

9

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MEXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS E INDUSTRIAS QUIMICAS

---

# TOXOIDE DIFTERICO

TESIS  
QUE PRESENTA EL ALUMNO  
RAUL ORTIZ C.  
PARA SU EXAMEN PROFESIONAL  
DE  
QUIMICO FARMACEUTICO

MEXICO, D. F.  
1931



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A MIS PADRES**

**A MIS HERMANOS**

## A los Señores:

Químico Dn Roberto Medellín, Director de la Facultad de Ciencias Químicas.

Dr. José Zozaya, Director Asistente de los Laboratorios Mulford, en Filadelfia, Penna.

Dr. John C. Reichel, Director de la Casa H. K. Mulford & Co.

Dr. Thomas S. Githens, Jefe del Departamento de Difteria en los mismos Laboratorios.

Químico Farmacéutico, Miguel Cordero, Profesor de la Facultad de Química.

Dr. Francisco Paz, Profesor de la Facultad de Química.

Dr. Pedro Pérez Grovas, Jefe de los Laboratorios de Diagnóstico del Departamento de Salubridad Pública

y Herman Bachers, Técnico del Departamento de Difteria en los Laboratorios Mulford

expresándoles mi sincero agradecimiento por sus valiosas enseñanzas y espontánea ayuda.

RAUL ORTIZ C.

---

# TOXOIDE

## I

Erlich fué el primer investigador que a fines del siglo pasado usó el término Toxoide para designar con él cierto constituyente de la toxina diftérica cuya propiedad característica era la de combinarse, con igual o mayor avidez que la toxina en sí, con la antitoxina. El mismo lo concibió y consideró como un producto de degradación de la toxina e inofensivo por haber perdido toda su actividad el grupo "toxóforo", reconociendo dos importantes hechos con respecto a este Toxoide; primero: que con el envejecimiento de una toxina cruda viene un aumento en la proporción de Toxoide y que con el transcurso del tiempo la toxina tiende a desaparecer, siendo reemplazada por el Toxoide inofensivo. (Como el poder combinante de la toxina cruda mostraba relativamente poca alteración aparecía que la toxina era lentamente transformada en Toxoide, es decir, que cada molécula o unidad combinante de toxina era cambiada, casi cuantitativamente, en unidad combinante de Toxoide). El segundo hecho mostrado por Erlich fué que el poder de un antígeno para estimular la producción de anticuerpos estaba relacionado con su poder de combinación con la antitoxina y que, inyecciones de Toxoide, tenían por consiguiente el mismo poder para excitar la formación de anticuerpos que el poseído por las inyecciones de toxina.

El mismo Erlich describió y denominó un gran número de supuestos constituyentes de la toxina cruda, diferenciándolos unos de otros por la mayor o menor avidez que tenían para combinarse con la antitoxina. En la actualidad todos estos nombres han desaparecido de la literatura médica, quedando en uso frecuente únicamente dos de ellos: la toxina en sí y el Toxoide.

Muchas tentativas y por numerosos investigadores, fueron hechas para acelerar por medio de agentes físicos y químicos el cambio de toxina a Toxoide. En el año de 1921, Glenny, Hop-

kins y otros colaboradores en Inglaterra, manifestaron haber conseguido dicha transformación de la toxina a toxoide, sin apreciable pérdida de su poder para estimular la producción de anticuerpos por medio de ciertos agentes físicos y químicos. Entre todos los agentes que ellos usaron, los que les dieron resultados más satisfactorios, fueron la acción combinada de la formalina y del calor. Dichos investigadores designaron el producto resultante con el nombre de Toxoide.

Por el mismo tiempo Ramón en el Instituto Pasteur de París, llevaba a cabo trabajo similar y su más temprana publicación fué simultánea a la de los ingleses. El también encontró que la acción de la formalina abolía la toxicidad de la toxina diftérica, sin una marcada pérdida del poder inmunizante.

Cuando la toxina cruda alterada por el envejecimiento es calentada a 70°C por media hora o a 100°C por varios segundos, pierde al mismo tiempo que su toxicidad, sus propiedades antigénicas. Es decir, no únicamente la toxina es destruida sino también el toxoide formado. Este "toxoide natural" (como se le pudiera llamar a este producto), es termolábil. Si en igual forma que el anterior se calienta el Toxoide obtenido por la acción de la formalina sobre la toxina, se notará que no hay más que una pequeña pérdida de sus propiedades antigénicas. Este Toxoide es termoestable.

Estos hechos llevaron a Ramón al convencimiento de que estas dos substancias no eran idénticas, e introdujo el nuevo término "Anatoxina" para asignarlo al producto por él obtenido. (1)

A principios del año de 1924 los Laboratorios Biológicos Mulford, en Glenolden Penn, E. U. de A., principiaron sus trabajos experimentales con el producto Toxoide, trabajos encaminados a resolver en alguna forma las dificultades con que se tropezaba en la manufactura en escala comercial de esta toxina modificada. El 26 de noviembre de 1926 el U. S. Department Public Service, concedió la primera licencia en su género a dichos Laboratorios para la manufactura del producto que hoy se conoce con el nombre de "Diphtheria-Toxoid-Mulford", viéndose así coronados con éxito los trabajos emprendidos por estos Laboratorios.

(1) La razón por la que algunas casas productoras prefieren usar el término "toxoide", mejor que el de "anatoxina", es simplemente de conveniencia, pues en esta forma se evitan confusiones entre este último término y el de "antitoxina").

## II

### PREPARACION DEL TOXOIDE

Todos los distintos laboratorios que se dedican a la obtención de este producto, aunque siguiendo diversas técnicas, están de acuerdo en que el procedimiento más cómodo que existe para la preparación del Toxoide está basado en la acción combinada de pequeñas cantidades de formalina y del calor.

Un primer requisito indispensable para la obtención de Toxoide de aceptable valor antigénico, es el de obtener una buena y potente toxina diftérica. Esta se logra por crecimiento de tipo toxígeno de bacilo diftérico en un medio de cultivo favorable. Dicho bacilo debe ser reconocido como buen productor de toxina de alto valor. En cuanto a los medios de cultivo usados, varían en su composición, de acuerdo con el criterio y experiencia de cada uno de los técnicos encargados de la manufactura del Toxoide.

Los medios de cultivo más ampliamente usados son los de Martín, Ramón y Park.

**Caldo Martín.**—“Cortar 500 gramos de carne, mezclar con 1000 c. c. de agua. Calentar a 37°C y mantener veinte horas en la estufa a 37°C para destruir los azúcares. Se exprime y recoge el líquido y se le añaden 5 grms. de sal marina. Después se le adiciona a partes iguales solución de peptona de panzas.

**Solución de Peptona.**—Tomar cinco estómagos de cerdo, lavarlos y picar finamente la mucosa y la musculosa. Se hace la mezcla siguiente: estómago de cerdo picado, 200 gramos; ácido clorhídrico, a 16° Be-10 c. c.; agua a 50° C 1000 c. c.; esta mezcla se pone de doce a veinticuatro horas a 50° C. La pepsina (procedente de la mucosa estomacal) digiere más activamente a esta temperatura. Se lleva luego a 100° C. para destruir la pepsina y se filtra por algodón hidrófilo. Se alcaliniza a 80°C y se vuelve a filtrar a través de papel filtro.

Una vez mezclados a partes iguales la maceración de carne y la solución de peptona se calienta a 70°C, se filtra, neutraliza

y se añade luego por litro siete c. c. de sosa normal. Se esteriliza al autoclave a 117°C, se filtra de nuevo, se reparte en los frascos y se lleva de nuevo a la esterilizadora". Este es el método clásico preconizado por Martín.

**Ramón.**—“Ramón introdujo los medios glucosados en la preparación de caldo para la obtención de la toxina diftérica, mostrando 1o., que la glucosa a una cantidad determinada no impide la producción de la toxina diftérica, sino por el contrario la mejora y 2o., que la fermentación de la carne en la estufa. puede ser ventajosamente reemplazada por la simple maceración a la temperatura de la caja de hielo.

La maceración de la carne de ternera (a la temperatura de la refrigeradora), se mezcla a partes iguales con solución de peptona de “panzas”, la mezcla se ajusta a un pH de 8 y se le adicionan 5 c. c. de solución de glucosa estéril al 30 por ciento por un litro de caldo, esta solución de glucosa es añadida cuando ya el caldo se encuentra repartido en los frascos.”

(Me limito a exponer los anteriores medios de cultivo, de indiscutible valor, pero con los cuales no tuve la oportunidad de trabajar).

**Park.**—Este caldo es preparado a base de carne de ternera joven y peptona Witte, verificándose la fermentación por medio de un cultivo de B. Coli de ocho horas. El medio se ajusta a un pH de 7.7, se reparte y esteriliza y momentos antes de irse a verificar la siembra se le agrega la solución de glucosa estéril, en la misma proporción que en el medio anterior.

Obtenido el medio de cultivo se reparte convenientemente en frascos de los cuales los más ampliamente usados por la ventaja que presentan son los Fernbach, ventaja que se traduce en presentar una mayor superficie al crecimiento del bacilo y por lo tanto un desarrollo mejor y una mayor aeración. De 1500 a 1800 c. c. del medio de cultivo son colocados en cada frasco se tapan convenientemente con algodón, los que a su vez son cubiertos con capuchones de papel, atado al cuello del frasco y se llevan a la esterilizadora. De entre estos aparatos, el tipo más comúnmente usado cuando se trata de producciones en gran escala, es el de los Hornos Arnold, los cuales verifican la esterilización por medio de vapor de agua sobrecalentado. Los frascos son esterilizados en estos aparatos el primer día durante una hora a la temperatura de 100° C. permaneciendo los frascos en la esterilizadora y al siguiente día se lleva el aparato a la misma temperatura que la vez anterior durante hora y media, transcurrido este tiempo se cierra la llave del vapor, se deja enfriar y se transportan los fras-

cos a la incubadora a 37° C., donde permanecen de 24 a 48 horas. tiempo más que suficiente para que si la esterilización no ha estado correcta y el medio resulta contaminado, pueda ser descubierta dicha contaminación.

Al cabo de este tiempo, los frascos se llevan fuera de la incubadora. Si se trabaja con caldo glucosado, se agrega con rigurosas precauciones la solución de glucosa estéril, si nó, se procede directamente a la siembra del organismo diftérico de 24 horas de crecimiento, de reconocido valor toxígeno y de pureza comprobada por medio de coloraciones examinadas al microscopio. Mulford usa bacilo del tipo Park & Williams Núm. 8 y diariamente dicho bacilo es sembrado en tubos conteniendo medios de cultivo de la misma composición que los usados para la obtención de toxinas.

La siembra debe hacerse procurando que los gérmenes queden en la superficie del medio de cultivo y dentro de la mayor asepsia con el objeto de evitar posibles contaminaciones. Una vez verificada dicha siembra los frascos se llevan de nuevo a la incubadora, evitando todo movimiento brusco.

Con el transcurso de los días, va apareciendo en la superficie del medio de cultivo, un velo que se va haciendo más definido a medida que el desarrollo del bacilo aumenta; dicho velo se hace más y más denso, aunque es siempre frágil y cae con facilidad, siendo sustituido por la formación de uno nuevo. Los frascos son examinados diariamente pues el medio de cultivo debe conservar su transparencia y un enturbiamiento podría significar una contaminación.

Al décimo día el bacilo es separado por filtración en embudos especiales, a través de bujías Berkefeld y haciendo uso del vacío. El caldo-toxina filtrado es recibido en frascos rigurosamente estériles. Terminada la operación los frascos Fernbach, embudos, bujías y demás objetos utilizados para verificar la filtración, son esterilizados convenientemente, pues no se debe olvidar que se ha trabajado con bacilos vivos.

De los frascos conteniendo el caldo-toxina y con verdadero cuidado para evitar una infección en el operador o una contaminación en el medio, son tomadas muestras con el objeto de destinarlas a las determinaciones de la "dosis mínima mortal" (D. M. M.), de la L + y del valor de floculación (Lf) de la toxina. Al mismo tiempo se verifica el ensayo de esterilidad, sembrándose de dos a tres c. c. de la toxina contenida en cada frasco en tubos de fermentación conteniendo caldo glucosado estéril. Estos tubos ya sembrados son colocados junto con otro tubo tes-

tigo en el cual no se haya verificado ninguna siembra, en la incubadora en donde permanecen diez días. Este ensayo nos revela la mas ligera contaminación y si la toxina resulta estar contaminada es de nuevo vuelta a filtrar, volviéndose a verificar el ensayo de esterilidad y en caso de que la contaminación subsista el lote de toxina es deshechado.

“Dosis Mínima Mortal” es la menor cantidad de toxina que cuando es inyectada subcutáneamente a un cuy de 250 gramos de peso, lo mata en cuatro días. Para determinarla se hacen distintas diluciones conteniendo  $1/200$ ,  $1/400$ ,  $1/600$ , y  $1/800$  por c. c. de toxina en suero fisiológico. De estas diluciones, un c. c. se inyecta respectivamente en cuyes de 250 gramos de peso.

Supongamos que el cuy que fué inyectado con un c. c. de la dilución conteniendo  $1/800$  de toxina muera al cuarto día con los signos manifiestos de intoxicación diftérica, podremos decir entonces que el valor de esa toxina es de  $1/800$  D. M. M.

Puede darse el caso de que el cuy que recibió la dosis de  $1/600$  (vamos a suponer), muera al segundo o tercer día después de inyectado y el cuy inyectado con la siguiente dosis ( $1/800$ ) no muera sino hasta el quinto o sexto día, entonces si se quiere tener un valor más exacto, se harán nuevas diluciones con dosis más aproximadas una de la otra y se inyectarán nuevamente a cuyes. En el caso de que se quiera tener solamente un valor aproximado, basta tomar un promedio de las dosis y de acuerdo con el orden en que los cuyes hayan muerto. En nuestro ejemplo anterior serían 700 D. M. M. por c. c. el valor aproximado de la toxina. A todo cuy que muera durante este ensayo, debe hacerse la respectiva autopsia con el objeto de averiguar la causa de su muerte. Los cuyes deben permanecer en observación por un espacio de siete días.

La L+ es la menor cantidad de toxina que mezclada con una unidad antitóxica e inyectada subcutáneamente a un cuy de 250 gramos, lo mata en cuatro días.

La unidad antitóxica fué definida arbitrariamente por Erlich como la más pequeña cantidad de antitoxina que mezclada con 100 D. M. M. de una toxina e inyectada subcutáneamente a un cuy de 250 gramos puede retardar su muerte hasta el cuarto día.

El mismo Erlich preparó una antitoxina tipo y que suministran también los Institutos de Higiene de Alemania y de Washington cuya unidad ha sido titulada de un modo exacto. Dicha antitoxina viene mezclada con solución fisiológica glicerinada y conservada en pequeñas ampollitas cuyos marbetes mar-

can la dilución a la que la antitoxina se debe llevar con solución fisiológica para obtener una unidad antitóxica por cada c. c.

Cada c. c. de esta dilución es mezclado con dosis crecientes de toxina (0.15, 0.20, 0.25 0.30) y el volumen es llevado a cuatro c. c. con solución fisiológica. Después de haber permanecido las mezclas durante quince minutos a la temperatura del cuarto, son inyectadas subcutáneamente a cuyes de 250 gramos de peso, se dejan éstos en observación por espacio de siete días y los resultados se interpretan en igual forma que en el ensayo anterior.

Por medio de la Lf (Límite de Floculación) podemos apreciar si la toxina es lo suficientemente potente para obtener de ella un buen toxoide. Su determinación está basada en que, en tubos conteniendo mezclas de una cantidad fija de toxina con cantidades crecientes de una antitoxina tipo, el tubo que flocula primero será aquél que tenga una mezcla de toxina y antitoxina neutralizada. (Pág. No. 17).

(Los Laboratorios Mulford admiten como toxinas aceptables para la preparación de Toxoide, únicamente aquellas que posean una L + no mayor de 0.25 la que puede ser determinada por el método de floculación, por el que la toxina debe mostrar una Lf no menor de siete por c. c.)

Una vez filtrada la toxina diftérica, es tratada con 0.4 por ciento de formalina (LIQUIDO FORMALDEHIDO Q. P. al 40%). Esta toxina es de nuevo filtrada en igual forma que la vez anterior y repartida en frascos especiales, estériles y destinados única y exclusivamente para este propósito. Los frascos son entonces llevados a la incubadora a la temperatura de 39° C.

Experiencias verificadas en la casa Mulford y que concuerdan con las de muchos otros autores, han mostrado que temperaturas superiores a 45°C así como cantidades de formalina superiores a una proporción de 0.5%, dañan un poco las propiedades antigénicas del producto. Cantidades de 0.3% a 0.4% de formalina a una temperatura de 39°C conducen a una destoxificación completa en varias semanas sin pérdida del poder antigénico. De este modo toxinas que tienen 400 D. M. M. en un principio, cambian su dosis mortal en pocos días a 0.1 c. c. y en una semana o poco más llegan a poseer una D. M. M. de 1 c. c. Para llegar de esta dosis a la de 5 c. c. invierten tiempo más largo y por lo general 30 a 40 días después de habersele añadido la formalina esta misma dosis no causa en lo absoluto síntomas de infección en un cuy normal. Sólo cuando se ha llegado a este punto se considera destoxicada la toxina.

Mientras la toxina se encuentra en la incubadora, bajo la influencia del calor y de la formalina, son tomadas muestras de vez en cuando con el objeto de verificar su ensayo de toxicidad, de acuerdo con la técnica que más adelante se expone. (Pág. No. 15).

Tan pronto como el ensayo anterior nos muestra que la des-toxicación de la toxina es completa, este producto se pasa a la refrigeradora y son tomadas muestras alícuotas de los distintos frascos, dichas muestras se mezclan y se verifica el ensayo de su valor antigénico como más adelante se indica. (Pág. No. 19).

Teniendo ya el valor antigénico del Toxoide, dicho producto es diluido con solución fisiológica de tal manera que en un c. c. de esta dilución estén contenidas dos "dosis efectivas". (1) Dosis efectiva como después veremos es aquella que salva a un 80% de los cuyes de la acción tóxica de 5 D. M. M. de una toxina, la cual es inyectada cuarenta y dos días después de haberse inyectado la dosis simple de Toxoide. Hecha esta dilución, se le agrega luego el preservativo. Una solución al 1% de Mercururo-feno y empleando un c. c. de esta dilución por cada 100 c. c. de Toxoide ha dado muy aceptables resultados. Esta solución es de nuevo vuelta a filtrar de una manera igual que en los anteriores casos y ensayada una vez más para toxicidad. Cinco c. c. del producto inyectados en cada cuy de 270 a 320 gramos de peso (tomando un lote de cinco cuyes) no deben causar ni reacción local ni pérdida de peso.

En estas condiciones el producto está listo para ser depositado en su envase respectivo, cuya forma y dosificación varía según el Laboratorio de donde provenga. Una vez verificada la operación de llenado, se toman varias ampollitas del lote al azar y se verifican los últimos ensayos de toxicidad y esterilidad en la forma ya descrita.

.....

(1) Este es el proceso seguido en los Laboratorios Mulford. En la mayor parte de los Laboratorios europeos y algunos de América, la determinación del valor antigénico se hace por medio del ensayo de floculación y son aceptadas únicamente aquellas "anatoxinas" que tengan por lo menos siete unidades Lf por c. c.

### III

## PROPIEDADES

Hemos señalado que hasta el momento actual el procedimiento más cómodo que existe para transformar la toxina diftérica en Toxoide es la acción combinada de la formalina y del calor. Dicha transformación es un proceso irreversible, la toxina transformada por este medio en su derivado inofensivo no vuelve a adquirir su poder tóxico. Ahora bien, es de muchas ventajas reducir la toxicidad de la toxina diftérica en una forma tan rápida como posible, pero es de manera indispensable también que dicha reducción se haga sin pérdida de su poder antigénico. Por esto es que tenemos que determinar en una forma absoluta si la cantidad de formalina añadida así como la temperatura a la cual se expuso la toxina formolada han sido lo bastante precisas para obtener buen material antigénico destoxicado. Para dichas determinaciones nos valemos de los medios de que se dispone para ejercer un control preciso sobre dos de las principales propiedades que el producto Toxoide tiene: su Inocuidad y su Valor Antigénico. Es la primera la que nos permite saber si la acción del calor y de la formalina ha sido del todo suficiente para transformar completamente la toxina en Toxoide. Es la segunda la que nos hace ver si dicha influencia no se ha dejado sentir con menoscabo de dicho valor antigénico.

**INOCUIDAD.**—La inocuidad establece en una forma absoluta la diferencia entre el producto Toxoide y la toxina de la cual deriva. En virtud de no existir una misma estabilidad en los diferentes lotes de toxina y por lo tanto, no saber el grado en el cual la formalina reduce la toxicidad, muestras son tomadas a distintos intervalos de tiempo con objeto de verificar el ensayo de toxicidad, mientras la toxina se encuentra en la incubadora sufriendo la acción del aldehído fórmico y del calor.

El control de la inocuidad se lleva a cabo en la práctica inyectando por vía subcutánea 5 c. c. de la muestra tomada. Se

escogen por lo general cinco cuyes perfectamente sanos de 270 a 320 gramos de peso, para cada muestra. Es el cuy el animal que más susceptible se presenta a la acción de la toxina diftérica y que responde en una forma más regular a ella, es por esto por lo que dichos animales son los preferidos para los ensayos con material diftérico.

Una vez inyectados los cuyes son colocados en observación durante un mes, si en el curso de este tiempo no presentan ni úlceras ni edemas y por el contrario continúan aumentando de peso en una forma normal, deduciremos que la toxina ha perdido todo su poder tóxico. Pero si los cuyes muestran úlceras o reacciones locales pronunciadas en el lugar de la inyección y mueren con signos manifiestos de intoxicación diftérica, la toxina debe ser deshechada, aunque por otro lado presente propiedades características de Toxoide.

**Síntomas de Difteria en los cuyes.**—Después de un período latente o de incubación, el cual si se trata de una dosis grande puede ser hasta de doce horas, una inflamación blanda edematosa hace su aparición en el punto de la inoculación y puede extenderse en todas direcciones a considerable distancia de este punto. Al cabo de 24 horas el animal empieza a manifestar ya síntomas de seria enfermedad, se le encuentra acurrucado en un ángulo de su jaula, con el pelo erizado y disnea definida. Si se toca se siente frío. Si el animal está en pleno período de crecimiento, no puede haber quizás pérdida de peso sino por el contrario continúa en aumento el cual, no obstante, pronto cesa y el peso disminuye rápidamente hasta el momento de la muerte que por lo general acaece en cuatro días. Algunos autores, estudiando los efectos de la temperatura, han mostrado que hay un verdadero período de incubación, seguido de una hipertermia, la que disminuye luego para ser seguida de una marcada hipotermia en el último estado de la enfermedad.

En la autopsia, después de una intoxicación aguda subcutánea, sea de cultivo o de toxina, las lesiones más notables son la masa gelatinosa y el edema sanguinolento que se forman al lado de la inoculación, extendiéndose a través del espesor de la pared abdominal, a la serosa. Las glándulas linfáticas de las axilas están crecidas y congestionadas y en la ingle son también prominentes. El canal abdominal se encuentra generalmente extendido y congestionado de sangre, y un exudado comunmente claro y a menudo en muy considerable cantidad, aparece en la cavidad pleural, observándose también de vez en cuando y

en menor cantidad, en el peritoneo y en el pericardio. Las vísceras abdominales están congestionadas y una notable congestión es observada tratándose de las glándulas suprarenales, las cuales se presentan aumentadas y de un color que varía del amarillo rojizo al rojo obscuro, si se les divide se encuentra que hay hemorragia la cual, según algunos autores, comienza a las 36 horas de la infección y aumenta de las 48 a las 72 después de las cuales, cesa. Cuando la muerte viene rápidamente o se sucede después del cuarto día, esta reacción o es muy poco notable o no se encuentra. Los pulmones por lo común, se encuentran edematosos. De todas estas reacciones, la congestión de las suprarenales es la lesión más constante en la difteria experimental.

**VALOR ANTIGENICO.**—El valor antigénico que toda toxina destoxicada debe tener para que pueda adjudicársele el nombre de Toxoide, viene siendo el que nos indique el poder inmunizante de dicho producto.

En el caso de la toxina, sabemos que su valor antigénico está relacionado al poder de combinación que presenta para con la antitoxina y en este caso, dicho valor puede ser estudiado como ya lo hemos visto, determinando la cantidad de toxina que debe ser mezclada con una unidad antitóxica, de tal modo que quede en esta mezcla de toxina-antitoxina una cantidad libre suficiente para matar un cuy de 250 gramos en cuatro días. Pues bien, este método viene siendo inaplicable al Toxoide pues este producto no mata a ninguna dosis.

Tres son los métodos hoy en día usados para la determinación del valor antigénico de un Toxoide, el de Floculación, método "in vitro" propagado por Ramón y usado en varios laboratorios de Europa y los métodos "in vivo" comúnmente usados en los laboratorios de Estados Unidos.

**METODO DE FLOCULACION.**—La floculación se verifica en mezclas convenientes de toxina diftérica y antitoxina o en mezclas de Toxoide Diftérico y antitoxina. Este método según Ramón, nos da la oportunidad de apreciar fácilmente el valor antigénico de un Toxoide.

Cantidades iguales de Toxoide son distribuidas en una serie de tubos de ensayo de conveniente tamaño y a éstos, son añadidas cantidades crecientes de un suero antidiftérico cuya unidad antitóxica ha sido previamente determinada por el método de Erlich. Los tubos son entonces colocados en un baño de agua a la temperatura de 40°C y observados de tiempo en tiempo. El primer tubo que muestra la floculación (tubo indicador) es el

que contiene una mezcla balanceada o neutra de Toxoide y anti-toxina.

Determinación del valor antitóxico de un suero. Método de Erlich: Teniendo el valor exacto de la L + de una toxina cuya estabilidad date por lo menos de seis meses, dicho valor nos puede servir para determinar el número de unidades antitóxicas del suero.

Mezclas conteniendo una L + (comprendida en un c. c. de una dilución hecha de la toxina en suero fisiológico) y dosis crecientes de antitoxina son hechas y dichas mezclas llevadas a un volumen de 4 c. c. con suero fisiológico, se dejan a la temperatura del Laboratorio por quince minutos y se inyectan por vía subcutánea a cuyes pesando 250 gramos. Al mismo tiempo y en igual forma se inyectan dos cuyes del mismo peso (250 gramos) con una mezcla de toxina-antitoxina conteniendo respectivamente una L + y una unidad antitóxica y el volumen llevado a 4 c. c. con solución fisiológica. Estos cuyes sirven de controles y deben morir al cuarto día de inyectados. En esta prueba se busca la menor cantidad de antitoxina que puede neutralizar la acción de la cantidad fija de toxina, efecto que reconoceremos por sobrevivir el cuy hasta el cuarto día. Si el animal muere antes, el ensayo nos mostrará que las dosis usadas de antitoxina no han tenido el suficiente poder para neutralizar la acción tóxica de la toxina.

Suponiendo que la mínima cantidad de antitoxina que protegió a un cuy de la acción de la toxina, sobrevivió el animal hasta el cuarto día haya sido de 1/500 de c. c., entonces diremos que dicha antitoxina tiene 500 unidades por c. c.

Para esta determinación al igual que para la de la L + de la toxina, se necesitan hacer dos ensayos. El primero que nos indique el valor aproximado y el segundo que nos dará el valor antitóxico exacto del suero.

Teniendo el suero con el valor antitóxico bien determinado, añadimos a cinco tubos conteniendo 5 c. c. del toxoide las siguientes dosis decrecientes de la antitoxina que vamos a suponer tiene un valor de 500 unidades; 0.15, 0.10, 0.08 y 0.06 de c. c., se agitan bien los tubos para hacer las mezclas homogéneas y se colocan en el baño de agua a la temperatura de 40°C. Se observan de tiempo en tiempo. Suponiendo que el tubo que floculó primero (tubo indicador) fué el que contenía 1/10 de c. c. de la antitoxina tipo, es decir, que 50 unidades antitóxicas (1/10 de c. c. de antitoxina equivale a 50 unidades) fueron suficientes para neutralizar 5 c. c. del toxoide, para un c. c. de este, se necesitarán por

lo tanto 10 unidades de la misma antitoxina tipo, por lo que el valor antigénico de este toxoide será de 10 unidades Lf por c. c.

Puede presentarse el caso de que el tubo que floccule primero sea, o el que contenga la menor dosis o la mayor de antitoxina, por lo que es necesario repetir el ensayo en ambos casos poniendo dosis menores o mayores de acuerdo con el resultado obtenido en el primer ensayo. con el objeto de determinar con exactitud la Lf del toxoide.

Ramón basa la utilidad de este ensayo en dos importantes hechos; primero: que el tubo indicador o primero en floccular representa una mezcla balanceada de toxoide y antitoxina y de aquí que este método puede ser usado para ensayar el toxoide y segundo: que el mismo ensayo puede servir para medir el poder relativo inmunizante de los toxoides.

Para Ramón "la reacción de flocculación es una reacción intercoloidal que se efectúa entre dos líquidos complejos: el toxoide que se encuentra en un caldo de composición variable y el suero antitóxico que además de poseer materia proteica, contiene sales y lipoides que tienen un importante papel en la reacción de flocculación. Una ligera influencia puede traer un desequilibrio en la reacción. El mismo Ramón aconseja utilizar un mismo caldo para la preparación de la toxina de donde el toxoide deriva y escoger un suero tipo que dé una flocculación rápida y del cual siempre es preferible tener una gran cantidad; también considera indispensable no agregar en el toxoide o el suero antisépticos tales como el fenol, o tricresol pues entorpecerían la marcha de la reacción".

A menudo se da el caso que diversos toxoides que necesitan el mismo número de unidades antitóxicas para floccular, lo hagan en muy distintos períodos de tiempo. Esto es debido a que diversos toxoides presentan variable afinidad o viveza para combinarse con la antitoxina y se ha podido comprobar que de dos toxoides que tienen el mismo valor antigénico, el que floccula primero (por supuesto que en presencia del mismo suero) es el mejor desde el punto de vista de su valor inmunizante.

**METODO "IN VIVO".**—Por medio de este método podemos hacer una comparación directa de la efectividad de las diferentes dosis de toxoide, las cuales son inyectadas respectivamente a cuyes y estableciendo como "dosis efectiva" la más pequeña cantidad de toxoide que salva a un 80% como mínimo de los cuyes, de la acción tóxica de 5 D. M. M. de una toxina, la cual es inyectada cuarenta y dos días después de haberse inyectado la dosis sola de toxoide. De este modo nos damos cuen-

ta de que el porcentaje de cuyes infectados disminuye a medida que la dosis de toxoide aumenta.

Cuatro lotes de diez cuyes cada uno, de 270 a 320 gramos de peso son inyectados respectivamente en una forma subcutánea con las siguientes dosis de toxoide: 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 c. c. Los cuyes son puestos en observación durante cuarenta y dos días y si en el transcurso de este tiempo alguno de los cuyes llegara a morir, debe practicársele la autopsia con el objeto de saber la causa de su muerte. No es necesario pesarlos diariamente pues con dos veces que se verifique esto, es suficiente. Una quince días después de la inyección y la segunda vez al terminar el plazo de cuarenta y dos días. Al cabo de este tiempo cada animal recibe una inyección subcutánea de 5 D. M. M., de una toxina. Al mismo tiempo cinco cuyes normales de un peso aproximado de 300 gramos son inyectados cada uno y en la misma forma que los anteriores con 5 D. M. M. de la misma toxina. Todos los cuyes son entonces observados diariamente por espacio de cinco días y los animales muertos cuidadosamente autopsiados. Los controles deben morir antes del cuarto día.

El tercer método que sirve para determinar el poder de combinación de un toxoide para con la antitoxina, consiste en añadir a dos unidades antitóxicas de un suero tipo, cantidades variables de toxoide, se dejan el tiempo necesario para que la combinación se verifique y se les añade luego a cada mezcla una **L +** de una toxina. Media hora después de haber permanecido las mezclas a la temperatura del laboratorio, son inyectadas por vía subcutánea a cuyes de 250 gramos. De este modo si el toxoide no tiene ningún poder de combinación, habrá un exceso de antitoxina y los cuyes vivirán. En el caso de que más de una unidad antitóxica se haya combinado con el toxoide, habrá un exceso de toxina y los cuyes morirán dentro de los cuatro primeros días. La mezcla que contenga la cantidad mínima necesaria de toxoide para combinarse con una unidad antitóxica, contendrá también un exceso de una unidad antitóxica y de una **L +** de la toxina y por lo tanto el cuy inyectado con esta mezcla debe morir al cuarto día. Esta cantidad mínima de toxoide nos revela el poder de combinación del mismo producto.

**ESTABILIDAD.**—Muchos y muy variados han sido los experimentos efectuados por diversos hombres de ciencia, con objeto de comprobar esta otra importante propiedad del producto toxoide. Entre ellos los más notables han sido los verificados por Glenny y Ramón. Este último añadió a una toxina la cantidad necesaria de formalina para llevarla a toxoide y la dejó en

la incubadora, recogiendo durante varias semanas dos muestras diarias. Mientras que a una le determinaba su D. M. M., a la otra la calentaba a 65°C después de lo cual le determinaba su poder floculante (LF). Así encontró al principio que mientras el poder floculante era nulo, la toxicidad era grande, pero al estar abolida ésta, la Lf fué la misma que en un principio poseyó la toxina. Esto demuestra que mientras la toxina es destruída por un calentamiento a 65°C, el toxoide no es afectado. Glenny después de hervir por cinco minutos el toxoide, demostró que aún retenía un 10% de su valor inmunizante.

Con objeto de comprobar que la transformación de la toxina en toxoide es un proceso irreversible, se han colocado lotes de un mismo toxoide en distintas condiciones, a la refrigeradora, temperatura del cuarto, etc., y envasado en distintas formas: en ampolletas, en frascos no herméticamente cerrados y por espacio de un largo tiempo, durante el cual se verificaron los ensayos de toxicidad, mostrando dicho toxoide ser inofensivo a pesar del tiempo transcurrido. Se estudió también su valor antigénico, el que nos mostró que el mismo producto conservaba su valor original. Estas y muchas otras experiencias de la misma índole, condujeron al convencimiento de la gran estabilidad que el toxoide posee.

**PROPIEDADES QUIMICAS.**—Casi nada es lo que se puede decir acerca de las propiedades químicas del toxoide, pues es muy poco lo que en su estudio se ha hecho.

Al toxoide se le considera como una proteína (Moloney & Weld), da la reacción débil positiva del biuret, reacciona también en una forma positiva con los reactivos de Millon, de Hopkins y Cole y la reacción xantoprotéica. El toxoide purificado es precipitado por el alcohol etílico.

Por otro lado, los investigadores dedicados al estudio desde el punto de vista químico, de la acción del aldehído fórmico sobre la toxina, no han podido llegar hasta ahora, a nada en concreto y así Kirsin y Bronstein mostraron que durante el envejecimiento de una toxina había una regular pérdida de aminoácidos libres que correspondía a la pérdida de toxicidad y que el toxoide con formalina contenía la mitad de los aminoácidos libres que contenía la toxina original. Basándose en esto, los mismos investigadores, dicen que la transformación de una toxina en toxoide depende de la acción que ejerce la formalina sobre uno de los dos grupos de aminoácidos que según ellos la toxina posee. Velluz & Vincent a su vez creen que el aldehído fórmico en presencia de ciertas proteínas sufre algunas condensaciones

dando origen al toxoide: Dicho estudio como vemos, está aún por resolverse.

Además del aldehído fórmico otras substancias del mismo grupo son capaces de transformar la toxina. Así tenemos, la acroleina, el crotonaldehído, la urotropina; por otro lado tenemos el yodo y algunos ácidos grasos como el ricinoléico. De todos estos los que probaron ser más eficaces fueron el aldehído fórmico y el ácido ricinoléico y principalmente el primero. Del resto todos presentan inconvenientes de diversa índole.

La influencia que ejercen los preservativos en las toxinas destinadas a la preparación de toxoide, así como la ejercida por los distintos pH que presentan los diversos lotes de toxina, fué estudiada por Moloney y Weld, quienes llegaron a las siguientes conclusiones: toxina añadida de fenol, cresol o cualquiera de los otros preservativos usados para el caso, cuando se han querido transformar en toxoide no han dado resultados satisfactorios, pues o bien en muchos casos el valor antigénico es nulo o al agregársele la formalina se presenta un precipitado que estorba y anula posteriores ensayos. En cuanto a la influencia que el pH ejerce, concluyeron que en toxinas que poseen un pH entre 7 y 10, el grado de destoxicación es mayor mientras más alcalina es la toxina. No obstante, los mismos autores comprobaron que toxinas con un pH de 10 al ser añadida la formalina pierden su poder de floculación. Entre un pH de 7 a 9 se encuentra, según ellos, el pH óptimo para la preparación de toxoide.

## IV

### USOS DEL TOXOIDE.

Haciendo estudios en este producto, se ha comprobado que puede sustituir a la toxina para la producción de suero antidiftérico.

Aunque pueden ser usados en ocasiones otros animales, son los caballos perfectamente sanos y jóvenes. los preferidos para la obtención del producto mencionado. Estos animales son examinados previamente y no son aceptados a menos de que se encuentren libres de toda enfermedad transmisible y la prueba de la maleína (diagnóstico del muermo) sea negativa. Cada caballo recibe periódicamente dosis convenientes de antitoxina tetánica con el objeto de conservarlos inmunes contra el tétanos.

Los caballos reciben inyecciones por vía subcutánea, de dosis crecientes de Toxoide Diftérico (20, 35, 60, 100, 150, 200, 300, 400 c. c.) efectuándose las dos primeras en un intervalo de ocho días y las siguientes cada cinco días. El período de hiperinmunización dura de 40 a 50 días como promedio, verificándose la sangría tan pronto como el ensayo de prueba nos da un valor suficientemente alto, (750 unidades por el método de floculación). Por lo general la sangría se lleva a cabo unas ocho horas después de la última inyección.

Se extraen de la vena yugular de ocho a nueve litros de sangre y se recogen en frascos especiales esterilizados de antemano y provistos de una pesa que embona perfectamente en el frasco. Los frascos con la sangre recogida se llevan a la refrigeradora y al abrigo de la luz, soltándose la pesa para que vaya comprimiendo el coágulo. A las 24 horas el suero está limpio. se transvasa y se le determina su valor antitóxico.

Otro método de recoger la sangre consiste en recibirla en frascos conteniendo solución ya sea de citrato de sodio u oxalato de amonio para prevenir la formación del coágulo. El plasma que sobrenada 24 horas después es sometido a un proceso de con-

centración, por precipitaciones sucesivas con el sulfato de amonio, cloruro de sodio y ácido acético en soluciones saturadas o por el sulfato de amonio en solución a distintas concentraciones. Así se llega a obtener la antitoxina diftérica concentrada.

“La riqueza en antitoxina de los sueros preparados por medio del Toxoide Diftérico es igual o mayor que la de los preparados por medio de la toxina; estos mismos sueros son capaces de neutralizar “in vivo” e “in vitro” la toxina diftérica y en cuanto a su eficacia desde el punto de vista terapéutico, es exactamente la misma que la que tienen los sueros obtenidos por la toxina”.

El uso del Toxoide diftérico en México, como agente inmunizante en la prevención de la difteria, no ha sido lo suficientemente extenso para que podamos hacer conclusiones con respecto a su eficacia.

Pero sí bástenos saber que en Francia, Alemania, Estados Unidos y algunos otros países, millones de habitantes de todas edades han sido inmunizados con este producto y las autoridades respectivas han tomado un verdadero interés en él.

Estadísticas levantadas por las autoridades sanitarias de los países antes citados, muestran que un 85% a 95% de personas que muestran por la prueba preliminar de Schick ser susceptibles a la difteria pueden ser inmunizados por el Toxoide y dar la prueba de Schick negativa después de dos inyecciones.

La inmunidad comienza a mostrarse en dos o tres semanas, llegando a su más alto porcentaje de la cuarta a la octava semana después de la última inyección. La duración de la inmunidad es incierta aunque probablemente similar a la conferida por la mezcla de Toxina-Antitoxina. Lafaille y Loisseau han demostrado que individuos cuya reacción de Schick había llegado a ser negativa por inyecciones de Toxoide, esta reacción negativa persistía al cabo de uno y dos años y en muchos casos al cabo de cuatro años después de haber sido inyectados.

En algunos países omiten la prueba preliminar de Schick para los niños no mayores de ocho años, en vista de que la mayor parte de ellos a esa edad son susceptibles a la difteria y consideran mejor inmunizarlos a todos. En muchachos ya de mayor edad y en adultos es verificada la prueba de Schick y únicamente a aquéllos que muestran una reacción positiva les es aplicado el toxoide.

Dos son los métodos más frecuentemente usados de vacunación por medio del toxoide diftérico: el de Ramón usado en Francia y algunos otros países y el método original del doctor

Thomas S. Githens de los Laboratorios Mulford seguido en algunos otros laboratorios americanos.

La técnica de vacunación que en Francia se sigue es en tres tiempos, se verifica una primera inyección subcutánea de 0.5 c. c., después de un intervalo de tres semanas se inyecta 1 c. c. y quince días después de efectuada ésta, se inyectan 1.5 c. c. Operando en esta forma según Ramón se obtiene el máximo de inmunidad en el menor tiempo. Las inyecciones se efectúan en la fosa sub-espinal de preferencia.

La técnica del doctor T. S. Githens consiste en aplicar dos inyecciones de 1 c. c. cada una, por vía subcutánea y con un intervalo de tres semanas.

## PRUEBA DE SHICK

Esta prueba nos revela por un método exacto y simple qué personas son susceptibles a la difteria.

Para practicarla es necesario disponer de una toxina perfectamente estabilizada y titulada. La cantidad a inyectar debe ser de 1/50 de la D. M. M. y debe estar contenida en 0.1 c. c. de una dilución hecha de toxina en suero fisiológico.

Las inyecciones se practican en la dermis de la cara anterior del antebrazo con el bisel de la aguja vuelto hacia arriba y paralelamente a la superficie cutánea, efectuándose la inyección muy lentamente. Existen agujas de platino y jeringas calibradas especiales para el caso.

**Reacción negativa.**—El sitio de la inyección permanece normal, no se produce ninguna reacción.

**Reacción positiva.**—Si el paciente es susceptible, aparecen en el lugar de la inyección y 24 a 48 horas después de haber sido practicada ésta, un enrojecimiento e infiltración de los tejidos de 1 a 2 centímetros de diámetro. Esta reacción persiste de siete a diez días, dejando al desaparecer una descamación y pigmentación de la piel.

Una reacción de Schick negativa muestra, según este mismo investigador, que existe más de 1/30 de unidad antitóxica en 1 c.c. del suero de la persona que ha dado la prueba negativa, mínimo necesario para estar preservado de la Difteria.

En el control de la prueba de Schick, se usa toxina calentada a 70° C, previamente diluida con suero fisiológico de manera que 1 D. M. M. esté contenida en 5 c.c. de suero fisiológico, pero tomando en cuenta el volumen de toxina que ocupe la D. M. M. De esta dilución se inyectan como en el caso anterior 0.1 c.c. verificándose la inyección en el otro brazo.

Esta prueba control nos descubre las falsas reacciones que debidas a ciertas proteínas del bacilo diftérico se efectúan. Dichas reacciones hacen su aparición más pronto que en la prueba

verdadera y desaparecen dentro de las 20 ó 48 horas dejando una pigmentación de la piel pero sin descamación.

La toxina para la prueba de Schick verdadera se conserva sin diluir y en el momento de ir a utilizarse se hace la dilución. Tanto esta toxina como la que sirve para la prueba control deben ser conservadas en la refrigeradora y al abrigo de la luz.

## VI

### VENTAJAS DEL TOXOIDE

“Un agente ideal inmunizante es aquel que puede producir el mayor grado de inmunidad en el más corto tiempo con las menores reacciones locales o generales y sin efectos desagradables”.

Estudios hechos en este producto, han venido a comprobar, en algunas de estas consideraciones, las ventajas que presenta el producti Toxoide sobre la mezcla de Toxina-Antitoxina, usada como agente inmunizante.

**Ausencia de Suero.**—En ciertos casos la inyección de sueros antitóxicos ha provocado reacciones que fueron primero atribuidas a la antitoxina pero que más tarde quedó demostrado ser debidas a la presencia del suero. La presencia del suero de caballo en la mezcla de Toxina-Antitoxina puede por lo tanto, sensibilizar a determinadas personas y si estas mismas personas necesitan posteriormente nuevas inyecciones de un suero proveniente del caballo, pueden tener con ello reacciones peligrosas. Son los llamados fenómenos anafilácticos. El Toxoide a diferencia de la mezcla de Toxina-Antitoxina, no contiene suero, sino como lo hemos visto, no es más que la toxina modificada por la acción de la formalina y del calor. Es por lo que este producto no puede sensibilizar a un individuo a subsecuentes inyecciones de sueros terapéuticos.

**El Toxoide presenta una mayor estabilidad que la mezcla de Toxina-Antitoxina.**—En contadas ocasiones se ha sabido que la mezcla de T-A ha llegado a ser ligeramente tóxica durante su almacenamiento, debido a que, bajo extrañas circunstancias, hay una separación de toxina de la mezcla y aunque ninguna muerte se ha atribuido al uso de este producto, sí ciertas reacciones locales. La posibilidad del aumento de toxicidad en la mezcla, conduce a favorecer el uso del Toxoide, producto que experimentadores dedicados a su estudio, han demostrado que es de una estabilidad absoluta.

**Produce inmunidad rápidamente.**—Estadísticas levantadas en distintos países muestran que el Toxoide produce la inmunidad en cerca de la cuarta parte del tiempo requerido por la mezcla de T-A. El mismo Toxoide produce cierto grado de inmunidad en 10 ó 15 días, por lo que, con relativa facilidad, se podría controlar una epidemia, mientras que con la mezcla de T-A en vista de que su acción es lenta, sería difícil controlar una epidemia que estuviera ya en progreso.

Hay individuos, que al ser tratados por el Toxoide, presentan algunas reacciones locales y raras veces generales, las cuales parecen ser debidas a ciertas proteínas específicas y a la sensibilidad de estos mismos individuos a dichas proteínas. Así se explica que estas reacciones se manifiesten más particularmente en el caso de individuos convalescientes de difteria y en el de adultos que durante su vida han estado en contacto con el bacilo de Löffler, contacto oculto por lo general. Algunos investigadores creen poder reconocer dichas personas por una "reacción-prueba" especial, usando Toxoide diluído al 1 por 20 e inyectando en forma intradérmica 0.1 c. c. de esta dilución. Si a los tres días el área rojiza formada al rededor del punto de inyección no abarca más de un centímetro de diámetro, puede esperarse que no se verificarán reacciones severas con las inyecciones sucesivas de toxoide en caso contrario, se recurrirá a dosis menores de toxoide en un mayor tiempo.

"El Dr. Wenger de los Laboratorios Biológicos Mulford, haciendo estudios especiales en este asunto, ha concluído que no existe ninguna relación entre la sensibilidad presentada por algunas personas a las inyecciones intradérmicas y la presentada a las inyecciones por vía subcutánea, en el caso del toxoide, por lo que dichos Laboratorios han abandonado el uso preliminar de la "reacción-prueba".

Las reacciones que el toxoide produce en algunos casos no son análogas como se supuso a la prueba falsa de Schick, pues se ha demostrado que ambas reacciones pueden ocurrir en los mismos individuos. Así mismo el Dr. Wenger inyectó 386 enfermeras simultáneamente con la prueba de Schick y la reacción de prueba del Toxoide, obteniendo los resultados siguientes: 191 fueron negativas a ambos; 69 positivas a ambos; 116 negativas a la prueba de control de Schick y positivas a la prueba del Toxoide y 10 negativas al Toxoide y positivas a la prueba del control del Schick. Esto muestra que las reacciones causadas por la toxina destoxicada por la formalina, tienen un distinto origen al de las reacciones causadas por la toxina calentada.

### TOXOIDE.—ACIDO FORMICO

**Problema.**—Determinar la utilidad del ácido fórmico para reemplazar a la formalina en la manufactura del Toxoide.

Se llevó a cabo este experimento tomando como base la teoría sustentada por el Dr. Felton, que supone que el formaldehído agregado a la toxina es gradualmente transformado en ácido fórmico y que este ácido y no el aldehído viene siendo el factor influyente en la conversión de la toxina a toxoide.

El primer trabajo emprendido en este experimento fué tratar una toxina fresca sin preservativo con 0.4% de formalina al 40% en un lote y otro lote de la misma toxina con 0.24% de ácido fórmico al 85%, formándose en este último un precipitado que se depositó en el fondo.

Puestos ambos lotes en la incubadora, a distintos intervalos de tiempo se hicieron los respectivos ensayos de toxicidad; resultando que la toxina conteniendo el ácido fórmico fué del todo destoxicada dentro de los veinte y cinco primeros días, habiendo pasado dicho lote a la refrigeradora. El que contenía formalina requirió cerca de dos veces el tiempo que necesitó el anterior para destoxicarse. Teniendo abolida la toxicidad en ambos lotes de toxina, se procedió a verificar su ensayo antigénico. El resultado de este ensayo nos mostró que del lote con formalina se obtuvo un buen antígeno, mientras que el tratado con fórmico perdió toda actividad antigénica.

He aquí como se procedió para la verificación de los ensayos anteriormente descritos:

**Fecha 3-14-30.**—Caldo preparado con carne de ternera y peptona Witte, repartido convenientemente en frascos Fernbach, poniendo 1800 c. c. en cada uno y esterilizados previamente en hornos Arnold, fueron sembrados con cultivos de bacilo diftérico de 24 horas y en seguida colocados en la incubadora a la temperatura de 37° C.

**Fecha 4-21-30.**—Los frascos fueron agitados y los tapones de dichos frascos removidos, tomando para ello todas las precauciones necesarias para evitar una posible contaminación.

**Fecha 4-25-30.**—La toxina fué filtrada a través de bujías Berkefeld, de un modo absolutamente estéril. A esta toxina se le hizo su prueba de esterilidad, sembrando dos c. c. de la toxina en tubos de fermentación con caldo glucosado. Al mismo tiempo se tomaron muestras para determinar el valor de floculación su D. M. M. y su I. +. Este mismo día se hicieron dos lotes de dicha toxina, agregándosele a uno en la proporción conveniente

0.5% de formalina al 40% y al otro 0.24% de ácido fórmico al 85%. Ambos lotes fueron colocados en la incubadora a la temperatura de 37°C.

Fecha 4-26-30.—Se verificó la determinación de la dosis mínima mortal y de la L+ en cuyes cuyo peso varió de 230 a 250 gramos.

FECHA	Toxina	Dosis	1a. Dil.	Caja	Peso	Sexo	Color	2o. día	3er. día	4o. día	5o. día	6o. día
4-26-30	301	200	9	29	8	250	M P y C	Mto.	—	—	—	Dipt.
	—	400	—	39	—	240	M O	Mto.	—	—	—	"
	—	600	—	59	—	240	M O y B	210	Mto.	—	—	"
	—	800	—	79	—	230	M B	220	200	—	—	Mto.
	—	0.10	1 unid.	—	—	250	H R y B	230	230	—	210	210
	—	0.15	"	—	—	240	H R A B	210	Mto.	—	—	Dipt.
	—	0.20	"	—	—	240	M A y O	Mto.	—	—	—	Dift.
	—	0.25	"	—	—	230	M R y N	Mto.	—	—	—	Dift.

Por los datos anteriormente expuestos, la toxina manifestó tener 600 D. M. M. por c. c. y una L+ de 0.15.

Por otro lado se verificó el ensayo de floculación, colocando 5 c. c. de la toxina en tubos de ensayo destinados para el caso, y agregando a cada uno de ellos cantidades crecientes respectivamente de una antitoxina tipo de 500 unidades por c. c. Los tubos fueron puestos en seguida en un baño de agua mantenido a una temperatura de 40°C., tomándose la hora. Con más o menos cortos períodos de tiempo, fueron observados los tubos, resultando que en el tubo en el que primero empezó a aparecer el precipitado de floculación fué el que contenía 0.10 de antitoxina, es decir, la toxina en estudio, manifestó tener una Lf igual a 10 unidades.

El siguiente cuadro muestra los datos obtenidos en el ensayo anterior de floculación:

FECHA	Toxina	Antitox	Tiempo	DOSIS							
				0.06	0.07	0.08	0.09	0.10	0.11	Lf-10	
4-26-30	301	Tipo	10.30								
		500 uds				10.58	10.53	10.50	10.53		

Fecha 5-19-30.—Se hizo el último ensayo de toxicidad en la toxina añadida de ácido fórmico, el último por haberse encontrado en esta prueba que dicha toxina había perdido su poder tóxico. Este lote fué con tal motivo sacado de la incubadora y colocado en la refrigeradora.

Ensayo de toxicidad de la toxina adicionada de fórmico:

FECHA	Caja	Color	Sexo	Peso	Dosis	no. día	12o. día	19o. día	26o. día	3o. día	38o. día
5-19-30	—	N v C	H	275	„	310	320	„	336	340	„
	—	N	M	270	„	310	360	„	340	340	„
	—	N	H	300	„	320	390	Mto.	—	—	Pulm.
								Efmo.			
	—	R y O	M	275	„	320	350	Bien	380	380	B.en
								peq. úlc.			

Por lo expuesto anteriormente vemos que cuatro de los cinco cuyes inyectados sobrevivieron y siguieron aumentando de peso en una forma normal por lo que dicha toxina fue considerada detoxificada.

Ensayo semejante se hizo al mismo tiempo con la toxina formolada; en este primer ensayo se nos mostró conservando su poder tóxico aún, como lo muestra el siguiente cuadro, por lo que se le mantuvo un tiempo mayor en la incubadora.

FECHA	Caja	Color	Sexo	Peso	Dosis	no. día	16. día	20. día	12o. día	10o. día	
5-19-30	2	R y N	H	310	5 c. c.	320	380	Bien	390	390	Bien
6-14-30	6	O y B	M	300	5 c. c.	Mto.	—	—	—	—	Dif.
	—	O	H	300	„	260	Mto.	—	—	—	„
	—	B v N	M	300	„	320	320	—	310	250	Mto. D.
									úlc.	parl.	
	—	N, Bn	M	270	„	320	300	—	Mto.	—	Dif.
	—	O B N	M	275	„	290	290	—	300	240	Mto.
										parl.	

Fué a los cincuenta días cuando dicha toxina se vino a encontrar del todo detoxificada por lo que como la anterior, también esta se pasó a la caja de hielo.

FECHA	Caja	Color	Sexo	Peso	Dosis	5o. día	12o. día	19o. día	26o. día	
6-14-30	4	R	M	300	5 c. c.	310	330	340	320	400
	—	P A B	M	300	„	310	310	340	390	430
	—	B	M	270	„	250	260	300	340	400
	—	B y R	M	270	„	250	Mto.	—	—	Pleuresía.
	—	O y B	M	270	„	270	280	300	330	430

Por medio de los anteriores ensayos se comprobó que el ácido fórmico (aparentemente) detoxicaba en la proporción añadida, y en una forma absoluta, la toxina diftérica quedando por estudiar si dicha detoxicación se había verificado sin pérdida de su poder antigénico, este último, propiedad característica e indispensable del producto Toxoide.

**Fecha 7-15-30.**—Con objeto de fijar dicho poder antigénico se procedió en la forma siguiente: Ambas toxinas fueron puestas en ensayo antigénico con las dosis de 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 c. c. del producto original. Cuarenta y dos días después, fueron inyectados los cuyes con 5 D. M. M. con el objeto de comprobar cuál era la dosis efectiva de ambos productos. Mientras que la toxina con formalina nos mostró tener una "dosis efectiva" de 0.2 (salvando seis de los ocho cuyes del efecto de 5 D. M. M.), la toxina con fórmico no mostró en lo absoluto ningún valor antigénico.

(Ver los protocolos de estos ensayos en las páginas números 35 y 36).

En vista de los resultados obtenidos con el ensayo anterior y con la idea de que una más lenta acción y cantidades más pequeñas de ácido fórmico pudieran conducirnos a obtener un buen material antigénico, las siguientes preparaciones fueron hechas:

**Fecha 8-26-30.**—A frascos conteniendo un litro de toxina cada uno, con una D. M. M. de 500 y una L. + de 0.25, se añadieron respectivamente las siguientes dosis decrecientes de solución de ácido fórmico al 85%: 2.4, 2.0, 1.6, 1.2, 0.8 y 0.4 c. c. por ml. al mismo tiempo y como comparación otro frasco más, conteniendo un litro de la misma toxina, fué añadido de 4.0 c. c. de solución

## ENSAYO ANTIGENICO DE LA TOXINA CON FORMALINA

FECHA	Caja	Color	Sexo	Peso	Dosis	7-22	8-3	8-15	8-25	Inyectados con 5 D. M. M.				
										2o.	3o.	4o.	5o.	
7-15-30	4	P	H	270	0.1	Bien	340	Bien	420	Bien	Efmo.	Mto.	—	Dift.
	—	C	M	270	—	Bien	365	Bien	460	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	P y B	M	280	—	Bien	340	Bien	430	Efmo.	Mto.	—	—	Dift.
	—	P y C	H	270	—	Bien	Mto.	—	—	—	—	—	—	Perit.
	—	O y R	M	300	—	Bien	380	Bien	470	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	R y N	M	300	—	Bien	370	Bien	490	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	A y N	H	280	—	Bien	350	Bien	444	Efmo.	Efmo.	Efmo.	Mto.	Dift.
	—	O	H	280	—	Bien	345	Bien	450	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	R O B	M	300	—	Bien	380	Bien	480	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	O N R	H	280	—	Bien	340	Bien	430	Efmo.	Efmo.	Mto.	—	Dift.
	5	P y B	M	280	0.2	Bien	330	Bien	Mto.	—	—	—	—	Pulm.
	—	B	M	280	—	Bien	360	Bien	470	Bien	Efmo.	Mto.	—	Dift.
	—	A y N	H	300	—	Mto.	—	—	—	—	—	—	—	Pleur.
	—	P y B	H	300	—	Bien	390	Bien	490	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	O y R	H	320	—	Bien	400	Bien	490	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	N	H	310	—	Bien	400	Bien	500	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	C y N	M	270	—	Bien	370	Bien	440	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	O y B	H	280	—	Bien	340	Bien	430	Efmo.	Efmo.	Mto.	—	Dift.
	—	R y N	M	310	—	Bien	340	Bien	440	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	B	H	270	—	Bien	400	Bien	500	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	6	O	H	300	0.6	Bien	380	Bien	480	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	B y N	M	300	—	Bien	380	Bien	480	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	R y N	M	300	—	Bien	380	Bien	470	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	O y B	M	300	—	Bien	390	Bien	500	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	B y R	H	270	—	Bien	340	Bien	450	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	R	H	310	—	Bien	390	Bien	490	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	P A B	M	280	—	Bien	350	Bien	470	Bien	Efmo.	Mto.	—	Dift.
	—	B	M	280	—	Bien	340	Bien	450	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	N B n	H	310	—	Bien	400	Bien	490	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	O B N	M	270	—	Bien	350	Bien	460	Efmo.	Efmo.	Mto.	—	Dift.
	7	B C P	M	280	0.8	Bien	370	Bien	470	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	A M	M	290	—	Bien	400	Bien	500	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	R y N	M	300	—	Bien	400	Bien	500	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	B R N	H	280	—	Mto.	—	—	—	—	—	—	—	Perit.
	—	B	H	270	—	Bien	370	Bien	470	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	N	M	300	—	Bien	370	Bien	Mto.	—	—	—	—	Pulm.
	—	O y B	M	300	—	Bien	400	Bien	500	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	P y B	M	310	—	Bien	410	Bien	500	Bien	Bien	Bien	Bien	—
	—	R O B	H	290	—	Bien	380	Bien	Mto.	—	—	—	—	Perit.
	—	O y R	M	280	—	Bien	390	Bien	490	Bien	Bien	Bien	Bien	—

### CONTROLES

2	B y P	M	300	5 D M M	Mto.	Al 2o. dia.
—	C y B	M	300	—	"	"
—	O	H	300	—	"	"
—	B	M	300	—	"	"
—	B y N	H	300	—	"	"

VALOR ANTIGENICO 0.2 c. c.

## ENSAYO ANTIGENICO DE LA TOXINA CON ACIDO FORMICO

FECHA	Caja	Color	Sexo	Peso	Dosis	7-22	8-3	8-15	8-25	Inyectados con 5 D. M. M.				
										20.	30.	40.	50.	
7-15-30	.1	B C P	H	289	0.1	Bien	346	Bien	430	Efmo.	Mto.	Mto.	---	Dift.
---	---	O	H	300	---	Bien	Mto.	---	---	---	---	---	---	P 10
---	---	P y B	M	280	---	Bien	Mto.	---	---	---	---	---	---	Peric.
---	---	P	H	270	---	Bien	340	Bien	430	Efmo.	Efmo.	Mto.	---	Dift.
---	---	A y M	M	290	---	Bien	390	Bien	500	Mto.	---	---	---	Dift.
---	---	R y N	M	300	---	Bien	390	Bien	400	Mto.	---	---	---	D'f.
---	---	B y N	H	300	---	Bien	400	Bien	500	Efmo.	Mto.	---	---	Dift.
---	---	B R N	M	280	---	Bien	370	Bien	480	Mto.	---	---	---	Dift.
---	---	A y N	M	270	---	Bien	360	Bien	470	Mto.	---	---	---	D'f.
---	---	O y B	M	270	---	Bien	370	Bien	470	Mto.	---	---	---	Dift.
21	C		H	300	0.2	Bien	400	Bien	500	Efmo.	Mto.	---	---	Dift.
---	B		M	290	---	Bien	380	Bien	490	Efmo.	Mto.	---	---	Dift.
---	A y N		M	290	---	Bien	390	Bien	500	Efmo.	Mto.	---	---	Dift.
---	P y B		M	270	---	Bien	370	Bien	460	Mto.	---	---	---	Dift.
---	O y R		H	300	---	Bien	390	Bien	480	Mto.	---	---	---	Dift.
---	B y R		M	310	---	Bien	400	Bien	500	Mto.	---	---	---	Dift.
---	C y N		M	300	---	Bien	390	Bien	490	Mto.	---	---	---	D'f.
---	P y N		M	280	---	Bien	380	Bien	470	Mto.	---	---	---	Dift.
---	O y B		H	290	---	Bien	380	Bien	470	Mto.	---	---	---	D'f.
---	C y R		H	310	---	Bien	410	Bien	500	Efmo.	Mto.	---	---	Dift.
22	P A B		M	300	0.6	Bien	400	Bien	500	Mto.	---	---	---	Dift.
---	A y N		H	300	---	Bien	400	Bien	500	Mto.	---	---	---	Dift.
---	A		H	300	---	Bien	390	Bien	500	Efmo.	Mto.	---	---	Dift.
---	N		M	300	---	Bien	400	Bien	490	Mto.	---	---	---	Dift.
---	P y A		M	290	---	Bien	Mto.	---	---	---	---	---	---	Perit
---	B y R		H	310	---	Bien	410	Bien	500	Mto.	---	---	---	Dift.
---	P y B		H	290	---	Bien	400	Bien	500	Efmo.	---	---	---	Dift.
---	O y B		M	280	---	Bien	370	Bien	Mto.	---	---	---	---	Perit.
---	O y P		M	290	---	Bien	380	Bien	490	Efmo.	Mto.	---	---	Dift.
---	C y A		M	280	---	Mto.	---	---	---	---	---	---	---	Pul.
24	P y C		M	310	0.8	Bien	400	Bien	500	Bien	Efmo.	Mto.	---	Dift.
---	C y B		M	310	---	Bien	410	Bien	500	Efmo.	Mto.	---	---	Dift.
---	O		M	300	---	Bien	Mto.	---	---	---	---	---	---	Plea.
---	O y R		M	300	---	Bien	400	Bien	480	Mto.	---	---	---	D'f.
---	B		H	300	---	Bien	370	Bien	480	Mto.	---	---	---	Dift.
---	B R N		M	290	---	Bien	380	Bien	490	Mto.	---	---	---	Dift.
---	N Bos.		H	270	---	Bien	370	Bien	460	Mto.	---	---	---	D. y P.
---	P A B		H	290	---	Bien	380	Bien	470	Mto.	---	---	---	Dift.
---	R y B		M	280	---	Bien	360	Bien	Mto.	---	---	---	---	Dift.
---	B y N		M	300	---	Bien	390	Bien	500	Mto.	---	---	---	(...?) Dift.

VALOR ANTIGENICO.—Nulo

de formalina al 40%. En el frasco al cual se agregó la cantidad más grande de ácido fórmico, se formó un precipitado, aunque no en igual cantidad pero sí del mismo aspecto, el precipitado se formó en los dos siguientes frascos. Esos siete frascos fueron colocados en la incubadora a la temperatura de 37°C.

**Fecha 9-9-30.**—Catorce días después, fueron tomadas muestras para verificar el ensayo de toxicidad. Dos cuyes fueron destinados a cada muestra obteniendo los resultados siguientes:

FECHA	Caja	Color	Sexo	Peso	Dosis	%	10. día	20. día	40. día	50. día	
9-9-30	17	B y R	H	260	5 c. c.	0.4 F	Bien	Efmo.	Mto.	—	Dift.
	—	P	M	250	„	„	„	Bien	Efmo.	220	M-D
	—	P y B	M	245	„	0.04	Mto.	—	—	—	Dift.
	—	C	M	245	„	„	„	—	—	—	„
	—	O	H	245	„	0.08	„	—	—	—	„
	—	R O B	M	250	„	„	„	—	—	—	„
	—	P y C	M	250	„	0.12	„	—	—	—	„
	—	O N R	M	250	„	„	„	—	—	—	„
	—	O y R	M	240	„	0.16	„	—	—	—	„
	—	N	H	250	„	„	„	—	—	—	„
	—	R y N	M	240	„	0.20	„	—	—	—	„
	—	A y C	H	245	„	„	„	—	—	—	„
	—	A y N	H	250	„	0.24	Bien	Bien	260	270	320
	—	C y N	M	250	„	„	„	„	270	275	310

Por este primer cuadro podemos apreciar que la solución de toxina con la dosis de 0.24 de fórmico, a los quince días, ya se encontraba destoxicada, mientras que el resto de los cuyes inyectados, tanto con la toxina formicada como con la formolada; murieron con signos manifiestos de intoxicación diférica.

El segundo ensayo, verificado cinco días más tarde, nos vino a mostrar exactamente lo mismo que el primero. La toxina con 0.24 de fórmico fué pasada a la caja de hielo.

Fué ya el sexto ensayo el que mostró que la toxina con formalina se encontraba destoxicada, mientras que el resto de las toxinas que habían sido adicionadas de fórmico, continuaban como al principio, es decir, poseyendo la toxicidad de la toxina original, sin que hubieran podido privarla de ella, ni la acción del fórmico, ni del calor.

FECHA	Caja	Color	Sexo	Peso	Dosis	%	1o. día	2o. día	7o. día	14o. día	21o. día
10-9-30	2	P	H	280	5 c. c.	0.4 F	Bien	Bien	Bien	340	Bien
	—	P y B	M	280	„	„	„	„	„	360	„
	—	B y C	M	280	„	0.04	Mto.	—	—	—	Dift.
	—	B y R	H	290	„	„	„	—	—	—	„
	—	B	M	280	„	0.08	„	—	—	—	„
	—	C y N	M	280	„	„	„	—	—	—	„
	—	A y N	H	300	„	0.12	„	—	—	—	„
	—	O y B	H	280	„	„	„	—	—	—	„
	—	P y B	M	300	„	0.16	„	—	—	—	„
	—	O y R	H	320	„	„	„	—	—	—	„
	—	N	M	310	„	0.20	„	—	—	—	„
	—	R y N	M	280	„	„	„	—	—	—	„

Por estos resultados se pudo inferir que la destoxicación de la toxina era completa o casi completamente un efecto del ácido que dependía quizás de una precipitación de la toxina. Con el objeto de comprobarlo el precipitado fué sacado del fondo del frasco que contenía 0.24% de ácido fórmico y que había permanecido 15 días en la incubadora y 20 en la caja de hielo y fué inyectado a cuyes por vía subcutánea, en cantidades representando 1.25, 2.5, 5.0 y 10 c. c. de la toxina original y suspendiendo dicho precipitado en suero fisiológico.

FECHA	Caja	Color	Sexo	Peso	Dosis	1o. día	2o. día	3o. día	4o. día
10-23-30	20	P	H	270	1.25	270	260	240	240
	—	O	H	270	2.5	250	250	Efmo.	„ Dift
	—	C y B	H	270	5.	Efmo.	Mto.	—	„
	—	N y B	M	270	10.	Mto.	—	—	„

Todas estas dosis, excepto la más pequeña, mataron los cuyes en un término de cuatro días. Un trabajo semejante se hizo con un litro de la toxina usada anteriormente, a la cual se agregó ácido clorhídrico hasta obtener un pH idéntico al que nos mos-

traba tener la toxina con 2.4 por mil de ácido fórmico. Dicha adición produjo un precipitado de las características del anterior y que en las mismas circunstancias y a igual número de dosis fué inyectado a los cuyes, obteniendo con ello un resultado similar como lo muestra el siguiente cuadro:

FECHA	Caja	Color	Sexo	Peso	Dosis	1o. día	2o. día	3o. día	4o. día	
11-10-30	22	B R N	M	280	1.25 c.c.	Bien	Bien	Efmo.	Efmo.	
	—	B C P	H	280	2.5	Efmo.	Mto.	—	—	Dift.
	—	A y B	H	270	5.	Bien	Efmo.	Mto.	—	„
	—	A	M	290	10.	Efmo.	Mto.	—	—	„

Estos ensayos nos demostraron que la toxina había sido precipitada pero no completamente destruída.

En conclusión, los resultados de los anteriores ensayos nos muestran que el ácido fórmico no tiene acción específica sobre la toxina diftérica, pues sus efectos dependen de su acidez y por lo tanto, no hay ninguna posibilidad de usar el ácido fórmico para reemplazar a la formalina en la manufactura del Toxoide.

**FIN**

## BIBLIOGRAFIA

**Diphtheria.**—Its Bacteriology, Pathology and Immunology.  
Medical Research Council. 1923.

**Annales de L'Institut Pasteur.**—No. 9, septembre de 1928.

**Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie.**—No.  
4, enero de 1930.

**Diphtheria Toxoid.**—Thomas S. Githens, M. D.

**Antigenic Studies on Diphtheria Toxoid.**—Thomas S. Git-  
hens, M. D. ....

