de neorósis. Davis (1899) y Hamilton (1904) encontraron bacilos diftéricos en apariencia y ligeramente patógenos para el cobayo cuyo poder tóxico para este animal no era neutralizado por la antitoxina. No hemos comprobado este hecho hasta la fecha.

Nosotros no prescindimos jamás de la prueba de la virulencia. La virulencia nos dá la clave para el estudio epidemio-

lógico, pues podemos establecer que todo bacilo morfológicamente del grupo diftérico, que es patógeno para el cobayo determinando las lesiones mencionadas, es genuino bacilo de Loeffler.

A este respecto indicaremos una fuente de error. Cuando se aísla un bacilo diftérico, no todas las colonias invariablemente ofrecen la misma potencia tóxica. Havens y Powell (1922) ensayaron bajo este punto de vista 210 colonias de 17 cultivos virulentos precedentes de garganta y 5 colonias provenientes de 4 cultivos diferentes se comportaron como inofensivas para el cobaya.

Para aminorar esta posibilidad de error, nosotros hacemos la suspensión que ha de inocularse, tomando bacilos de varias colonias.

El número de bacilos genuinos de Loeffler, avirulentos,

es muy reducido. Según Park (52) en 30 años de experiencia de análisis bacteriológicos de exudados sospechosos enviados al Departamento de Higiene de Nueva York, han sido tóxicos el 95% de los bacilos con las características del bacilo de Löeffler.

Por consiguiente, mediante las investigaciones de morfología, tinción y fermentación, podremos establecer si se trata o no de un genuino bacilo diftérico, y recurriendo a la prueba biológica en el cobaya, sabremos en el caso de que sea bacilo diftérico, si es patógeno o no.

Desde luego existe una independencia absoluta entre legítimos y falsos bacilos diftéricos. Entre otras pruebas tenemos las de Rosenau y Bailey (65) que han consistido en inyectar al cobayo dosis masivas de razas de bacilos de Hoffman, del xero-

sis, etc. sin observar modificación alguna en la reacción de Schick. La teoría unitaria de los bacilos del grupo diftérico nacida merced a las aportaciones de Roux, Yersin y Martín, defendida también con posterioridad en Alemania y que fué impugnada, como es sabido, por los trabajos de Fibiger, Kurth, Axenfeld, De Simoní y Gromakowsk y singularmente por Zupnik que llegó a dudar de la unidad botánica del genuino bacilo de Löffler, está en la actualidad abandonada por la inmensa mayoría de los biólogos, prevaleciendo el criterio de Neisser que admite: 1º.- Un bacilo diftérico genuino, patógeno para el cobayo y de efectos neutralizables por la antitoxina específica; 2º.- Un bacilo diftérico no patógeno para el cobayo y 3º.- Bacilos no patógenos, morfológicamente asemejables al diftérico pero con otras características biológicas.

Puede agregarse un cuarto grupo que corresponde a los

gérmenes encontrados por Davis, Hamilton y Ebersen, es decir bacilos morfológicamente diftéricos, ligeramente patógenos para el cobayo pero de efectos no neutralizables por la anti-toxina específica.

El estudio acerca de los grupos que modernamente se intenta establecer mediante la absorción de aglutininas y de anticuerpos, de cuyo asunto tan extensamente se ha ocupado Christiansen (10) parece que en la mayor parte de las observaciones viene a confirmar la profunda diferencia que combate a la teoría unitaria.

El problema, no obstante, presenta ciertas nebulosidades cuando el estudio recae en formas de transición, recientemente estudiadas por Bitter, Gundel y T. García Sancho (8) entre otros, asunto que resucita la posible transformación del pseudo-diftérico no patógeno en patógeno, posibilidad imaginada por

Roux y Yersin al observar que un bacilo poco patógeno se exaltaba al inyectarle asociado con el estreptococo. Este criterio pareció suficientemente derrotado con el hecho de no haber logrado hacer patógena una raza absolutamente inofensiva ni por inyección intraperitoneal ni por asociaciones microbianas. Park tampoco pudo comprobar las mutaciones morfológicas del diftérico genuino en pseudo-diftérico, con el subsecuente peligro de la reversibilidad, como establecieron en 1900 Westbrook, Wilson y Mac Daniel.

La experimentación biológica de los últimos años, aparte algunas observaciones como las mencionadas vienen todas en favor de la irreversibilidad de la atoxicidad de los bacilos diftéricos avirulentos considerados como bacilos diftéricos degenerados, cuya reversibilidad consideran posible en nuestros días Bitter, Gundel y García Sencho.

Lo mas esclarecido en bacteriología diftérica conviene, ~~en Amberg~~, en la individualidad de los grupos mencionados bajo el aspecto epidemiológico. A este criterio nos ceñiremos para establecer los portadores verdaderamente peligrosos; es decir, los portadores de bacilos patógenos para el cobayo:

Esta cuestión batallona que incidental y brevemente hemos esbozado, no afecta para nada al verdadero objeto de este capítulo: los bacilos aislados de procesos genuinamente diftéricos han de ser fatalmente patógenos para el cobayo. Demostrada la aptitud patógena de un germen diftérico aislado de un vacunado con anatoxina, nos resta establecer si es un portador o un afectado; El cuadro clínico y, si el estado del enfermo lo permite, la apreciación de sus unidades antitóxicas (el Schick o método de Römer) nos darán la clave.

Este es el criterio fundamental que tiene que presidir

nuestras observaciones acerca de la utilidad de la vacunación antidiftérica, cuya realización práctica estriba en una correcta aplicación de los conocimientos clínicos y de laboratorio en imprescindible armonía.

-99-

NUESTRA EXPERIENCIA CLINICA ACERCA DE LA ANATORINA

La medicina profiláctica, por lo que a nuestra práctica respecta, tiene tan pocos adeptos entre nuestro público que la realización de trabajos como el que nos ocupa hay que acometerla con verdadero espíritu de sacerdocio. Sobre todo en procedimientos vacunantes en que sea preciso más de una o dos punturas, con posibilidad de subsiguientes reacciones y a mayor abundamiento tratándose de la profilaxia de un proceso considerado como perfectamente curable, la lucha que es preciso entablar para la recolección de casos ha de ser verdaderamente esforzada. Por eso las grandes estadísticas extranjeras, especialmente americanas, referentes a profilaxia diftérica, proceden

de colectividades disciplinadas (colegios, asilos, ejercito , etc.).

Nosotros hemos conseguido dos lotes para este estudio. Uno constituido por los niños del Asilo de Santa Cristina, otro por agrupaciones familiares recolectadas de la consulta del servicio antidiftérico del Instituto Llorente. En suma hemos probado la receptibilidad en 804 individuos.

Asilados de Santa Cristina.

Investigación de la receptibilidad.

Parvulos.

<u>Edades</u>	<u>Número de individuos</u>	<u>% de reacciones de Schick positivas</u>
5 años	5	60
6 "	7	28,58
7 "	10	60
8 "	21	33,33
9 "	22	27,27
10 "	14	50
11 "	5	20

Ciclo de enseñanza superior.

<u>Edades</u>	<u>Número de individuos</u>	<u>% de reacciones de Schick positivas</u>
9 años	5	20
10 "	32	31,25
11 "	33	21,21
12 "	36	19,44
13 "	38	21
14 "	26	15,38
15 "	12	33
16 "	1	0

Clase de niñas.

<u>Edades</u>	<u>Número de individuos</u>	<u>% de reacciones de Schick positivas</u>
5 años	5	100
6 "	5	0
7 "	15	46,15
8 "	12	16,66
9 "	14	55,71
10 "	15	30
11 "	25	16
12 "	10	57,50
13 "	21	28,57
14 "	16	18,75
15 "	11	9,09
16 "	6	0

La agrupación de los no aislados dió el resultado siguiente.

<u>Edades</u>	<u>Número de observaciones</u>	<u>% de reacciones positivas</u>
1-5 años	10	30
5-6 "	125	55
6-10 "	120	49
10-15 "	65	58
15-20 "	60	19
<u>Más de 20 años</u>	<u>47</u>	<u>9</u>

Vacunados con anatoxina.

Aislados..... 112
No aislados..... 81

Técnica de la vacunación.-

1ª inyección.(subcutánea, en el brazo).....0,5 c.c.de anatoxina
18 días de intervalo

2ª inyección (subcutánea, en el brazo)...1 c.c. de anatoxina
21 días de intervalo

3ª inyección (subcutánea, en el brazo)(1).1 c.c. " "

La anatoxina empleada corresponde a una toxina cuya K.L.
D. era de 0,001.

Reacciones de los vacunados.- Niños.-Nuestra experiencia
no ha recaído en niños menores de seis meses. Deliberadamente
hemos prescindido de hacer ensayos en éstas edades teniendo en
cuenta que Röhmmer, Park y Singher han demostrado que en este
periodo de la vida se muestran los niños refractarios a la
inmunización diftérica, a pesar de que se porten dosis mas tó-
xicas que las de mas edad. Además, Ribadeau-Dumas, Lacomme y
Loiseau (65) han ensayado la anatoxina en niños menores de seis

(1) Recientemente hemos recurrido a la intramuscular.

meses con resultados rara vez positivos de incremento antitoxinico. También Ribadeau-Dumas, Loiseau y Mlle. Tisserand han intentado lograr la inmunidad del infante por inculación a la madre embarazada, y si bien en ocasiones la elevación del poder antitoxico sanguineo de la madre ha repercutido en el hijo, la relación no ha sido ni fija ni constante.

Exceptuados los niños de menos de seis meses, a partir de esta edad hemos podido comprobar que las reacciones en general están en razón directa de la edad. Los mas tolerantes son, pues, los mas pequeños. Todos, sin embargo, han presentado alguna reacción, aunque solo haya sido ligera.

Las reacciones debiles se han caracterizado por enrojecimiento local al siguiente día de la inyección, con algún empastamiento, ligero dolor a la presión y temperatura de 37° a 37,5°.

En algunos niños pequeños estos síntomas se han presentado tan atenuados que de no hacer exámen detenido pueden pasar inadvertidos.

En los niños mayores hemos observado reacciones mas definidas, con temperaturas de 38° y 39°, sin que éstas elevaciones marcharan paralelas con la reacción local y los síntomas subjetivos (cefalalgia y malestar). De modo que con ligera rubefacción coincidían elevaciones térmicas hasta de 38° y 39° y con acentuada reacción local e intenso malestar no pasaba a veces la temperatura de 38°.

Las dos primeras inyecciones son las que nos han salido de proporcionar mas acentuadas reacciones. Unos casos en la primera mas que en la segunda, otros casos al contrario. En muchos casos ambas inyecciones eran seguidas de los mismos

síntomas. Los síntomas locales se atenúan mucho practicando las inyecciones intramusculares, como hemos podido comprobar siguiendo el consejo de los autores franceses.

La mayor violencia de las reacciones se ha señalado como coexistente con una pseudo-reacción de Schick acentuada. Esto veremos que es exacto cuando hablemos de las reacciones en los adultos, pero tenemos un caso muy interesante de una niña de cuatro años con pseudo-reacción de Schick negativa que tuvo a las 24 horas de la inyección de anatoxina (0,5 c.c.) reacción local intensa y temperatura de 38,5°; después cedieron éstos síntomas y al quinto día se recrudescieron con edema duro de todo el brazo y temperatura de 39,7°. Al siguiente día mejoró; la temperatura solo llegó a 38° y al tercer día la fiebre había desaparecido y el edema estaba extensiblemente reducido. La segunda inyección de anatoxina solo determinó ligero enro-

jeoamiento local.

Lo mas curioso de éste caso es lo tardío del segundo impulso reaccional, hecho que no hemos leído en ningún trabajo.

Adultos.- En general han reaccionado mas en todas nuestras observaciones. En cinco adultos de 19 a 25 años hemos comprobado intensa reacción tanto de orden local como de orden general. En todos ellos la pseudo-reacción de Schick era muy intensa.

La reacción local originaba una placa tumefacta, roja, de extensión superior a un tercio del brazo. Las temperaturas oscilaban entre 38,7° y 39,5° acompañadas de cefalalgia. Al término de 5 días remitían los síntomas.

Investigación de los inmunizados por la anatoxina.

Lote de cañados.- A los 2 meses de la tercera inyección de anatoxina, hemos practicado el Schick a 101 vacunados con el siguien-

te resultado: Clase de parvulos.- (Niños de 5 a 11 años). Los 51 estudiados han sido Schick-negativos (100% de inmunizaciones). Clase de niños mayores.- (10 a 15 años). Se practicó el Schick a 58. Se obtuvieron 55 reacciones negativas y 3 positivas (78,94% de inmunizaciones). Clase de niñas.- (5 a 16 años). Fueron sometidas 32 a la prueba de Schick con resultado negativo en 31 y positivo en 1 (96,84% de inmunizaciones).

Lote de la consulta de Instituto Llerena.-

Vacunados con 3 inyecciones.....	22
" " 2 "	32
" " 1 "	27
<hr/>	
TOTAL.....	81

Es decir que de 81 individuos que empezaron a vacunarse, solo 22 fueron sometidos a vacunación completa. Esto demuestra la dificultad de introducir en la práctica corriente este proce-

difteria profiláctica.

De los 22 que recibieron las tres inyecciones, a los dos meses de la última, eran Schick-negativos 21. El único caso Schick-positivo (adulto) se hizo Schick-negativo a los 10 días de una cuarta inyección de anatoxina (1 c.c.)

La importancia de espaciar las inyecciones.-

Zoeller ha dicho que dos inyecciones de anatoxina separadas por intervalo corto rinden poco mas que una sola, y Martín, Loiseau, y Laffaille, que han intentado abreviar la vacunación practicando las tres inyecciones en 21 días, han observado que siguiendo ésta conducta el tanto por ciento de reacciones de Schick negativas post-vacunación es solo de 89,55% en vez de 96,96% que se obtiene espaciando las pioduras 15 a 21 días (41).

Nosotros hemos seguido la pauta de amplios periodos de

descanso. Hacemos hincapie en éste detalle porque a él atribuímos una buena parte de la brillantez de nuestra estadística.

La inmunidad de nuestros vacunados.— Hemos podido hacer el Schick después de la vacunación, (2 meses) a 125 individuos; 101 del lote de aislados y 22 del lote de la consulta del Instituto Llorente. El número total de Schick-positivos post-vacunación ha sido de 5 casos, pero 2 se refieren a individuos que solo han recibido 2 inyecciones. Por tanto, eliminados éstos dos casos, podemos establecer que con 3 inyecciones de anatoxina, debidamente espaciadas, de 0,5 c.c. la primera y de 1 c.c. la segunda y tercera, se puede hacer negativa la reacción de Schick al cabo de 8 semanas en el 97,56% de los casos.

**NUESTROS TRABAJOS SOBRE LA ANATOXINA Y
EL ESTADO DE REACTIVIDAD ADQUIRIDA**

La anatoxina torna en Schick-negativos los sujetos Schick-positivos, y realiza el fenómeno en un plazo variable de unos individuos a otros, como hemos expuesto en el capítulo correspondiente. Por otra parte, la antitoxina que hace negativo el Schick puede menguar al cabo de cierto tiempo. Zoeller, en 1925, observó que al término de un año de vacunar a 7 sujetos, uno de ellos era Schick-positivo. Sin embargo, los individuos vacunados, refiriéndonos a los grandes lotes de las extensas estadísticas extranjeras, se muestran protegidos para la difteria. Mas aún, el caso que en dicha fecha observó Zoeller de Schick positivo al cabo del año de la vacunación anatoxínica, se hizo negativo a los pocos días de una nueva inyección de anatoxina; hecho

repetido en múltiples ocasiones con posterioridad. Por tanto, el vacunado reacciona ante los estímulos específicos de diferente manera que antes de recibir el producto inmunizante.

Este concepto de la reactividad específica que Zoeller ha tratado con singular acierto, consiste esencialmente en una fuerza latente. La antitoxina que circula por el organismo constituye lo actual; la antitoxina que se forma ante un estímulo específico constituye lo potencial. De dos individuos con idénticas cantidades de antitoxina circulante, estará mejor inmunizado el que sea capaz de movilizar mayor cantidad de antitoxina ante el conflicto infeccioso. ^{Desde luego} ~~Por eso~~ aun cuando con cantidades de antitoxina tan pequeñas que el Schick sea positivo, puede existir estado de reactividad específica, lo general es que exista en tales condiciones cierta propor-

ción biológicamente demostrable. Además, los individuos de la especie humana y los animales que sin preparación alguna tienen cierta cantidad de antitoxina, son los que se inyectan mejor. (¿Reactividad específica natural?).

La reacción de Schick denuncia el tanto por ciento de receptivos en las distintas edades. En todas las edades pueden encontrarse individuos receptivos. La observación de las estadísticas acerca de este punto demuestra que la curva de la receptibilidad a partir de los primeros meses de la vida en que se goza de la inmunidad natural, sigue un curso ascendente hasta la adolescencia, decreciendo después. Pero al lado de los individuos que ostentan las oscilaciones características de ésta curva; es decir que se inyectan con los progresos de la edad, que constituyen, casi, la regla, hay

que colocar los que toda su vida son inmunes o toda su vida son receptivos; estos constituyen una minima parte.

Examinemos algunas estadísticas a este respecto.

Estadística personal

Asilo de Santa Cristina.

<u>Edad</u>	<u>Tanto por ciento de reacciones de Schick positivas</u>	<u>Número de observaciones vacunadas.</u>
5 a 11 años	40%	84
8 a 16 años (niñas)	26%	157
9 a 16 años (niños)	22.95%	183

Estadística de agrupaciones familiares.-

<u>Edad</u>	<u>Tanto por ciento de reacciones de Schick positivas</u>	<u>Número de observaciones</u>
5 a 6 años	55%	155
6 a 10 "	49%	120
10 a 15 "	38%	65
15 a 20 "	19%	60
De mas de 20 años	9%	47

Estadística de Schick (primeros ensayos).

<u>Recien nacidos</u>	<u>7% de reacciones positivas</u>
Un año	45% " " "
Dos a cinco años	65% " " "
Cinco a quince años	50% " " "
Adultos	10% " " "

Estadística de Park y Singer.-

3 meses	15%	de reacciones positivas		
6 " a un año	60%	"	"	"
1 a 2 años	70%	"	"	"
2 a 5 "	30%	"	"	"
10 a 15 "	20%	"	"	"
Más de 20 años	15%	"	"	"

Estadística de Leané.-

1 a 3 meses	17,2%	de reacciones positivas		
3 a 6 "	21%	"	"	"
6 a 12 "	84,6%	"	"	"
1 a 2 años	86,3%	"	"	"
2 a 5 "	86,6%	"	"	"
5 a 10 "	54%	"	"	"
10 a 15 "	40%	"	"	"
15 a 20 "	25%	"	"	"
Más de 20 años	7%	"	"	"

Estadística de Plonini.-

3 a 4 meses	17% de reacciones positivas
4 a 8 "	29% " " "
8 a 12 "	36% " " "
1 a 2 años	46% " " "
2 a 3 "	50% " " "

Estadística de Destefano, Vaccarezza y Consaliera.-

21 a 25 años	41,60% de reacciones positivas
26 a 30 "	53,84% " " "

Pseudo-reacciones 10%.

Estadística de Alonso, Muñozvarro y Ramos.-

5 a 7 años 45% de reacciones positivas. Ochenta observaciones.

Estadísticas de Brava, Malenarre y Tania.-

<i>Edad</i>	<i>Porcentaje de reacciones de Schiok positivas.</i>	<i>Nº de observaciones</i>
<i>5 a 6 años</i>	<i>52%</i>	<i>25</i>
<i>6 a 8 "</i>	<i>36%</i>	<i>75</i>
<i>8 a 10 "</i>	<i>55,55%</i>	<i>185</i>
<i>10 a 15 "</i>	<i>36,70%</i>	<i>317</i>
<i>15 a 20 "</i>	<i>12,76%</i>	<i>47</i>
<i>20 a 25 "</i>	<i>8,30%</i>	<i>12</i>

La pseudo-reacción en la prueba de Schick y la anatoxi-reacción de Zoeller han venido a confirmar algunos puntos hipotéticos de la inmunidad diftérica. Estas pruebas denuncian una hipersensibilidad para el bacilo diftérico que es prueba de la existencia de una impregnación microbiana. La frecuencia de la pseudo-reacción está en razón directa de la edad, por el contrario que la prueba de Schick que lo está en razón inversa.

Nosotros hemos obtenido el mayor número de pseudo-reacciones a partir de los 12 años y las mas esplendidas a partir de los 20 años; hechos que coinciden con la extensa experiencia americana y las observaciones realizadas en Francia, especialmente por Zoeller. Esto unido al menor tanto por ciento de receptivos que se encuentran en las colectividades donde han existido focos infectivos, invita a pensar que los contactos micro-

bianos, a veces tan fugaces que no constituyen proceso diftérico clinicamente hablando, son las determinantes de esos estados de reactividad específica.

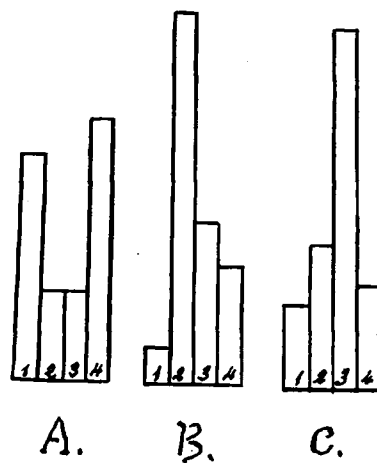
El esquema de Zeoller está en absoluta armonía con la realidad.

Estados de la inmunización Reacción de Schick Anatoxi-reacción antidiftérica

1º-Individuo indemne, receptivo	++	-
2º-Primer contacto-Individuo receptivo alérgico	+	++
3º-Individuo alérgico inmunizado	-	+
4º-Individuo inmunizado	-	-

La pseudo-reacción (anatoxi-reacción) no tendrá relación con la inmunidad como dicen Baraski y Brokmann (2) pero sí en tanto que la tiene con la inmunización. Meditemos después de considerar

la expresión gráfica que dá Zoeller a la inmunización oculta observada durante una explosión epidémica, la numeración de cuyos estados se refiere al cuadro anterior.



Inmunización
oculta en el
curso de una
onda epidémica

A= Epidemia ligera. Numerosos sujetos indemnes receptivos. Pocos alérgicos.
B= Epidemia reciente. Indemnes/poco numerosos; receptivos alérgicos numerosos.
C= Epidemia antigua. Indemnes/poco numerosos; alérgicos inmunizados numerosos.

El estado alérgico es como un estado de transición entre receptivo e inmunizado, que no es fatalmente seguido por éste pero que ^{le} la acompaña con mas frecuencia que al primero. Es un estado de semi-inmunidad, acaso el indicio de un estado de reactividad especifica que ante el ataque microbiano triunfe con antitoxina suficiente para evitar la afección.

En nuestra estadística de adolescentes y adultos, la asociación de inmunizado y alérgico se ha dado con extraordinaria frecuencia. Kelly, Stevens y Beattie (29) llegan a la misma conclusión después de observar 6664 intradermorreacciones.

Por otra parte, nosotros hemos visto que acompañándose la pseudo-reacción de inmunidad en un elevado tanto por ciento de adultos, en los niños no ocurre otro tanto. Los niños de la segunda infancia inmunizados, o sea Schick-negativos, no han pre-

sentado casi nunca pseudo-reacción. En un lote reciente de adultos y niños examinados a este respecto con gran atención (116 casos), las pseudo-reacciones se han dado casi exclusivamente en adultos y las dos que se han presentado en niños (de 4 y 5 años) correspondían a casos con historia de difteria.

Por éstas razones es de presumir que siendo tan frecuente la receptividad diftérica en los primeros años, los niños que no son receptivos en éstos periodos lo deben a un estado natural y por eso no tienen pseudo-reacción porque su inmunidad no obedece a contacto microbiano. En cambio en el adulto donde es menos frecuente el Schick positivo y mas la pseudo-reacción es obligado suponer que su inmunidad es adquirida.

Esto no quiere decir que una pseudo-reacción sea indio

seguro de inmunidad, prueba de ello son las reacciones combinadas, sino que la pseudo-reacción indica proceso de inmunización, contacto anterior, posibilidad de existencia del estado de reactividad específica.

Una observación de nuestra estadística es de interés bajo éste punto de vista. Cinco hermanos que han padecido todos difteria en distintas edades arrojan los siguientes resultados de la reacción de Schick:

	<u>Schick</u>	<u>Pseudo-reacción</u>
1 Julia González de 14 años	-	+ +
2 Antonio González de 13 años	-	+ +
3 Clara González de 11 años	+ + +	+ -
4 Elena González de 5 años	+	+ -
5 Juan González de 4 años	+	-

Estos casos tienen historia de difteria, que ha padecido mas de una vez el número tres. Los exámenes bacteriológicos fueron correctos, pero aun suponiendo que fueran procesos no diftéricos en un portador, la legitimidad de los bacilos diftéricos que albergó explican la sensibilización para la toxina calentada denunciada por la pseudo-reacción. Los niños de este ejemplo, por tanto, que se van inmunizando con los años, presentan pseudo-reacciones típicas.

Nos interesaba mucho estudiar biometricamente la reactividad adquirida frente a la anatoxina. La cantidad de antitoxina actual antes de la vacunación puede apreciarse solo por la reacción de Schick, haciendo una clasificación cualitativa; es decir, clasificando los individuos en Schick-positivos y Schick-negati-

ves, porque los segundos no han de ser objeto de la vacunación y los primeros, por el hecho de ser Schick-negativos contendrán una cantidad de antitoxina inferior a 1/30 de unidad por c.c. de suero sanguíneo. Sin embargo, a nosotros nos interesaba estudiar la reactividad adquirida, también, en los Schick-negativos.

Antes de exponer nuestras experiencias daremos cuenta de las de Darré, Loiseau y Laffaille. Estos autores han inyectado anatoxina a sujetos inmunizados (Schick-negativos), no inmunizados (Schick-positivos) y a convalecientes de difteria y sarampión. Antes de la inyección y después de 8 días, han determinado las unidades antitoxicas del suero sanguíneo. Por tanto estas experiencias informan acerca de la reactividad específica no determinada por vacunación (sujetos Schick-negativos) y provocada por

la anatoxina; acerca de la reactividad específica que pueda existir por contacto microbiano reciente (sujetos convalecientes de difteria) con la comprobación de ensayos simultáneos en sujetos que no han de gozar estado de reactividad específica (Schick-positivos).

He aquí los datos que dan Darré, Loiseau y Laffaille.

Individuos con Schick negativo.-

L.H. 12 años Antes de inyectarle anatoxina	= menos de 1/10 de unidad
A los 8 días de inyectarle 0,5 anatoxina	=mas de 4 unidades
A los 15 días de inyectarle 0,5 anatoxina	=mas de 7 unidades
A los 51 días de inyectarle 0,5 anatoxina	=mas de 10 unidades

<i>A.R. 26 años Antes de inyectarle anatoxina</i>	<i>=mas de 1 unidad</i>
<i>Al mes de inyectarle 1 c.c. de anatoxina</i>	<i>=mas de 15 unidades</i>
<i>Al mes y 6 días de inyectarle 1 c.c. de anatoxina</i>	<i>=mas de 15 unidades y =menos de 30 unidades</i>
<i>Al mes y 13 días de inyectarle 1 c.c. de anatoxina</i>	<i>=mas de 15 unidades =menos de 30 unidades</i>
<i>A los 3 meses (aproximadamente) de inyectarle 1 c.c. de anatoxina</i>	<i>=mas de 10 unidades =menos de 30 unidades = 20 unidades</i>
<i>J.Y. 38 años Antes de inyectarle anatoxina</i>	<i>=menos de 1/10 unidades</i>
<i>A los 9 días de inyectarle 0,5 c.c. anatoxina</i>	<i>=mas de 2 unidades</i>
<i>A los 8 días de una 2ª inyección de 1 c.c. de anatoxina</i>	<i>=mas de 10 unidades</i>
<i>A los 15 días de la 2ª inyección</i>	<i>=mas de 30 unidades</i>

A los 22 días de la 2ª inyección

=mas de 50 unidades
=menos de 60 unidades

A los 4 meses (aproximadamente) de la 1ª inyección

=mas de 20 unidades
=menos de 30 unidades

Individuos con Schick-positiva.-

G.D. 13 años Antes de inyectarle anatoxina

=menos de 1/10 unidad

A los 8 días de 1 inyección de 0,5 c.c. de anatoxina

=menos de 1/10 unidad

A mes de la inyección

=menos de 1/10 unidad

A los 3 meses

=menos de 1/10 unidad

L.L. 52 años Antes de inyectarle anatoxina

=menos de 1/10 unidad

A los 9 días de inyectarle 0,5 c.c. de anatoxina

=menos de 1/10 unidad

A los 7 días de administrarle una 2ª inyección de anatoxina (1 c.c.)

=menos de 1/10 unidad

A los 15 días de la 2ª inyección

=mas de 1/2 unidad
=menos de 1 unidad

A los 22 días de la 2ª inyección =mas de 1/2 unidad
=menos de 1 unidad

A los 3 meses de la 2ª inyección =mas de 1/10 unidad
=menos de 1/5 unidad

Observación de tres casos estudiados por Darré, Loiseau y Laffaille, citados por Leviez (37)

	I	II	III
Antes de la vacunación	1/10	Menos de 1 unidad	Menos de 1/10
Al maximum	50-80 unidades	20 unidades	mas de 2 unidades
Al cabo de 13 meses, 9 unidades		Al cabo de 1 año, 5 unidades	Al cabo de 11 meses, media unidad

Convalecientes de difteria y escarlatina.-

R.E. 10 años A los 20 días de padecer la difteria y antes de inyectarle anatoxina	=mas de 1/5 unidad =menos de 1/2 unidad
A los 8 días de inyectarle 0,5 c.c. de anatoxina	=mas de 1/5 unidad =menos de 1/2 unidad
A los 15 días de inyectarle 0,5 c.c. de anatoxina	=mas de 1/10 unidad =menos de 1/5 unidad
A mes de inyectarle 0,5 c.c. de anatoxina	=mas de 1/10 unidad =menos de 1/5 unidad
A.B. 10 años Al mes y medio de padecer difteria y antes de inyectarle anatoxina	=mas de 1/10 unidad
A los 7 días de inyectarle 1 c.c. de anatoxina	=mas de 2 unidades
A los 14 días de inyectarle 1 c.c. de anatoxina	=mas de 2 unidades =menos de 5 unidades

	A los 28 días de inyectarle 1 c.c. de anatoxina	=mas de 2 unidades =menos de 4 unidades
	Al mes y medio de inyectar- le 1 c.c. de anatoxina	=mas de 1 unidad =menos de 2 unidades
G.P. 55 años	Al mes de padecer la difte- ria y antes de inyectarle anatoxina	=menos de 1/10 unidad
	A los 8 días de inyectarle 1 c.c. de anatoxina	=mas de 2 unidades
	A los 15 días de inyectar- le 1 c.c. de anatoxina	=mas de 2 unidades =menos de 5 unidades
	A los 22 días de inyectar- le 1 c.c. de anatoxina	=mas de 1 unidad =menos de 2 unidades
	A los 29 días de inyectar- le 1 c.c. de anatoxina	=mas de 1 unidad =menos de 2 unidades
	Al mes y medio (aproximado- mente)	=mas de 1/2 unidad =menos de 1 unidad

	A los 3 meses	=mas de 1/2 unidad =menos de 1 unidad
L.M.	Convaleciente de escarlatina Antes de inyectarle anatoxina	=mas de 1/10 unidad =menos de 1/5 unidad
	A los 8 días de inyectarle 0,5 c.c. de anatoxina	=mas de 1/10 unidad =menos de 1/5 unidad
P.H.	Convaleciente de escarlatina Antes de inyectarle anatoxina	=1/10 de unidad
	A los 8 días de inyectarle 0,5 c.c. de anatoxina	=mas de 5 unidades

De estos hechos se deduce que los individuos Schick-negati-
vos a los 8 días ostentan una espléndida producción antitoxinica me-
diante la inyección de anatoxina, que toma incremento en días subsi-
guientes y que hacia los tres meses tiende a decrecer. Al cabo de
un año la proporción de antitoxina es todavía de consideración, pero

muy inferior al máximo que gozó en un principio.

Los Schick-positivos muestran nulo o débil aumento y aún éste a los 15 días de una segunda inyección reactivante. Los convalecientes de difteria (al mes de padecerla) experimentan elevaciones evidentes pero no tan marcadas como los Schick-negativos espontáneos.

A las observaciones que han recaído en los convalecientes de escarlatina les falta el dato de la reacción de Schick previa. Sus resultados tienen, pues, poco valor para nuestro objeto.

Es indudable que los resultados obtenidos en los Schick-positivos no invitan a esperar de la anatoxina aprovechables resultados para el tratamiento de los diftéricos. Solo a los 15 días de una segunda inyección de anatoxina se aprecian esten-

sibles aumentos de antitoxina.

Los casos de convalecencia de difteria demuestran que en los periodos ensayados la reactividad adquirida por la enfermedad es ya manifiesta en el plazo de 30 días cuando menos.

Pero quedan algunos puntos de interés que estas experiencias no comprueban. Uno es el estado de la inmunidad latente, de reactividad adquirida por la anatoxina. Otro la comparación de la reactividad espontánea y la anatoxínica, manifestada por la inyección reactivante de anatoxina, y otro, finalmente, si la producción de anatoxina por la inyección reactivante se ejerce en plazos inferiores a 8 días.

Estos extremos han sido objeto de nuestro estudio completando los trabajos precedentes.

Dispusimos las experiencias haciendo dos lotes: uno de sujetos inmunizados per se; otro de inmunizados por la anatoxina. De su inmunidad se juzgó por la reacción de Schick.

	<u>Schick</u>	Unidades an- titoxicas por c.o. de sue- ro sanguíneo antes de la vacunación	Unidades del sue- ro a los 5 meses de la va- cunación	Unidades del sue- ro a los 2 días de inyectar 0,5 de anatoxina	Unidades del suero a los 8 días de la inyección de anatoxina (in- yección reac- tivante)
D.B. Enfer- mera de un servicio antidifté- rico	-	Mas de una menos de 2		Mas de 1 Menos de 2	3
C.B. Enfer- mera desde 4 años an- tes en un Servicio antidifté- rico. Herma- na de la anterior	+++	Menos de 1/50	1/10	Mas de 1/10 y me- nos de 1	1

Ambas enfermeras por ser hermanas y haber estado varios años en contacto con diftéricos, reúnen circunstancias tan análogas que constituyen una observación muy interesante. La reactividad adquirida ha permitido en la primera casi duplicar la antitoxina en su sangre y en la segunda acrecerla diez veces más. Nótese, sin embargo, que la cantidad absoluta de antitoxina es mayor en el caso naturalmente inmunizado.

Elegimos la dosis de 0,5 c.c. de anatoxina como reactivo porque en los no vacunados teníamos que emplear una dosis prudencial y la dosis había de ser igual para todos.

Examinemos este otro cuadro:

Niños inmunizados con tres inyecciones de anatoxina.-

Hombre	Edad Años	Unidades del suero antes de la vacunación.	Unidades a los 5 meses de la vacunación	Unidades a los 4 días de la inyección reactivante de 0,5 c.c. de anatoxina
B.G.	13	Menos de 1/30	Mas de 1/10 menos de 1	Mas de 1/10 menos de 1
A.A.	9	Menos de 1/30	Mas de 1/10 menos de 1	Mas de 1/10 menos de 1
E.A.	13	Menos de 1/30	Mas de 1/10 menos de 1	Mas de 1/10 menos de 1
E.A.	11	Menos de 1/30	Mas de 1/10 menos de 1	Mas de 1/10 menos de 1
E.V.	14	Menos de 1/30	Mas de 1/10 menos de 1	Mas de 1 menos de 2

En estos cinco casos inmunizados con la anatoxina la proporción de antitoxina no llega a cuadruplicarse con la vacunación y no se modifica en cuatro casos con la inyección reactivante. En un caso, en cambio, se duplica aproximadamente.

Niños inyectados espontáneamente. (1)

<u>Nombres</u>	<u>Edad Años</u>	<u>Unidades antitóxicas antes de la inyección reactivante.</u>	<u>Unidades antitóxicas a los 4 días de la inyec- ción reactivante.</u>
L.S.	14	1 unidad	mas de 3 unidades menos de 4 unidades
F.S.	14	mas de 1/10 menos de 1	mas de 1/10 menos de 1
M.S.	15	1	1
A.M.	14	1	1
M.B.	14	mas de 1/10 menos de 1	mas de 1/10 menos de 1

Es decir que en un caso la inyección reactivante aumenta la antitoxina en mas del triple y en los demás casos no se nota modificación.

Esta serie de experiencias nos interesaba para orientarnos

(1) Queremos decir con esto que son Schick-negativos sin inter-
vención de anatoxina.

acerca del tiempo que la anatoxina requería para manifestar los efectos de la reactividad adquirida. En las observaciones que se ha hecho valoración antitóxica a las 48 horas y a los 8 días, se observa que en la primera de éstas dosificaciones el incremento antitético es prácticamente nulo en el caso no vacunado y apenas ostensible en el caso vacunado. En cambio a los 8 días es muy ostensible. En las otras observaciones se hicieron las dosificaciones al cuarto día y el aumento antitético en los vacunados es nulo en cuatro casos y se manifiesta por duplicación en un caso, y en los no vacunados es nulo también en cuatro casos y aumenta más del triple en un sujeto.

De esto se deducen dos hechos: que la idiosincrasia juega un papel principal; por eso todos nos reaccionan con el mismo ímpetu con respecto a la respuesta antitética, y que la inyec-

ción reactivadora no triunfa de un modo inmediato. Seguramente en los 10 casos ultimamente relatados a los 8 días se hubieron obtenido cantidades de antitoxina en armonía con los casos del cuadro primero. Nuestras investigaciones acerca de la dosificación de unidades, sumadas a las de Darré, Loiseap y Laffaille y a las de Zoeller fundadas en la reacción de Schick, parecen fijar como plazo necesario para una reactivación evidente un período de 8 días en la generalidad de los casos.

La producción de toxina, además, es discreta con motivo de las inyecciones reactivantes. Negativar una reacción de Schick, exige, como es sabido, alrededor de 1/30 de unidad. Teniendo esto en cuenta fijémonos que en la práctica de la dosificación de unidades hemos recurrido a una escala que aumenta de unidad en unidad cuando menos. La interpolación tiene poco valor porque términos intermedios de los ensayados, de gran importancia,

ne han sido apreciados.

Por consiguiente es muy posible que antes de los 8 días fijados haya ligeros aumentos de antitoxina; aumentos de cantidades tan pequeñas como exige, por ejemplo, la anulación de una reacción de Schick. Esto sin contar con los errores preventivos a todo método biológico.

Desde luego puede establecerse por estos trabajos que la producción de antitoxina merced al estímulo anatóxico, es sensiblemente igual en los inmunizados espontáneamente que en los inmunizados por la anatoxina. Por consiguiente la reactividad adquirida mediante la anatoxina es un hecho positivo.

Sentado este hecho capital, lo demás es accesorio, porque prácticamente lo que importa es que los vacunados ante el estímulo morboso reaccionen en el mismo sentido que ante la

inyección reactivante de anatoxina. Nosotros hemos hecho la siguiente experiencia.

Nombre y edad	Schick	Schick a los 15 días de 1 ^a inyección de 0,5 c.c. de anatoxina	Schick a los 2 meses de 1 ^a inyección de 1 c.c. de anatoxina	Schick a los 10 días de 1 ^a inyección de 5 mínimas mortales de toxina (1)
J.M.-26	+++	+++	+++	-
M.M.-36	++	++	++	-

Es indudable que la agresión microbiana hasta que se manifiesta clínicamente realizará una impregnación, y esta impregnación ha de reproducir, en cierto modo, la acción de la inyección de toxina. El individuo vacunado tiene seguramente, en este perio-

(1) Tuvieron feca necrótico como resultado de la inyección de toxina.

do de impregnación inicial, que reaccionar con producción de antitoxina, a base de un modo muy discreto, pero muy probablemente, cuando menos, en las proporciones suficientes para hacer al vacunado afectado, Schick-negativo, caso de que hubiera perdido la antitoxina actual, libre, y, en todo caso, será un afectado, pero sin intoxicación, susceptible de curar sin intervención terapéutica.

¿Puede la vacunación por la anatoxina originar la pseudo-reacción?. En teoría es muy lógico que así sea. En nuestra práctica contamos con hechos positivos en este sentido. Dos adultos que antes de la vacunación no presentaban pseudo-reacción, dieron reacción combinada a los 30 días de la 2ª inyección de anatoxina.

Dois casos típicos de pseudo-reacción prolongada (4º día) recayeron en 2 niñas vacunadas dos meses antes con 3 inyecciones de anatoxina. Antes de la vacunación no presentaron fenómeno alguno en la picadura testigo.

Otros dos casos podemos citar de la misma índole referentes a dos hermanos vacunados también con 3 inyecciones de anatoxina; estos de pseudo-reacción pasajera (24-36 horas).

Estos seis casos, tan evidentes, corresponden a las observaciones de nuestros últimos lotes de vacunados. Antes de convencernos de la posibilidad de las pseudo-reacciones prolongadas, hacíamos para apreciar los resultados de la vacunación anatoxinica, una prueba de Schick sin picadura testigo y hacíamos la lectura al 4º día solamente. De este modo creíamos nosotros ponernos a cubierto de posibles errores, porque la reacción típica de

Schick había de persistir en ese plazo y la pseudo-reacción tenía que haber desaparecido antes de nuestra lectura.

Cuando adquirimos el convencimiento de que una pseudo-reacción puede prolongarse hasta el 5º día y que algunas veces sus caracteres ofrecen dudoso diagnóstico, rectificamos nuestra conducta y empezamos a practicar la prueba testigo, también, para la selección de vacunados y ^aantitoxi-resistentes. Pero ésta conducta que ha alcanzado a nuestro últimos trabajos no nos ha permitido recoger suficiente número de observaciones.

Los casos relatados son, sin embargo, bastante demostrativos y su repetición en suficiente número vendría en apoyo de la significación que a dicho fenómeno parece que podemos asignar por ahora, como expusimos anteriormente.

-152-

LOS ANATOXI - RESISTENTES

Cuando la vacunación antidiftérica mediante el método de las mezclas se practicaba en gran escala, se observaba que aproximadamente un 15% de inyectados con las 5 dosis escapaban a la inmunización.

Si después se insistía en inmunizarlos, en algunos se conseguía, pero en otros fracasaba todo intento y la reacción de Schick persistía positiva. Opitz había hecho esta observación repetidas veces.

De estos sujetos, que Zeeller denomina hiper-receptivos, podría esperarse que reaccionaran de otro modo ante otro agente vacunante que no fuera la mezcla de toxina y antitoxina; de lo

contrario quedaba en pié el concepto de que solo se inmunizan los que constitucionalmente están aptos para ello (Baranski y Brekmann) o sea, según el criterio de Zeidler, los que gozan de reactividad natural, acaso relacionada con los grupos sanguíneos (Hirtzfeld y Brekmann) y, desde luego, a juzgar por los trabajos de Rist y Weiss, imputable a una cierta predisposición hereditaria.

Nosotros, de los sujetos que han persistido Schick-positivos a pesar de la vacunación anatóxica, hemos podido estudiar detenidamente seis casos.

C.F. de 13 años: tratado con 2 inyecciones.

A los 2 meses de la 2 ^a inyección	A los 15 días de la 3 ^a inyección	A los 15 días de la 4 ^a inyección
Schick +	Schick +	Schick -

H.M. de 13 años de edad. Tratado con 3 inyecciones.

A los 2 meses de la 3 ^a inyección	A los 15 días de la 4 ^a inyección	A los 15 días de la 5 ^a in- yección	A los 15 días de la 6 ^a in- yección
Schick + +	Schick +	Schick +	Schick -

H.J.C. de 13 años. Tratado con 2 inyecciones.

A los 2 meses de la 2 ^a inyección	A los 15 días de la 3 ^a inyección	A los 15 días de la 4 ^a in- yección	A los 15 días de la 5 ^a in- yección
Schick +	Schick +	Schick +	Schick -

J.P. de 13 años. Tratada con 5 inyecciones.-

A los 2 meses de la tercera inyección. A los 15 días de la 4ª inyección

Schick +

Schick -

De estos cuatro casos, la resistencia mas típica es la de los dos que habian recibido las 3 inyecciones espaciadas con arreglo a la última técnica francesa.

En dos adultos ensayamos la exaltación de la posible reactividad creada por la anatoxina, mediante inyección de toxina sin modificar.

J.M.A. 24 años. Tratado con 2 inyecciones de anatoxina.

A los 15 días de la 2ª inyección A los 10 días de inyectar-
le 5 mínimas mortales de toxina (1) A los 25 días de la inyección de toxina

Schick +

Schick +

Schick -

J.A.L. 25 años. Tratado con 2 inyecciones de anatoxina.

A los 15 días de la 2ª inyección de anatoxina A los 10 días de inyectarle 5 m.m. de toxina (1) A los 25 días de la inyección de toxina A los 5 meses de la inyección de toxina A los 10 días de una nueva inyección de anatoxina

Schick +

Schick +

Schick +

Schick +

Schick -

(1) Como resultado de la inyección de toxina (5 mínimas mortales) presentaron éstos individuos, a las pocas horas, dolor, tumefacción y enrojecimiento en el lugar de la inyección, quebrantamiento, insomnio y fiebre. A las 48 horas mejoraron del estado general y se acentuaron los fenómenos locales, presentando edema y vivo dolor. En los días sucesivos cedió el edema y hacia el décimo día presentaron zona neurótica. El número 2, una vez curada la lesión presentó anestesia en las inmediaciones del lugar de la puntura.

En el caso primero hacen falta 25 días para que despierte la reacción antitóxica merced a la toxina; en el segundo lo que no logra la toxina en 5 meses le consigue en 10 días una inyección de anatoxina.

Estas dos observaciones demuestran que dos inyecciones de anatoxina no solo no son suficientes, en ocasiones, para hacer negativo el Schick, sino que tampoco determinan siempre el estado de reactividad necesario para desplegar antitoxina en cantidad que haga negativa la reacción de Schick. Nuestra experiencia tendía a reproducir el caso de la infección diftérica, que en cuanto al factor tóxico logramos, a nuestro juicio, con bastante aproximación.

Por consiguiente, nosotros no hemos fracasado en ningún caso con anatoxina. Nuestros anatoxi~~as~~-resistentes lo han sido de

un modo relativo. En todos, insistiendo, hemos conseguido dejar de observar el Schickpositivo.

La observación de éstos casos en años sucesivos nos dirá si la inmunización lograda es menos persistente que la de los que se inmunizan de primera intención, por así decirlo.

En caso negativo la anatoxina habrá triunfado plenamente en el problema de los hiper-receptivos.

LA INMUNIDAD CREADA POR LA ANATOXINA.- SU DURACIÓN

Es preciso controlar todo hecho biológico en las condiciones para que ha de ser empleado. Si los sujetos Schick-negativos son refractarios a la difteria e, por lo menos, resisten a la intoxicación sin tratamiento y si la anatoxina negativa el Schick, la anatoxina inmuniza para la difteria. Pero todo esto necesita de la comprobación repetida.

Parece ser que los hechos se repiten en este sentido a favor de la anatoxina. En medio contaminado sus resultados han sido excelentes. En un asilo donde en 5 meses se habían registrado 12 casos de difteria, no se observó caso alguno después de la vacunación y en 5 colectividades del Paso de Calais des-

pués de 18 meses de la vacunación solo se registraron dos casos en dos individuos no vacunados (Martín, Loiseau y Laffaille) (40).

Además, las observaciones de los mismos autores en los medios escolares y en los preventorios y salterios contaminados, han probado que los casos de angina diftérica surgidos en los dos años posteriores a la vacunación, han recaído en sujetos que solo habían recibido una ó dos inyecciones o una tercera poco distanciada de la segunda, y, desde luego, se ha tratado de casos muy benignos susceptibles de curar sin intervención de la antitoxina (41).

Moxer (44) después de un año de practicar la vacunación de un modo sistemático a los niños de un hospital marítimo, observa que la mortalidad por difteria desaparece y

la morbilidad (15 casos) ha estado representada por sujetos no vacunados (5 casos) o vacunados imperfectamente. Solo dos casos recayeron en vacunados de un modo completo dos meses antes (un caso de angina roja y un caso de coriza). Sin embargo, contrasta ésta mortalidad nula y esta morbilidad tan exigua con los estragos que la epidemia hacia en los poblados circundantes del hospital y con los datos sanitarios del mismo hospital en años anteriores.

Años	Morbilidad	Mortalidad
1923	54 casos	4 casos
1924	36 "	3 "
1925	67 "	3 "
1926	15 "	0 "

Vaillant ha visto que en las agrupaciones donde la vacunación anatóxica es llevada con rigor, la mortalidad desaparece.

Zeeller también ha pedido comprobar en el adulto la reducción de la morbilidad en las epidemias de la Armada.

En el año transcurrido después de nuestras vacunaciones, tanto en los casos del Asilo de Santa Cristina como en los de nuestra estadística de las agrupaciones familiares, no hemos tenido noticia de que haya surgido cuadro clínico alguno de difteria.

¿Cuanto dura ésta inmunidad? Si la génesis de la inmunidad originada por anatóxica es la misma, como es lógico, que la creada por las mezclas, es de esperar que dure más de seis años. Todavía es de reciente empleo y por lo observado solo se

puede establecer que la reacción de Schick al cabo de dos años ^{de} aplicada la anatoxina es negativa en la mayor parte de los individuos, y que los casos de difteria surgidos en los sujetos que han recibido anatoxina, corresponden a vacunaciones imperfectas (una o dos inyecciones, o tres separadas por ciertos espacios de tiempo).

Zeeller examinó 10 sujetos al cabo de un año de abandonar el hospital donde habían sido vacunados y de 7 que al abandonarle presentaban reacción negativa, uno dió Schick-positivo ^A a los 12 meses; de los otros 3 que daban reacción debilmente positiva al terminar las inyecciones, 2 daban Schick-negativa al año y una positiva. Estos dos casos cree Zeeller estaban en estado de reactividad adquirida pues 1/2 c.c. de anatoxina fué suficiente para hacerlos Schick-negativos en

ocho días.

Roubinewitch, Loiseau y Gaffaille (67), tantas veces citados en éste trabajo, han observado que de 23 niños con Schick positivo, la inmunidad adquirida por medio o.c. de anatoxina persiste en 17 después de 19 y 25 meses; en 6 niños la inmunidad desfallece, demostrando lo insuficiente de una sola inyección en algunos sujetos. De 17 niños con Schick positiva, la inmunidad adquirida por 2 inyecciones persiste en todos ellos después de 12, 19 y 24 meses. Además, algunos niños que a pesar de las 2 inyecciones seguían siendo Schick-positivos, quedaren en observación sin nuevas inyecciones para juzgar de la inmunización espontánea: uno solamente en el año siguiente quedó inmunizado; cinco necesitaron una 3ª inyección para inmunizarse.

Lereboullet y Joanen, en 1924, vacunaron mediante dos

inyecciones (con 25 días de intervalo) 13 niños que padecían tuberculosis ósea. Al cabo de un año la reacción de Schick era en ellos negativa. Además, en las pruebas de éstos autores el estudio bacteriológico de la mucosa faucial de los vacunados, efectuado reiteradamente durante el año de observación, permite eliminar la posible inmunización por contactos microbianos.

No es, por tanto, aventurado suponer que practicadas las 3 inyecciones debidamente espaciadas, la inmunidad persistirá cuando menos dos años; y de existir, como es tan probable, analogía e identidad del mecanismo inmunógeno anatómico con el de las mezclas de toxina y antitoxina, más de seis años o acaso toda la vida si persiste el estado de reactividad.

-168-

LA ANATOXINA EN LAS EPIDEMIAS.-

LA ACCION CURATIVA DE LA ANATOXINA

Es indudable que algunos sujetos con una inyección de anatoxina presentan en breve plazo positivo poder antitóxico en el suero sanguíneo. Cuando hemos tratado de la reactividad adquirida hemos visto que los Schick-negativos, al octavo día de la 1ª inyección de anatoxina, ostentan acentuadas elevaciones en la cifra de antitoxina. Pero también hemos visto que los Schick-positivos experimentan aumento nulo a los ocho días y solo se vé en ellos algún incremento al cabo de 15 días de una segunda inyección de anatoxina. Estos casos de los Schick-positivos son los que nos han de orientar en el problema de la acción curativa de la anatoxina, porque cons-

tituyen el caso biológico de los diftéricos que tratamos de curar por el remedio de Ramon o de los receptivos que intentamos preservar de la inyección en medio epidémico.

Zoeller ha dicho que la anatoxina en las epidemias de adultos dá mejores resultados en los sujetos que llevan cierto tiempo en medio contaminado; es decir, en la declinación de las epidemias. En cambio de las epidemias en medio infantil no se ha publicado una experiencia de éste orden.

No pueden equipararse los casos. Los adultos son mas resistentes a la inmunización diftérica, se ha dicho repetidas veces. Lo que ocurre es que los que llegan a adultos sin inmunizarse han sido los resistentes. Por eso en las epidemias infantiles es muy probable que se forme mejor concepto de la anatoxina.

De todos modos es necesario pensar siempre en el distinto modo de reaccionar los individuos y no fundarse en los casos mejores para generalizar. Puesto que los receptivos genuinos (Schick-positivos), necesitan para obtener un elevado tanto por ciento de casos de inmunidad, tres inyecciones de anatoxina con intervalos de tres semanas como mínimo, aun cuando algunos casos se inmunicen en menores períodos, al realizar la vacunación en medio epidémico se tendrá en cuenta la posibilidad de que los tratados padezcan la enfermedad durante el período de vacunación y aun algunos días después, ya que el tiempo necesario para instalarse la inmunidad de un modo seguro es de seis semanas a partir de la primera inyección, sin tener para esto presentes los casos de mayor facilidad para inmunizarse.

Per consiguiente, en medio epidemico, a los muy expuestos al contagio que no esten vacunados, se les protegiera con mas seguridad con una inyección de antitoxina y a continuación la vacunación anatoxínica.

La anatoxina es, por tanto, la vacunación per excelencia para medios donde existe la difteria endemioamente. Asi, por ejemplo, en un asilo donde surge la epidemia de difteria y los niños no están vacunados, seria poco acertado tratar de impedir la difusión mediante la anatoxina. En cambio, realizando la aplicación de ésta en época anterior hubiera desarrollado su acción evitando la onda epidémica.

Zoeller (78) ha sido el primero que ha hablado de la acción curativa de la anatoxina fundándose en una observación. Se trataba de un caso grave de difteria faucial de un adulto

tuberculosis cuyo proceso clínico seguía el mismo curso que otro adulto fallecido en días anteriores. Se asoció a la sueroterapia, la anatoxina en dosis de 1 c.c. con 24 horas de intervalo (en suma 2 inyecciones). El enfermo curó.

Zoeller ha dado cuenta también de una experiencia de laboratorio relacionada con ésta cuestión (79). Se deduce de ella que la anatoxina que protege al cobayo contra la conjuntivoqueratitis experimental del conejo de Indias, no es capaz de curarla por sí sola, pero asociándola al suero antidiftérico se logra vencerla en menos tiempo que empleando el suero exclusivamente.

Es indudable que un caso tiene muy poco valor. Así, pues, lo indicado por Zoeller respecto a la clínica necesita de repetidas investigaciones. Tiene la parte experimental cierto va-

ler estimulante para ensayar dicha asociación en los casos graves con profunda intoxicación.

El valor curativo de la anatoxina por sí sola, es, por consiguiente, prácticamente nulo. Este hecho y sobre todo su fundamento (comportamiento de los Schick-positivos en cuanto a las unidades antitoxicas del suero sanguíneo) tiene que presidir nuestra conducta con los no vacunados ante las epidemias.

-175-

LA ASOCIACION DE ANATOXINA A OTRAS VACUNAS.

El impulso que la inmunoterapia ha alcanzado en cuanto a profilaxia en estos últimos años, obligara seguramente a multiplicar las inyecciones vacunantes con tal frecuencia que no aceptara de buen grado todo el mundo. Era muy importante ver el modo de reducir aquellas. Ramon y Zeeller (61) han estudiado el modo de obrar la anstexina y la vacuna T.A.B. asociadas. Parece ser que actúan con absoluta independencia, La reacción de Schick atestigua la inmunidad diftérica y las reacciones no han sido mas violentas. La respuesta antitoxinica es de mayor consideración, además, que actuando la anatoxina sola. Esto se explica por un mecanismo análogo al que interviene en la hiperproducción de anti-

toxina por las inyecciones de tapieca al caballo, como ha demostrado Ramon. Es un fenómeno de inmunidad paraespecífica de la misma índole que la mayor producción antitoxínica en los individuos que han padecido varias infecciones aun cuando no hayan sido diftéricas.

Igualmente favorables han sido las experiencias en que se han asociado las anatoxinas diftéricas y tetánica. Nuestra experiencia acerca de la anatoxina tetánica nos ha demostrado que la reacción de los vacunados es nula. Por tanto esta asociación ha de ser mas fácilmente soportada que la de la anatoxina diftérica y la vacuna T.A.B.

En la actualidad trabajamos intentando la asociación de la anatoxina diftérica y la vacuna antiescarlatínica, asociación que, a nuestro juicio, tiene singular importancia y de cuyos resultados todavía no podemos sacar conclusiones.

**LA ANATOXINA POR VIA BUCAL Y MEDIANTE
INSTILACIONES NASALES.**

Ramon y Grasset (60) han ensayado la inmunización anti-diftérica y antitetánica en el conejo y el cobayo por la administración de las anatoxinas correspondientes. En ambos animales han conseguido, siquiera en el cobayo haya sido con mas dificultad, una inmunidad general/humoral menos pronunciada que por la via subcutanea pero con los mismos caracteres y con analogos plazos.

Estos resultados llevaron sin duda a Ramon y Zoeller (59) a ensayar el procedimiento en la especie humana. El fracaso ha sido absoluto. Bien se recurra a la anatoxina pura o diluida, ya se emplee anatoxina bicarbonatada, ya se haga preceder la ingestión

de anatoxina, de bilis, la preparación de antitoxina circulante no aumenta y el individuo objeto de la experiencia permanece receptivo o no muestra incremento antitoxinico alguno si se trata de un inmunizado.

Al mismo tiempo que dieron cuenta de estos trabajos, Ramon y Zeeller comunicaron que la ingestión de antitoxina bajo la forma de suero purificado, no aumentó la concentración de antitoxina sanguínea, aun cuando la antitoxina ingerida fuera precedida de ingestión de bilis. Este resultado negativo contrasta con el positivo que obtuvieron en el mismo sentido en el conejo y el cobayo Ramon y Grasset y los resultados de Grasset referentes a las experiencias positivas de inmunidad pasiva conferida a los animales de experimentación mediante dosis masivas de suero antidiftérico y antitetánico administrados por via bucal previa

ingestión de bilis, aunque en estos casos la cantidad de antitoxina sanguínea era menor que cuando la antitoxina se prepinaba subcutáneamente.

Todo esto demuestra la profunda diferencia que existe entre la experiencia en los animales y en el hombre y debe servir una vez más de lección para pronunciarse en contra de la terapéutica serológica por vía bucal que aun se defiende, por centados profesionales, con grave peligro, y sin fundamento experimental de ninguna especie.

Muy recientemente Ramon y Zoeller han estudiado la inmunización anatóxica por vía nasal. Han empleado anatóxina concentrada y glicerinada y han conseguido en los Schick positivos y después de dos series de instilaciones, negativar el Schick. En los sujetos Schick-negativos han observado un considerable aumento de antitoxina circulante que ha pasado de 1/10 de unidad a 1,

5 y hasta 5 unidades. Estos resultados de inmunización, que dichos autores han hecho extensivos con halagaderos frutes a la anatoxina tetánica y a las toxinas estreptocócica y disentérica, abre un nuevo camino para la profilaxia, todavía no abordable pero susceptible de utilizarse en determinados casos cuando el estudio se complete, y contribuye a esclarecer el mecanismo de la inmunidad oculta puesto que esta es factible producirla merced al contacto del antígeno con la mucosa rino-faríngea.

-183-

INDICACIONES DE LA ANATOXINA

Es indudable que un diagnóstico a tiempo en difteria permite la curación en una gran mayoría de casos. Sobre todo las formas fauciales, en que solo haya que luchar con el factor intoxicación, los resultados son casi siempre satisfactorios acudiendo oportunamente.

Pero aun acudiendo oportunamente, es decir cuando las familias se aperciben del estado anormal del niño, se puede fracasar. Acaso la asociación estreptocócica sea responsable de buen número de éstos fracasos (el valor de la estrepto-difteria de los clásicos ha sido recientemente rehabilitado por Gaté) (21), pero de todos modos estos casos desgraciados justifican sin duda alguna la profilaxia.

Además, dejando aparte la difteria faucial y las formas de difteria laríngea post-faucial, ya justificables de todo intento profiláctico, son legión las formas de erup primitiva. Todos estos casos en que existe posibilidad de intervención quirúrgica, siquiera ésta esté constituida por la intubación, constituyen pruebas evidentes de la necesidad de prevenir la difteria.

Existiendo ésta indicación faltaba el producto que la llenara hasta el descubrimiento de la anatoxina, porque faltaba un producto inócuo y estable.

Estas propiedades de que goza la anatoxina se avaloran por la reducción del plazo en que se produce la inmunidad con relación a las mezclas. Lo que en el método de las mezclas eran meses en el de la anatoxina son semanas.

La anatoxina en seis semanas y distanciadas las inyeccio-

nes convenientemente crea inmunidad en el 98-99% de los casos.

¿A que edad emplearemos la anatoxina? La difteria de los niños pequeños es muy grave y de 2 a 6 años es cuando se presenta su máximo de morbilidad. Por consiguiente, en los niños de más de 6 meses estará indicada la vacunación de un modo sistemático, porque a mayor abundamiento, los niños pequeños reaccionan muy poco a la anatoxina.

Cuando se trate de la vacunación en casos aislados y en pequeñas agrupaciones y dado el elevado tanto por ciento de receptivos que en éstos periodos de la vida existen se puede prescindir de la reacción de Schick, vacunando desde luego en evitación de las punturas.

En las colectividades de consideración, el Schick previene evita tiempo y dispendios. En los adultos tampoco se prescindirá

del Schick para eliminar de la vacunación a los que presenten la pseudo-reacción muy intensa. Además, en los adultos consideramos la vacunación una medida de excepción.

Las contraindicaciones nacen más bien de la táctica de prudencia que siempre se sigue con todo remedio de inmunoterapia activa que de una experiencia verdadera. En realidad no se tienen noticias de casos desgraciados por existir tara patológica; sirven de ejemplos los casos de vacunación relatados por Lerebuellet y Jeanon referentes a niños que padecían tuberculosis ésea. No obstante, se consigna como contraindicaciones las taras patológicas (tuberculosis, cardiopatías, albuminuria etc.).

Sin embargo, importa mucho ser muy cautes en la elección

de casos, ahora precisamente que el producto empieza a introducirse en la práctica. Una reacción violenta, aún sin consecuencias subsiguientes, alarmará a las familias ya de suyo predispuestas para todo intento de profilaxia. Harbier y Requín (24) han insistido, muy acertadamente, sobre esto. Estos autores en los ensayos que han hecho en medio escolar no han vacunado a los niños de más de 11 años, por temor a reacciones algo violentas que pudiesen alarmar y crear el descrédito del procedimiento. Por esto nosotros no aconsejamos por ahora la vacunación de los adultos no siendo en casos especiales y siempre eliminando a los que den pseudo-reacciones de gran intensidad.

C O N C L U S I O N E S

1^o.-La superioridad de la anatoxina diftérica sobre los productos vacuantes que la han precedido radica en varias propiedades:

- a) Inocuidad.- Jamás ha ocasionado fenómenos graves.
- b) Estabilidad.- No puede experimentar reversibilidad como las mezclas de toxina y antitoxina y es factible someterla a 65°-70° sin menoscabo de sus propiedades peculiares (inmunización y floculación). Por consiguiente es mayor la garantía de su estado aseptico puesto que es lícito tindalizarla.
- c) Efectos rápidos.- Las mezclas requerian de 2 a 6 meses para inmunizar; la anatoxina de 2 a 6 semanas.

- 2º.-Es indispensable espaciar las inyecciones suficientemente, debiendo transcurrir 15 días entre la primera y la segunda y 18 a 21 días entre la segunda y la tercera.
- 3º.-Cuando se investigue la existencia de la inmunidad anatóxica o su persistencia por medio de la reacción de Schick, no se prescindirá de la contraprueba con toxina calentada aun cuando en la indagación de la receptibilidad hubiera sido negativa, puesto que la anatóxina *per se* puede originar pseudo-reacción. Tampoco se omitirá la lectura de los resultados del Schick al cabo de 4 días, para descubrir las pseudo-reacciones prolongadas.
- 4º.-La desviación del complemento empleando la anatóxina como antígeno es inadecuada para la apreciación de la inmunidad antidiptérica.

5º.-La anatoxi-reacción tiene el mismo mecanismo y arroja los mismos datos diagnósticos que la contraprueba con toxina calentada en la reacción de Schick.

6º.-Es absolutamente indispensable un diagnóstico bacteriológico de certeza en los casos de procesos de sospecha naturaliza diftérica acaecidos en los vacunados con la anatoxina. En tales casos se impone: 1º.-Confirmar que el germen aislado es un bacilo diftérico genuino. 2º.-Que es patógeno para el cobayo y 3º.-Que el suero del enfermo contiene menos de 1/30 de U.A. per c.c.

Solo de este modo se formará una sólida opinión acerca de la eficacia del remedio de Ramon.

7º.-Cuando la anatoxina se administra por vía intramuscular se atenúan los fenómenos reaccionales de orden local.

- 8°.-Se prescindirá de vacunar a los niños menores de 6 meses por ser refractarios a la inmunización.
- 9°.-Las reacciones, en general, están en razón ^{directa} ~~inversa~~ de la edad. Los niños pequeños son, pues, los más tolerantes. Aun éstos, sin embargo, experimentan algún ascenso térmico.
- 10°.-En los niños mayores se observan reacciones más definidas con elevación térmica de 38°-39° y extensible reacción local.
- 11°.-Los fenómenos reaccionales se asemejan a los que surgen a continuación de las vacunas administradas por vía parenteral.
- 12°.-Los adultos reaccionan, en general, más que los niños, sobre todo los que dan pseudo-reacciones de Schick o anatoxi-reacciones positivas.

- 13°.-De nuestra experiencia podemos concluir que con 5 inyecciones de anatoxinas, debidamente espaciadas, de 0,5 c.c. la primera y de 1 c.c. la segunda y tercera, se puede hacer negativa la reacción de Schick en el 97,56% de los casos.
- 14°.-La frecuencia de la pseudo-reacción está en razón directa de la edad ~~para la inmunización con la vacuna de Schick que se está en acción débil.~~
- 15°.-La anatoxi-reacción y la pseudo-reacción de Schick están íntimamente relacionadas con la inmunización antidiftérica. Dichas pruebas que atestiguan alergia revelan un estado de transición entre receptivo e inmunizado, que no es fatalmente seguido por éste pero que le acompaña con mas frecuencia que al primero. En nuestra estadística la asociación de inmunizado y alérgico se ha dado con extraordinaria frecuencia.

- 16^o.—Los individuos Schick-negativos, a los 8 días de una inyección de anatoxina ostentan una espléndida producción antitoxinica que toma incremento en días subsiguientes y que hacia los 3 meses tiende a decrecer. Al cabo de un año la proporción de antitoxina es todavía de consideración pero muy inferior al máximo que gezó en un principio.
- 17^o.—Los individuos Schick-positivos muestran nulo o debil aumento de antitoxina y aun éste a los 15 días de una segunda inyección reactivante.
- 18^o.—Los convalecientes de difteria que al mes de padecer la infección son inyectados con anatoxina, presentan elevaciones evidentes de antitoxina pero no tan marcadas como los Schick-negativos espontaneos.
- 19^o.—Hemos hecho una experiencia comparativa acerca del estado de reactividad adquirida espontanea y del estado de reactividad

adquirida precedida por anatoxina o sea en lotes de Schick-negativos espontáneos y de Schick-negativos por la vacunación anatoxínica y hemos comprobado el análogo comportamiento de las unidades antitoxicas del suero sanguíneo después de una inyección reactivante, observando además que los efectos de esta antes del 8º día son inconstantes y mediores.

20º.-Los casos de anatoxi-resistencia, que han sido muy escasos en nuestra práctica, hemos logrado inmunizarlos insistiendo en las inyecciones de anatoxina, empleando en vez de 3 inyecciones, 4, 5 y hasta 6 (un caso). De observar en años sucesivos que éstos anatoxi-resistentes ~~han~~ hemos conseguido inmunizar ~~conservar~~ su inmunidad como los demás vacunados, la anatoxina habra triunfado en el problema de los hiper-receptivos.

21°.-De la experiencia que hasta la fecha se tiene del remedio vacunante de Ramon se deduce que la inmunidad conferida por el duró mas de 2 años. Si el mecanismo mediante el que inmuniza la anatoxina es el mismo que el que interviene en la inmunización por las mezclas es lógico esperar que dure la inmunidad anatoxínica mas de 6 años.

22°.-Los casos de proceso de naturaleza diftérica surgidos en los vacunados por anatoxina, han curado sin tratamiento específico.

23°.-Como la anatoxina exige cierto tiempo para rendir sus efectos constituye un remedio mediocre en las epidemias a título de elemento profiláctico de urgencia.

24°.-El valor curativo de la anatoxina, por si sola, es practicamente nulo.

25°.-La asociación de la anatoxina a la vacuna T.A.B. permite la

instalación de ambas inmunidades (antitífica y antidiftérica) con absoluta independencia y sin producción de reacciones violentas. Otre tanto puede decirse de la asociación de las anatoxinas diftérica y tetánica.

26°.-La anatoxina por vía bucal no es capaz de inmunizar.

27°.-Las instilaciones nasales de anatoxina producen incremento de antitoxina sanguínea.

28°.-La anatoxina está formalmente indicada en los niños de 1 a 6 años, debiendo practicarse la vacunación prontamente teniendo en cuenta que las reacciones están en razón ^{directa} ~~inversa~~ de la edad. De 6 a 11 años, aun existiendo indicación y dada la menor gravedad del proceso diftérico en éstos períodos de la vida, se puede limitar la inmunización activa a las colectividades donde la vigilancia es mas difícil y el peligro de aparición de focos es mayor. Estas concesiones

obedecen al criterio de no prodigar por ahora las vacunaciones en los niños mayores, sobre todo en la práctica privada, en evitación de reacciones que den pábulo a la oposición del público profano. Es indispensable ser muy cautos en la elección de casos, ahora precisamente que la vacunación antidiftérica está en su período de recolección de prosélitos. Vacunaremos imponiendo el procedimiento a los niños de 1 a 5 años; vacunaremos circunstancialmente a los niños de 7 a 10 años y nos resistiremos a hacerlo a partir de esa edad para evitar fenómenos reaccionales violentos que sin ser graves restarán adptos a tan necesaria obra profiláctica.

En los adultos constituirá la vacunación anatoxínica una práctica de excepción.

29ª.-Dado el elevado tanto por ciento de receptivos en las primeras edades, la vacunación se impone en dichos periodos de la vida sin previa investigación de la reacción de Schick. Esta prueba implica dos punturas cuya práctica quebranta el animo de los niños y de las familias. Solamente en las grandes colectividades de niños pequeños la prueba de Schick se impone porque ahorra tiempo y dispendios. En cambio a partir de los 6 años la reacción de Schick es una práctica recomendable.

BIBLIOGRAFIA

- 1-Anderson y Leonard.-Los efectos de la congelación sobre las mezclas de toxo-antitoxina diftérica (The Journal of the American Medical Association.-Junio-2-1924)
- 2-Andrews, Bulloch, Douglas, Dreyer, Fildes, Ledingham y Wolf.-
(b) Diphtheria.-Londen 1923.
- 2-Barenski (R) y Brekman (H).-Estudio sobre la pseudo-reacción diftérica. (Sec. Pelonea Biol. 28 Abril 1926).
- 3-Barikin, Kulikov, Minervin y Kljuchin.-Ueber das Diphtherie-Anatoxin und toxin (Zeits. f. Inn. u. exper. Ther. T.-XLVI-nº 6 1926. R. de Arch. Med. y Esp.)
- 4-Baumgärtel.-Sur bakteriologische Diphtheriediagnose (München med. Wochschr. 65-270-1926).
- 5-Berthelet y Ramon.-Sur les agents de transformation des toxines en anatoxines (C. R. Acad. Sciences-t-CLXXX-1926 p. 340)
- 6-Bitter (L) Gündel (M) y García Sancho (T) Ueber Lebensänderungen von corynebakterien (Biologie des corynebacterien) Centralbb. f. Bakt. I-t-XXVII-p-132-1926 (Bull. de l'Institut Pasteur 1926-nº 13. p. 828. 1926)
- 7-W. Böhm.-Vacunación diftérica por jennerrización con linfa viva (Zeits. f. Inn. u. exp. Ther. T. 46-nº 1-1926 (R. Arch. Med. C. y Esp.)
- 8-Bowen.-Production of local immunity by means of diphtheria toxin. (Journ. Inf. Dis. t XXVI-Junio 1925 p. 501)
- 9-Bravo, Muleyerro y Tapia.-Sobre profilaxis diftérica (Archivos Españoles de Pediatría-Agosto 1925).

- 10-Christiansen (M) La bacille de la diphtérie-1923.
- 11-Darré (H) Loiseux (G) y Laffaille (A).-De l'immuntation anti-diphtérique par l'anatoxine diphtérique. *Bull.Soc.Medicale des Hop. de Paris* t.-XLVIII n° 17-16 Mayo-1924.
- 12-Darré, (H) Loiseux (G) y Laffaille (A).-Hiperensibilidadé des convalescents de diphtérie a l'anatoxine diphtérique (Soc.m.des.Hop.de Paris t.-XLVIII n° 26 18 Julio 1924.
- 13-Darré (H) Loiseux (G) y Laffaille (A).-Sur la persistance du pouvoir antitoxique dans le serum des sujets vaccinés par l'anatoxine diphtérique (Bull.Soc.Medic.des Hop.de Paris t.-XLIX-3 Abril 1925.p.565)
- 14-Desoamps (W) Reaction de fixation dans la diphtérie au moyen de l'anatoxine diphtérique (Soc.belge.de Biologie-31-Julio 1926)
- 15-Destefano, Vaccarezza y Consigliere.-La reacción de Schick en el adulto (La Semana Médica.-Buenos Aires n° 1553).
- 16-Donaldson (E) The Schick test. *British Medical Journal* Sept.1926 n° 3429.
- 17-Denell (James A) y Thurber Fales (W).-American Journal of Hygiene t-III-1923 p.614.) Les Porteurs de bacilles diphtériques dans la population scolaire de Baltimore (Off.Inst.Hyg.Put.)
- 18-Dopter y Saquepée-Bacteriologie 3^e édition.
- 19-Finat (G) La vaccination antidiphtérique par l'anatoxine dans les milieux hospitaliers Paris-1926.
- 20-Flamini (M) La reazione di Schick nei bambini lattanti-Rivista de Clinica Medica Ottobre 1921 p.521.
- 21-Gaté.-Lyon Médical-28 Febrero y 7 y 14 Marzo 1926.

- 22-A. F. Glenn y Barbara B. Hopkins.-Diphtheria toxoid as an immunizing agent. *Brit. Jour. of Exper. Path.*-t. IV n° 5 Octubre 1923 p p. 283-288.
- 23-Gleuzeman (M. P.) Solovtzeff (I. N.) y Gladstern. De la toxina fermentada o anatoxina; su poder vacunante en la difteria. La medicina profiláctica (en ruso) n° 7-8 Julio-Agosto 1926 p. 30 (*R. Bulletin de Instit. Pasteur* n° 23. 15-12-1926.-p. 1056.
- 24-Harvier y Requin Essai d'immunisation antidiphtherique par l'anatoxine en milieu Scolaire (*Paris Medical* 8-Mayo-1926)
- 25-Havens y Powell-1922 (En el tratado de la oña 1-bis)
- 26-Helmreich (E) La inmunización activa contra la difteria y la actitud del gobierno austriaco con ocasión de accidentes mortales sobrevenidos (*Klin. Woch. t. IV-1926. p. 1697* (*R. Office Inter-Hyg. Pub. n° 4 Abril 1926 t. XVIII*))
- 27-Henseval (M) y Nelts (P) Recherches sur la vaccination antidiphtherique a l'aide de l'anatoxine (*Soc. belge Biol. 11-Octubre 1924* (En *C. R. Soc. Biol. Paris. t. XCI-1924. p. 902*))
- 28-Howard Bailey (G) A Study of the agglutination reactions of the diphtheria group of organisms. *Jour. of Immunol. t-X Sep. 1925 p. 791* (*Bull. Pasteur-1926 n° 16 p. 717*)
- 29-Kelly, Stevens y Beattie.-Results of Schick test in California (*Public Health Reports. 5 XL. n° 49. p. 2645 4-XII. 1925*)
- 30-Langer y Krüger-Die Gramfestigkeit der Diphtheriebazillen und der Pseudodiphtherie-bazillen als differentialdiagnostisches Merkmal. (*Deutsch. med. Wochenschr. 42-722-1916* (citada en la obra 1(bis))
- 31-Larsen (W. P.) y Eder (H) Inmunización antidiftérica con toxina detoxificada con cloruro de sodio (*J. Amer. Med. Asso. 15 Abril 1926-p. 497*)

- 32-Lereboullet, Boulanger-Pilet y Courroy.-Les resultats de la vaccination antidiphtherique par l'anatoxine (Sec.Med.Hop. Paris 30 Abril 1926)
- 33-Lereboullet, Boulanger-Pilet y Jeannon.-L'anatoxine dans la prophylaxie de la diphtherie (XVIII Congrès de Medicine.Nancy-1925 Julio.La Medicina Infantile 1925 Sept.)
- 34-Lereboullet, Boulanger-Pilet y Jeannon.-Les resultats de la vaccination antidiphtherique a l'anatoxine de Ramon (Bull. Sec.Med. des Hop. 30 Abril 1926)
- 35-Lereboullet, Boulanger-Pilet y Lelong.-L'anatoxi-reaction de Koelliker chez l'enfant (Bull. Sec.Med.Hop. 17 Agosto 1924)
- 36-Lereboullet, y Jeannon.-Durée de l'immunité conférée par l'anatoxine diphtherique (Bull. Sec.Med. des Hop. 22 Mayo 1925)
- 37-Levitz (J).-De la vaccination antidiphtherique par l'anatoxine diphtherique de Ramon. pp. 89-91 Paris 1926
- 38-Marie (P.L.) La vaccination antidiphtherique (La Presse Medical 8 Febrere 1925.
- 39-Martin sur l'immunisation antidiphtherique avec l'anatoxine. (Bull. Acad. Med. Paris Abril 1924)
- 40-Martin (L) Loiseau (G) y Laffaille (A) Essais de immunisation des collectivités avec l'anatoxine diphtherique (Bull. et Mem. Sec.Med.Hop. Paris t-XLIX n° 21 12 Junio 1925).
- 41-Martin (L) Loiseau (G) y Laffaille (A)-Sur l'immunisation par l'anatoxine diphtherique dans les milieux scolaires et dans les preventoriuns en Sanatoriuns contaminés (Bull. Mem. Sec.Med.Hop. Paris 5ª serie año 42-1926-p. 745)
- 41(a)Matilla Gómez.-La profilaxia especifica de la difteria (Arch. Med. Cirug. Espec. 1925)
- 41(b)Matilla Gómez.-La bacteriologia en 1926 (Arch. Med. Cirug. Espec. Mayo 1927 n° 310.

- 42-Medias (J.J.) y Moreno de Vega (F.) Nuestros primeros ensayos de vacunación antidiftérica por la anatoxina especifíca (Rev. del Instituto Llerente Año IV-nº 16-Diciembre.1926 p.3)
- 42(b)Medias (J. y J.) La importancia de la reacción de Schick. (Comunicación al primer Congreso Nacional de Medicina)
- 43-Moreno de Vega (F) Sobre la determinación del complemento (Arch.Españoles de la Beneficencia Municipal-1926)
- 44-Meyer.-Douze mois de vaccination par l'anatoxine diphtérique a l'hospital maritime de Berck (Sec.Med.Hop.Paris-10-XII-1926)
- 45-Muloyerro y Ramos. El problema de la difteria y la reacción de Schick (Arch.Med.Cirug.y Esp.26-Febrero 1922 nº 38 p.373)
- 46-Muloyerro.-Prevención de las enfermedades infectocontagiosas de la infancia (Arch.Med.Cirug.y Esp.13-Neubre.1926)
- 47-Muloyerro.-La inmunidad diftérica conseguida por la anatoxina y comprobada por el Schick ulterior (Anales de la Ac.Med. Quir.Esp.22-Noviembre 1926)
- 48-Nasso (Ivo) Tentativi di immunizzazione antidiftérica con l'anatossina di Ramon (Pediatria t-XXXIII nº 24 p.1512-15-Diciembre 1925)
- 49-Nella.Recherches sur la vaccination antidiphtérique.-Soc.beige Biol.-28 Mayo 1925 (C.R.Soc.Biologie-t.XCII-1925 p.1114)
- 50-Park (W) Toxin-Antitoxin immunization against diphtheria Jour. A.M.A.Neubre.-4-1922 p.1584)
- 51-Park Active immunization against diphtheria with toxin-antitoxin (Monthly Bulletin of the Department of Health- New-York 1922 Vol.XII nº 2.
- 52-Park (W.H.) Williams (A) y Krumholz (Ch) Patogenic Microorganisms-1925

VI

- 53-Pioó (C.E.) y Miravent (M.M.)-Action de quelques substances sur l'intoxication et l'infection diphtérique expérimentelle (Soc. Argentina de Biol.5-Diciembre 1925)
- 54-Ponce de León.-La vacunación antidiftérica por la anatoxina. (Boletín del Consejo Nacional de Higiene de Montevideo.Novbre. 1925)
- 55-Ramon (G.) Sur le pouvoir flocculant et sur les propriétés immunisantes d'une toxine diphtérique rendue anatoxique(anatoxine) (Comp.Rend.Sciences.de l'Académie de Sciences Tomo 177-p.1358. 1925-Paris)
- 56-Ramon (G.) Pouvoir toxique et pouvoir flocculant de la toxine diphtérique (Com.Soc.Biologie-2 Junio 1923)
- 57-Ramon (G.) Sur les propriétés de l'anatoxine diphtérique (C.R. Acad.sciences-t.CLXXIV-1924-p.422)
- 58-Ramon (G.) Sur l'anatoxine diphtérique.-A propos de & une note de P. Nelis sur la vaccination antidiphtérique (C.R.Soc.Biol. t.XCII-1925.p.1432)
- 59-Ramon (G.) y Zoeller.-Essais d'immunisation antitoxique active et passive par voie buccale chez l'homme (Soc.de Biologie.Diciembre. 1926)
- 60-Ramon y Grasset.-Sur l'immunité antitoxique active par voie buccal chez l'animal d'expériences(Soc.Biologie Diciembre.1926)
- 61-Ramon y Zoeller.-Les vaccins associés (C.R.Soc.Biologie-16 Enero 1925)
- 62-Ramon y Zoeller.-De l'immunisation antitoxique par voie nasale (b)chez l'homme et du mecanisme de l'immunisation occulte(Soc.Biol. 19-Marzo 1927)
- 62-Renault y Levy.-La vaccination antidiphtérique (Annales de Médecina.t.XVI-nº 4-Octubre 1924)

VII

- 63-Ribadeau-Dumas y Chabrun.-L'immunisation active du nourisson contre la diphterie (Sec.Med.Hop.Paris.16 Julio-1926)
- 64-Riemsdijk (M.van)(Zeitschr.f.Hygiene u.Infektionskr.t.CIII.p.106 1924)
- 65-Rosenau (M.J.) y Howard Bailey (G.) Diphtheria immunity Effect of repeated infections of avirulent diphtheria bacilli.B.Hofmanni and B.xerosis, in guinea-pigs-(Jour.Inf.Dis.t.XXXVII.p.97-Agosto 1925)
- 66-Roubinevitch (J) Loiseau (G) y Laffaille (A) Immunisation antidiphtherique chez l'enfant avec l'anatoxine diphterique (Bull.Soc.Med. des Hop.de Paris-23-Mayo-1924)
- 67-Roubinevitch,(J) Loiseau (G) y Laffaille (A) Sur la durée de l'immunité active apres vaccination antidiphtherique par l'anatoxine. (Sec.Med.Hop.30-Abril-1926)
- 68-Renchi y Redlich.-La reacción de Schick en el recién nacido y la madre (La Pediatría-toXXXIII nº 12-15 Junio 1925-Napoles)
- 69-Ruelle (C) L'état refractaire du nourisson à la diphterie (Bruxelles Medicales-nº 44-Agosto 1926)
- 70-Scott (W M) Las reacciones de aglutinación de los bacilos diftéricos (Reports Public Health and Medical Subjects-nº 22-1925.-Off.Int.H.P.tomo XVI-p.81)
- 71-Schmidt (G) Sur l'emploi de l'anatoxine et du taploca dans l'immunisation (Societad Danesa de Biologia.-1º Febrero 1926)
- 72-Schroder (M.C.) y Park (W.H.) (Nueva York) Comparative merits of new and old preparations of diphtheria toxin-antitoxin.-Results of preliminary test with toxoid.(J.Amer med.assoc.t.LXXXI-nº 17-p.1432-27 Octubre 1925)
- 73-Suñer.-Enfermedades de la infancia.
- 74-Tapia(M).-Prefilaxis de la difteria.-1925

- 75-Van Boeckel.-La prophylaxie de la diphtérie (Monografía de la Organización de Higiene de la Sociedad de las Naciones.-1924)
- 76-Wiltchak.-Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskr t. CIV-1925-p. 370 (R. de Office International d'Hygiene Publique-t. XVII p. 1001)
- 77-Welff-Eisner.-La réaction cutanée e intracutanée de la toxine diphtérique (Réaction de Schick) (Arch. Med. Cirug. Espec.)
- 78-Zeeller.-La vaccination par l'anatoxine diphtérique chez l'adulte (Bull. et Mem. Soc. Med. Hop. de Paris-9 Mayo 1924)
- 79-Zeeller A propos de la action curative de l'anatoxine diphtérique sur les lésions de diphtérie expérimentale (C. R. Soc. Biologie t. XCI-p. 81-1924)
- 80-Zeeller y Manoussakis.-De la conjentive-Keratitis diphtérique expérimentale (C. R. Soc. Biologie t. XC-p. 1399-1924)
- 81-Zeeller y Manoussakis.-Infection diphtérique et immunité locale (C. R. Soc. Biologie-t. XCI-1924-p. 860)
- 82-Zeeller.-La réceptivité et l'immunité dans la diphtérie.-L'allergie diphtérique (Presse Medical-27 Septiembre 1924)
- 83-Zeeller.-Action stimulante des infections diphtériques minimas sur l'immunité vaccinale acquise chez le cobaye (C. R. Soc. Biologie 1924) (Bull. I. Pasteur-nº 4-23 Febrero 1926)
- 84-Zeeller.-La reactivité spécifique naturelle ou acquise.- (Presse Medical nº 39-p. 994-25 Julio 1925)
- 85-Zeeller La vaccination contre la diphtérie.- Ses conditions biologiques (Presse Medical-19 Mayo-1926)
- 86-Zeeller La vaccination antidiphtérique par l'anatoxine (Presse Medical-26 Mayo-1926)

- 87-Boeller-La pratique de la vaccination par l'anatoxine diphtérique (Sec. Med. des H. de Paris-8 Mayo-1926)
88-Boeller Les anatoxines (Gazette des Hôpitaux-Paris-Juin-926)
89-Bingher (A) Immunity results with diphtheria toxoid (modified toxin-anatoxin) and 1/10 L + mixtures of toxin-anatoxin.
(Proceed. of Sec. for. experim. Biol. A. Med. t. XXXII-p. 462-1925)

Admissibles

L. Pombas