

TOXINA ANATOXINA Y ANTITOXINA ESTAFILOCOCCICAS. TRATAMIENTO DE LAS AFECCIONES A ESTAFILOCOCCOS

(Estudio Inmunológico y clínico)

Por JULIO MORALES SARAVIA

*Departamento de Bacteriología e Inmunología
Instituto Nacional de Higiene y Salud Pública.*

En 1884 J. DENIS y H. VAN DE VELDE, demostraron la existencia de una verdadera toxina estafilocócica, que inyectada provocaba la aparición de antitoxina. En 1891 ARLOING señaló un veneno en los cultivos de estafilococos. RODET y COURMONT un año mas tarde, obtuvieron este veneno y notaron que producía un aumento en los fenómenos supurativos. En 1906 KRAUS y PRIBRAM, consiguieron filtrados tóxicos que inyectados intravenosamente a la dosis de 1 a 2 c.c. por kilo, mataban conejos entre 5 y 30 minutos. La antitóxina los protegía. P. MERCIER (1). En 1914 J. DUMAS (2) estudiando 17 cepas de estafilococos dorados logró obtener una hemolisina para los hematíes de conejo. En este mismo año NICOLLE y CESARI (3) estudiaron el mismo fenómeno y notaron la gran variación de toxicidad entre las cepas. Anotaron además como propiedades fundamentales de los filtrados tóxicos, tres características: poder hemolítico, necrótico y letal. Prepararon también un suero antiestafilocócico. J. PARKER (4) y sus asociados han hecho un estudio de toxinas estafilocócicas, usando la reacción intradérmica en conejos. Gracias a un dispositivo especial F. M. BURNET (5) logra obtener una toxina digna de este nombre. BURNET (6) y PARKER (4) investigan con los filtrados los poderes hemolítico, necrótico, y mortal.

En el trabajo de EARL L. BURKY (7) encontramos que, BARBER, JORDÁN, DACK y sus asociados, RAMSEY y TRACEY han informado sobre las toxinas estafilocócicas de gérmenes recuperados de alimentos contaminados.

La anatoxina estafilocócica preparada por F. M. BURNET (6) al ser inoculada en conejos, engendra la aparición de una antitóxina específica.

La mezcla de tóxina y antitóxina estafilocócicas, presentan un fenómeno de floculación BURNET (8), según él, análogo al que G. RAMÓN describe para las mezclas de tóxina y antitóxina diftéricas.

En 1931 y 32 PARISH & CLARK (9) publican sus trabajos, las novedades encontradas y sus conclusiones, haciendo mención al favorable resultado clínico obtenido en un corto número de pacientes. Este mismo autor hace mención que PARKER, VALENTÍN y DIX, publican resultados similares y discuten la aplicación terapéutica de la anatoxina.

LA TOXINA ESTAFILOCOCICA, SU PREPARACION Y SUS PROPIEDADES

Para merecer el nombre de tóxina, el filtrado de cultivos de estafilococos debe reunir los tres caracteres esenciales puestos en relieve por M. NICOLLE & CESARI (3): *poder hemolítico, necrótico y letal*.

Para obtener esta tóxina son indispensables dos factores: un medio de cultivo favorable y una cepa de alto poder tóxico. En efecto como lo vamos a demostrar mas adelante, no todas las cepas son toxigénicas, es ésta seguramente una de las causas de fracaso y tal vez la mas importante al pretender considerar como tóxico todo filtrado de estafilococos.

A) *Medios de cultivo*. Desde el medio natural la pleura, que fué utilizado por DENIS y VAN DE VELDE, se han propuesto numerosos y variados medios de cultivo. Para nuestro estudio hemos utilizado y adoptado, el que en la actualidad usa G. RAMÓN (10) en el Instituto Pasteur. La temperatura, la cantidad de gas carbónico, el pH del medio, son factores que rigen el desarrollo del germen y como consecuencia su producción de tóxina. Posteriormente G. RAMÓN & A. BERTHELOT (11) preconizaron un nuevo medio de cultivo a base de bazo de vaca, con un buen rendimiento tóxico.

B) *Elección de la cepa*. Numerosos autores han insistido sobre el hecho de que, no todas las cepas son productoras de tóxina, y que, entre las cepas toxigénicas se encuentran variaciones considerables. P. MERCIER (1) estudia 26 cepas de procedencia humana y animal sin ningún éxito. De 426 cepas P. NELIS llegó a obtener una la 72 capaz de producir una buena toxina. Nosotros hemos estudiado 103 cepas de estafilococos de procedencia humana y hemos logrado aislar 21 cepas de poder tóxico variable, de éstas solamente dos de alto poder toxigénico la 22 y la 91, gracias a los caracteres que posee la tóxina y que mas adelante describiremos.

Materiales y Métodos. Hemos empleado glóbulos rojos de conejo lavados, desfibrinados y diluidos al 3%, hemos seguido el método hemolítico, considerando como límite los tubos con hemólisis total.

CUADRO Nº 1

Titulación de los filtrados por el método hemolítico

FILTRADO 14

Tox. 1/100	0.1	0.15	0.25	0.30	0.35	0.40
Glb. r. 3 %	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.
Hemólisis	— — —	— — +	— + +	— + +	+ + +	+ + +
Título Lh.					1/285	

FILTRADO 22

Tox. 1/100	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10
Glb. r. 3 %	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.	1 cc.
Hemólisis	— — +	— + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
Título Lh.			1/1420			

No hemólisis: — — — H. Parcial: — — + H. casi completa: — + +
 Hemólisis total: + + +

En esta misma forma hemos investigado los 103 filtrados, considerando como tóxicos solamente 21, con un título hemolítico mayor que 1/200. Los resultados de estas investigaciones están resumidos en el cuadro siguiente, en el que además del título, indicamos la fecha de aislamiento y el origen de donde fué tomada la muestra. Como se podrá apreciar las dos últimas cepas son las que nos han dado un mayor poder tóxico, y como consecuencia un mayor poder antigénico, es por esto que para la producción de nuestras toxinas y anatoxinas solamente hemos empleado las cepas 22 y 91.

CUADRO Nº 2

Título hemolítico de veintiún cepas de estafilococos

Nº de orden	Nº del filt.	Fecha de aislamiento	Origen de la muestra	Título Lh.
1	37	22/X/37	Panadizo	1/200
2	70	27/I/38	Quemadura infectada	1/200
3	71	27/I/38	Adenitis T.B.C.	1/200
4	75	2/II/38	Absceso glúteo abto.	1/200
5	43	1/XI/37	Flemón de la mano	1/250
6	55	12/XI/37	Callo infectado cerrado	1/250
7	14	1/IX/37	Antrax de la espalda	1/285
8	36	22/X/37	Onixis	1/400
9	42	1/XI/37	Osteomielitis mano	1/400
10	13	1/IX/37	Forúnculo del cuello	1/500
11	20	9/IX/37	Mastitis cerrada	1/500
12	29	12/X/37	Herida infectada	1/500
13	58	7/I/38	Mordedura infectada	1/500
14	61	8/I/37	Herida infectada	1/666
15	52	8/XI/37	Absceso abierto	1/666
16	78	2/XI/38	Forúnculo del cuello	1/676
17	28	28/X/37	Adenitis del cuello	1/800
18	40	22/X/37	Herida infectada	1/800
19	21	9/IX/37	Absceso glúteo	1/900
20	22	9/IX/37	Mastitis abierta	1/1420
21	91	20/VII/38	Forúnculo cerrado	1/1660

PROPIEDADES DE LA TOXINA ESTAFILOCOCICA

Después de numerosos estudios e investigaciones hechas por distintos autores, se ha llegado a la conclusión de que, la toxina estafilocócica es altamente hemolítica, necrótica y mortal, lisa además los glóbulos blancos y las células nerviosas, hepáticas, esplénicas y renales. Respecto a lesiones microscópicas nosotros no hemos investigado, pero los autores que se han ocupado del asunto señalan lesiones anatomopatológicas a nivel de distintas visceras. Desde el punto de vista fisiológico, P. NELIS y J. J. BOUCKART observaron después de la inyección endovenosa de 2.5 c.c. de toxina en la yugular, una baja progresiva de la presión arte-

rial, lentitud cardiaca de origen sinusal, seguida de fibrilación ventricular y muerte del animal. Señalan además la acción neurotrópa de la toxina. Fundamentalmente la propiedad mas importante, es desde el punto de vista terapéutico, puesto que permite engendrar la aparición de antitoxina específica y como consecuencia la inmunidad antiestafilocócica. Nosotros inoculando conejos con dosis progresivamente crecientes de toxina, y mejor aun de anatoxina hemos conseguido obtener antitoxina específica en la sangre circulante.

DOSAJE DE LA TOXINA ESTAFILOCOCCICA

Para medir la potencia tóxica de los filtrados hemos empleado tres técnicas, siguiendo el trabajo de P. MERCIER (1).

- 1º Investigación de la dosis mínima hemolítica (M.H.D.).
- 2º La dosis mínima necrótica para la dermis del conejo S.N.D.).
- 3º La dosis letal por la inyección intravenosa (M.L.D.).

Para la determinación del poder antigénico empleamos dos métodos:

1º Ladeterminación del poder de combinación de la toxina frente a la antitoxina específica por el estudio de: a) La dosis combinada hemolítica, y b) La dosis combinada necrosante.

2º Se puede apreciar por otra parte el valor floculante de la toxina frente a la antitoxina específica utilizando un suero testigo. La cantidad de unidades antitóxicas necesarias para hacer aparecer la floculación en 1 c.c. de filtrado, expresa en unidades antigénicas el valor de la toxina.

Materiales y Métodos. Vamos a emplear para estos dosajes únicamente las toxinas 22 y 91, obtenidas según la técnica descrita anteriormente; glóbulos rojos de conejo lavados y diluidos al 3 % y antitoxina standard titulada en unidades internacionales. Los métodos son los señalados mas arriba.

Para una mejor comparación y mas fácil apreciación de los distintos dosajes efectuados, sintetizamos en un solo cuadro los valores limites obtenidos.

CUADRO N° 3

Síntesis de los distintos dosajes efectuados con nuestras toxinas

DOSAJE DEL PODER TÓXICO

Nº de la Tox.	D. M. Hemolítica	D. M. Necrótica	D. M. Letal
22. L. I	1/1420	1/1400	0.25 en 6'
91. L. I	1/1660	1/1500	0.25 en 6'

DOSAJE DEL PODER ANTIGÉNICO

Nº de la Tox.	D. Combinada hemolítica	D. Combinada necrosante	Unidades floculantes
22. L. I	0.20	0.027	23
91. L. I	0.25	0.023	30

LA ANATOXINA ESTAFILOCÓCICA

Su inocuidad, su actividad inmunizante medida de esta actividad

La anatoxina estafilocócica es un producto de transformación del filtrado tóxico. Obtenida la toxina y titulado su poder tóxico, es transformada en anatóxina, según el principio general de preparación de anatóxinas. Para asegurarnos de su completa transformación es necesario apreciar sus cualidades; dos son esenciales:

1° Debe tener una inocuidad absoluta y, 2° Debe poseer un valor antigénico elevado.

Para el control de su inocuidad se emplean dos procedimientos:

"In vitro" comprobando la desaparición del poder hemolítico.

"In vivo" constatando la pérdida del poder necrótico, y la desaparición del poder letal por la inoculación endovenosa al conejo. La determinación del poder antigénico intrínseco se hace gracias a dos métodos ambos "in vitro".

a) Determinación del poder de combinación de la anatóxina frente a la antitoxina específica. Método de NELIS (13).

b) La apreciación del valor floculante frente a la antitoxina específica.

El título antigénico de nuestra anatóxina corresponde a 16 unidades. Este título es fundamental para poder obtener resultados terapéuticos favorables y satisfactorios. No es pues suficiente añadir una cantidad de formol a cualquier caldo cultivo de estafilococos, y pretender con esto obtener una anatóxina inofensiva y eficaz. Es indispensable conocer y precisar el número de unidades antigénicas antes de ser empleada en terapéutica. Las reacciones muy fuertes y los fracasos señalados por algunos investigadores, no serán debidas a un control poco riguroso de la inocuidad de los filtrados, o al empleo terapéutico de una anatóxina de poder antigénico muy bajo o nulo tal vez? En fin los resultados que se obtienen actualmente y que se obtendrán mas tarde, confirmarán una vez más, la favorable influencia que tiene la anatóxina estafilocócica en todos aquellos procesos en los cuales es susceptible su empleo.

APLICACION TERAPEUTICA DE LA ANATOXINA ESTAFILOCOCCICA

Conocemos desde hace mucho tiempo la multiplicidad de terapéuticas preconizadas como medio de lucha para el tratamiento de las estafilococias, y sabemos también que todas ellas, o tienen una relativa influencia sobre el estafilococo o más corrientemente no la tienen. La introducción de la anatóxina en terapéutica humana data solo del año 1933, fecha en la que empezó sus primeros ensayos Dolman de Toronto, publicando en este mismo año sus primeros resultados netamente halagadores. Es desde entonces que la anatóxina se revela como un agente curativo de primer orden, y más aun como un agente profiláctico de gran eficacia.

Ya desde 1930 a 1932, BURNET (5) de un lado y GENGOU por el otro habían constatado que, los animales inmunizados con la anatóxina sobrevivían mucho más tiempo que los testigos a la septicemia estafilocócica experimental.

PARIS, O. MEARA y CLARK (14) demostraron la aparición de anti-tóxina en el suero de conejos inmunizados con anatoxina, y la protección de este suero a pericotes inoculados con estafilococos por vía intraperitoneal, los testigos sucumbían a las pocas horas.

En Julio de 1935 P. NELIS (15) con una anatoxina de alto poder antigénico, trata 80 sujetos atacados de forunculosis y antrax con éxito.

G. RAMÓN y BOCAJE (16) en 1937 publican los últimos y favorables resultados alcanzados con el tratamiento anatóxico en Francia, concluyendo en la eficacia del tratamiento con cifras elevadas.

Sen muchos los investigadores que han publicado sus ensayos terapéuticos con la anatoxina, los resultados son bastante satisfactorios; todos los autores están de acuerdo y nosotros lo hemos constatado en nuestras experiencias, que la forunculosis cede al tratamiento anatóxico desde las primeras inyecciones, hemos constatado igualmente que la anatóxina eleva la tasa de antitóxina en el suero de los sujetos vacunados. Mas adelante describiremos la variable respuesta antitóxica que sigue a la vacunación. El acné pustuloso, el antrax, la sicosis, las hidrosadenitis, las mastitis, se benefician notablemente con el tratamiento. Los autores extranjeros dicen que las osteomielitis tanto del adulto como del niño, son notablemente influenciadas P. MERCIER (1). Nosotros hemos tratado un buen número de osteomielitis de distintas edades, los resultados han sido variables, mas adelante describiremos algunos de estos casos.

En resumen nuestra anatóxina se muestra de un alto valor terapéutico e inmunológico, y está indicada su aplicación en todos aquellos casos en los cuales está presente el estafilococo. Seguramente que más tarde las numerosas observaciones y constataciones, de clínicos y especialistas irán reafirmando sus resultados y ampliando su radio de actividad, ya que es un producto que merece toda atención y entusiasmo por que llena una muy grande finalidad, desde que en el presente es la última palabra para combatir las estafilococias cutáneas e internas, incluyendo dentro de éstas las septicemias estafilocócicas que no hemos tenido la oportunidad de observar, pero que, los autores extranjeros describen casos tratados con admirable resultado.

OBSERVACIONES PERSONALES

Después de haber precisado nuestros dosajes, pruebas serológicas, después de haber constatado la inocuidad de la anatóxina y su alto poder antigénico comprendido entre 15 y 20 unidades; emprendimos la vacunoterapia por la anatóxina en las estafilococias humanas, iniciándonos en los consultorios de Cirugía y Piel del Hospital Dos de mayo, luego en las distintas salas donde se podía encontrar casos apropiados para este tratamiento; posteriormente y en vista de los éxitos alcanzados iniciamos la vacunación en el consultorio de Cirugía del Hospital Arzobispo Loayza, hasta el momento con iguales resultados. La mayor parte de los enfermos de los consultorios presentaban estafilococias del tipo agudo, algunas, estafilococias crónicas con brotes periódicos. Para nuestro tratamiento hemos empleado la anatóxina pura, observando las

reacciones producidas en los enfermos a débiles dosis (0.1) de c.c. Hemos adoptado siguiendo a los extranjeros como sitio de elección, la fosa subescapular, y como vía la inyección subcutánea, teniendo siempre la precaución de inyectar sistemáticamente 0.1 de c.c. en la primera inyección, con lo cual conseguimos anular las reacciones locales y generales de carácter alarmante.

En general 2 ó 3 inyecciones han sido suficientes para alcanzar los resultados deseados; en los casos crónicos y recidivantes hemos necesitado de 5 a 7 inyecciones, llegando a poner en las dos últimas hasta 2 c.c. con lo cual cedía el brote alcanzando la curación.

Aconsejamos el empleo sistemático de 0.1 de c.c. en todos los sujetos para descartar de este modo la hipersensibilidad específica que pueden presentar algunos sujetos, además esta débil cantidad de anatóxina es preparadora del organismo a la acción estimulante de la segunda inyección. Antes de iniciar el tratamiento, se deberá tener en cuenta el buen estado del mecanismo glico regulador y de los riñones, investigando en la orina albúmina y azúcar, para en caso que hubiera, corregir primero el trastorno y luego empezar la vacunación.

POSOLOGIA

Después de haber tratado mas de 200 casos y colocado más de 1000 inyecciones, de una anatóxina que tenía como título mínimo 16 unidades antigénicas, podemos señalar las dosis siguientes que comprenden un tratamiento para el adulto:

Primera inyección subcutánea	0.1 de c.c.
Segunda " "	0.3 a 0.5 de c.c.
Tercera " "	0.5 a 1 c.c.
Cuarta " "	1 a 1 ½ c.c.
Quinta " "	1 ½ a 2 c.c.

Intervalo.—Las inyecciones han sido colocadas con cinco días de intervalo; si las reacciones fueran demasiado intensas se puede espaciar a siete días; yo no recuerdo haber tenido que esperar mas de seis días para colocar la dosis siguiente.

REACCIONES EN EL CURSO DEL TRATAMIENTO

La mayor parte de nuestros enfermos han tolerado perfectamente las dosis y soportado el tratamiento anatóxico sin mayores reacciones. Se pueden observar sin embargo:

Reacciones locales.—En los primeros momentos que siguen a la inyección los sujetos sienten una sensación de escozor, esto se explica por que el caldo anatóxico no es isotónico y debe contener trazas de aldehído fórmico, las reacciones posteriores son casi siempre una zona de edema, a veces eritema, apreciable muy especialmente en las personas de piel blanca, doloroso a la presión y que puede alcanzar el tamaño de la palma de la mano; síntomas todos que desaparecen a las 48 horas.

Reacciones focales.—Estas son diferentes según el grado de evolución en que se encuentren los elementos, por ejemplo; hemos observado en la forunculosis que: cuando el forúnculo está en inicio, las pequeñas tumoraciones rojas y puntiagudas, se hunden y desaparecen sin dejar huellas. Cuando el forúnculo está rojo, tumefacto e indurado, constituyéndose el clavo, se produce un reblandecimiento brusco y se vacía en el término de 48 horas, evolucionando hacia la cicatrización rápidamente. En los casos que el forúnculo está abierto se observa una congestión pasajera de la lesión y una evolución rápida.

En los casos de osteomielitis hemos observado una reacción focal con mayor afluencia de exudado, que luego desaparece para empezar a evolucionar favorablemente, quedando en algunos el trayecto fistuloso y escaso exudado; en otros sujetos con fistula y pérdida de tejidos, se ha reparado la piel, ha cerrado la fistula en un tiempo relativamente corto y han sido dados de alta clínicamente curados.

Reacciones generales.—Como las reacciones focales las reacciones generales dependen de los sujetos, siendo como consecuencia de lo mas variables, sin llegar nunca a producir un cuadro tan alarmante. Debo hacer presente que en la mayoría de sujetos tratados las reacciones generales han faltado, un pequeño número de pacientes han acusado malestar general, calofrío, dolor de cabeza, uno que otro temperatura discreta, síntomas que no han durado más de 48 horas. En varios enfermos de los hospitalizados hemos mandado hacer una numeración y fórmula leucocitaria después del tratamiento sin haber notado variantes de importancia.

*RESULTADOS ALCANZADOS CON LA ANATOXINA EN EL
TRATAMIENTO DE LAS ESTAFILOCOCIAS EXTERNAS*

Los resultados han sido bastante halagadores especialmente en las estafilococias puras, el forúnculo, el antrax, siguen la evolución que hemos descrito mas adelante bajo la influencia del tratamiento; hemos constatado también beneficios en algunos casos de osteomielitis; adjuntamos unas cuantas observaciones sacadas de un total de más de 200 casos esperando que puedan ilustrar la favorable influencia y eficaz acción de la anatóxina estafilocócica como agente terapéutico.

Primera Observación

Hospital Dos de Mayo. Sala de Odriozola. Cama N° 6.

Germán Zegarra de 47 años. Después de una neumonía, inicia un brote de forunculosis localizados en su mayor parte en la región dorso-lumbar y glútea. Examinado el sujeto muestra mas de 22 forúnculos en distinta etapa evolutiva, llegando a ser imposible mantenerse en decúbito dorsal. El 14 de Diciembre del 38 le iniciamos su tratamiento.

La tasa de antitóxina natural es de 0.4 de unidad.

Al día siguiente de la primera inyección ligero malestar, reacción local discreta, los forúnculos han seguido la evolución anteriormente descrita. La segunda inyección no le produce mayor reacción y el sujeto inicia un franco estado de mejoría, manifestándonos haber podido dormir de espaldas, gracias a la desaparición de los forúnculos.

En el término de veinte días, recibe 5 inyecciones con un volumen total de 3 c.c. de anatóxina. Antes de dársele de alta se le tomó una muestra de sangre, constatándose que su tasa de antitóxina había subido a 12 unidades. Sale en los primeros días de enero sin que ningún elemento nuevo haya vuelto a presentarse.

Segunda Observación

Hospital Dos de Mayo. Sala del Carmen. Cama N° 31.

Paulino Valenzuela de 19 años. Viene con un forúnculo del labio superior que data de cuatro días. Presenta todos los caracteres de malignidad, gran tumefacción y deformación del labio y regiones vecinas, estado general algo comprometido. Iniciamos su tratamiento inmediatamente con 0.2 c.c. de anatóxina. La mejoría fué muy manifiesta, al día siguiente esa tumefacción indurada se reblandeció, después de la segunda inyección se ha vaciado espontáneamente, desapareciendo todo peli-

gro a los pocos días es dado de alta en perfectas condiciones. Recibió 4 inyecciones con un volumen total de 2 c.c. Las dos últimas fueron puestas en el Consultorio de Cirugía.

Tercera Observación

Hospital Dos de Mayo. Consultorio de Cirugía.

Enrique Carmona de 28 años. Se presenta portando un voluminoso antrax de la espalda que data de dos semanas, está rojo, indurado, con varios puntos supurativos, el paciente dice no haberse eliminado en ningún momento el pus, efectivamente todos son clavos duros. Su estado general es bueno, sus orinas presentan solamente trazas de albúmina.

Tasa de antitóxina natural 0.66 de unidad.

Iniciamos el tratamiento anatóxico el 14 de diciembre, después de la primera inyección el antrax se ha reblandecido, e iniciado un franco período de maduración, para abrirse al día siguiente y evacuarse el pus con gran facilidad. La reacción local fué discreta, general no hubo. Recibe su segunda inyección el 17 del mismo mes, el paciente manifiesta haber tenido reacción fuerte, con síntomas de malestar general, dolor de cabeza y ligeramente febril; las subsiguientes inyecciones son bien toleradas, la tasa de antitóxina después de la tercera inyección solo había subido a 2 unidades, después de la quinta inyección le tomamos otra muestra de sangre y la cifra persiste, sin embargo la lesión ha cerrado y el sujeto se va perfectamente curado. Debo hacer presente que, la observación en los pacientes del consultorio resulta mucho mas difícil que en los hospitalizados, por que los del consultorio acuden a curarse únicamente cuando presentan la lesión que les mortifica, tan luego como ésta disminuye o desaparece, ya no regresan, esto nos ha ocurrido en un buen número de sujetos que después de la primera o segunda inyección se sentían completamente bien, las lesiones habían secado y no regresaban más, pese a que se les advertía la conveniencia de ponerse por lo menos cuatro inyecciones para evitar la recidiva. En cambio han habido pacientes que cumplían con nuestra indicación; en algunos casos rebeldes hemos llegado a poner hasta siete inyecciones, alcanzando a dominar el brote. En muchos sujetos solo han sido suficientes dos inyecciones para poder llegar a alcanzar la curación, sin embargo de nuestra estadística excluimos estos resultados, y solamente consignamos aquellos casos que han recibido por lo menos tres inyecciones, habiendo tenido la evidencia de que en los 15 ó 30 días siguientes no han vuelto a presentar nuevos elementos. A continuación como estadística general y de con-

junto, vamos a exponer un cuadro de estafilococias cutáneas tratadas con la anatóxina, se incluyen en ella casos recientes y crónicos; la evolución en ambos es la misma, la diferencia estriba en que para los casos crónicos se necesitan mayor número de inyecciones mientras que para los recientes solo son suficientes de dos a tres inyecciones.

CUADRO Nº 4

Resultados terapéuticos alcanzados con la anatóxina estafilocócica

Nº de orden	Nombre del enfermo	Edad en años	Naturaleza de la afección	Nº de inyecc.	Anatóxina recibida en c. c.	Resultados
1	T.M.	17	Forunculosis	5	3.5	C.
2	G.Z.	47	Forunculosis	5	3.5	C.
3	A.C.	20	Acné Pustuloso	9	11.5	D.
4	P.R.	21	Rinofina	5	3.5	C.
5	V.L.	25	Antrax	5	3.5	C.
6	E.R.	40	Forunculosis	5	3.5	C.
7	V.A.	16	Forunculosis	5	3.5	C.
8	M.L.	38	Hidrosadenitis	4	2.0	C.
9	E.C.	27	Forunculosis	4	2.0	C.
10	G.C.	42	Antrax	4	2.0	C.
11	E.C.	28	Antrax	5	3.0	C.
12	E.P.	28	Forunculosis	5	3.0	C.
13	M.J.	32	Hidrosadenitis	4	2.0	C.
14	S.A.	21	Forunculosis	3	1.0	C.
15	A.L.	39	Antrax	4	2.0	C.
16	D.O.	30	Orzuelos	3	1.0	C.
17	C.M.	16	Forunculosis	5	3.5	C.
18	C.D.	15	Forunculosis	4	2.0	C.
19	A.M.	49	Forunculosis	4	2.0	C.
20	G.A.	19	Forunculosis	4	2.0	R.
21	J.C.	39	Forunculosis	4	5.5	C.
22	A.M.	15	Forunculosis	4	2.0	C.
23	G.B.	25	Forunculosis	4	2.0	C.
24	G.M.	23	Hidrosadenitis	4	2.0	C.
25	E.H.	33	Antrax	4	2.0	C.
26	E.S.	37	Forunculosis	4	2.0	C.
27	E.P.	65	Antrax oper.	6	5.0	B.

28	N.R.	28	Forunculosis	4	2.0	C.
29	M.G.	25	Forunculosis	4	2.0	C.
30	T.S.	54	Forunculosis	4	2.0	C.
31	M.R.	35	Forunculosis	3	1.0	C.
32	L.O.	25	Forunculosis	3	1.0	C.
33	A.P.	26	Forunculosis	5	3.0	C.
34	C.A.	45	Piodermitis	3	1.0	C.
35	P.V.	16	Forunculosis	4	2.0	C.
36	P.P.	26	Forunculosis	4	2.0	C.
37	D.G.	65	Forunculosis	5	3.5	C.
38	G.N.	35	Forunculosis	5	3.5	R.
39	A.P.	15	Forunculosis	3	1.0	C.
40	F.S.	30	Forunculosis	4	2.0	C.
41	J.P.	59	Anthrax oper.	4	2.0	C.
42	E.L.	39	Forunculosis	4	2.0	C.
43	J.R.	21	Hidrosadenitis	5	3.0	C.
44	C.S.	22	Forunculosis	3	1.0	C.
45	J.S.	29	Hidrosadenitis	7	8.0	A.
46	A.P.	26	Forunculosis	5	3.5	R.
47	P.V.	19	Forunculosis	4	2.0	C.
48	E.E.	36	Acné	7	7.5	D.
49	J.T.	20	Forunculosis	3	1.0	C.
50	L.M.	40	Forunculosis	5	3.5	C.
51	M.M.	44	Anthrax	7	6.0	C.
52	E.B.	22	Forunculosis	3	1.0	C.
53	O.V.	17	Forunculosis	4	2.0	C.
54	M.V.	35	Forunculosis	4	2.0	C.
55	A.R.	22	Forunculosis	3	1.0	C.
56	A.C.	20	Forunculosis	4	2.0	C.
57	L.T.	16	Forunculosis	3	1.0	C.
58	I.M.	39	Forunculosis	3	1.5	C.
59	H.M.	20	Forunculosis	4	2.5	C.
60	J.C.	50	Forunculosis	4	2.8	C.
61	V.P.	17	Forunculosis	3	1.8	C.
62	P.V.	24	Hidrosadenitis	3	1.7	C.
63	J.C.	41	Forunculosis	4	2.4	C.

Casos tratados en el Consultorio de Cirugía del H. Loayza

Nº de orden	Nombre del enfermo	Edad en años	Naturaleza de la afección	Nº de inyecc.	Anatoxina recibida en c. c.	Resultados
64	R.A.	24	Forunculosis	6	5.5	C.
65	R.U.	22	Mastitis	4	2.0	C.
66	P.B.	28	Osteomielitis	7	7.3	M.
67	Y.I.	20	Mastitis	3	2.0	C.
68	L.R.	15	Forunculosis	3	1.8	C.
69	J.O.	22	Mastitis	3	1.7	C.
70	I.R.	21	Flemón cuello	4	2.6	C.
71	C.G.	22	Absceso mano	4	2.0	C.
72	T.C.	20	Forunculesis	3	1.6	C.
73	R.T.	38	Forunculosis	3	1.5	C.
74	V.N.	19	Mastitis	4	2.0	C.
75	A.M.	38	Forunculosis	3	1.5	C.
76	M.R.	26	Antrax	4	2.5	C.
77	D.A.	28	Mastitis	4	2.0	C.
78	I.C.	30	Mastitis	4	2.0	C.
79	G.T.	26	Mastitis	3	1.0	C.
80	C.S.	18	Mastitis	6	5.0	C.
81	A.L.	25	Forunculosis	3	1.0	C.
82	D.U.	22	Forunculosis	3	1.0	C.
83	B.M.	45	Forunculosis	3	1.0	C.

C., curación; R., recidiva; B., beneficiado; D., desaparición;
A., aliviado; M., mejorado.

Por las observaciones anteriores y el cuadro que adjuntamos la anatoxina estafilocócica se destaca como un agente curativo de primer orden, anulando toda otra terapéutica que no puede prevalecer en vista de los acontecimientos. Sin embargo, estas observaciones y casos tratados son pocos para poder concluir y señalar un tratamiento standard; sabemos que esto es imposible en medicina humana por que, la suceptibilidad del sujeto no es la misma en todos los casos, es pues el médico el que tendrá que controlar la tolerancia, para continuar aumentando la dosis, o detenerse en ella hasta una próxima fecha, de todas maneras hacen falta muchísimas observaciones que confirmen una vez por todas el alto valor terapéutico de la anatoxina en todas las estafilococias.

ALGUNAS OBSERVACIONES DEL EMPLEO DE LA
ANATOXINA EN LAS OSTEOMIELITIS

He tenido la oportunidad de ensayar el tratamiento anatóxico en varios casos de osteomielitis de las diferentes salas del Hospital Dos de Mayo, inspirado en el entusiasmo de trabajadores extranjeros, y con el gran interés de poder aplicar esta nueva medicación específica a tales casos.

Los resultados obtenidos han sido variables, y se explica, dada la diversidad de formas de osteomielitis; con estos pocos casos sería prematuro dar una opinión definitiva; sin embargo voy a exponer lo observado y los beneficios que se han podido conseguir.

En muchos la mejoría ha sido bien manifiesta, en algunos hemos alcanzado la curación clínica, seguida de alta del sujeto. En casi todos ellos hemos podido constatar como sube la tasa de antitóxina específica en la sangre circulante, por medio de dosajes hechos paralelamente con el tratamiento, y que, comparados con la tasa inicial, resultan ser cifras elevadas. Incluimos solamente dos observaciones con su gráfica correspondientes.

Primera Observación

Hospital Dos de Mayo. Sala de Santo Domingo N° 35.

Felipe Yalán de 20 años. Desde la edad de 10 años padece de una osteomielitis de la tibia izquierda; hace cuatro años que fué operado, se alivió y cicatrizó; pero desde hace 15 días a consecuencia de un traumatismo en la cicatriz, le ha empezado la supuración.

Orinas normales. Wassermann y Kahn negativos.

Tasa de antitóxina natural 1.4 unidades.

Iniciamos su tratamiento el 8 de diciembre del 38 con 0.1 de c.c. Al día siguiente únicamente reacción local. Las demás inyecciones fueron perfectamente toleradas. La evolución de la lesión ha sido favorable y rápida, los dosajes del suero fueron hechos inmediatamente antes de la inyección siguiente; recibe cinco inyecciones con un total de 3 c.c. de anatóxina. Fué dado de alta clínicamente curado, con 26 unidades. Cuadro N° 9 (III).

Segunda Observación

Hospital Dos de Mayo. Sala del Carmen N° 10.

Santiago Rivas de 16 años. Padece de osteomielitis del fémur izquierdo ha sido operado dos veces, y tratado con toda clase de vacunas microbianas; el tiempo de evolución es de 2 ½ años sin haber logrado aliviarse. Estado general relativamente bueno. Título de la antitóxina natural 2.3 unidades. Iniciamos el tratamiento el 2 de Diciembre del 38;

después de la segunda inyección se acentuó el exudado fluyendo con mas facilidad; se le han puesto cinco inyecciones que han sido perfectamente toleradas, su estado general se ha mejorado bastante, la secreción ha disminuido sin llegar a desaparecer por completo; el paciente solicita su alta. Su tasa de antitóxina después de la quinta inyección llegó a 125 unidades, como puede verse en el cuadro N° 9 (1).

INVESTIGACIONES SEROLOGICAS E INMUNOLOGICAS EN LOS SUJETOS TRATADOS CON LA ANATOXINA ESTAFILOCOCCICA

Hemos descrito ya en páginas anteriores, que la tóxina y su derivado formolado la anatóxina, posee la propiedad de engendrar una antitóxina en el suero de los sujetos vacunados, y que es fácilmente titulada. De los numerosos enfermos que han recibido el tratamiento anatóxico, hemos podido en muchos de ellos seguir el desarrollo de su inmunidad, titulando su suero paralelamente al tratamiento.

Métodos de dosaje de la antitóxina.—De los trabajos de G. RAMÓN, A. BOCAGE, RICHOU, & P. MERCIER (16) hemos podido tomar las técnicas de dosaje actualmente existentes y de bastante precisión.

1. Método hemolítico.
2. Método necrótico.
3. Método floculante.

Los dos primeros pueden ser empleados para cualquier suero, en cambio el método floculante solo puede ser aplicado para los sueros que tengan por lo menos cinco unidades.

INVESTIGACION DE LA ANTITOXINA NATURAL EN LOS SUEROS HUMANOS

(Sin infección estafilocócica actual)

En el mes de noviembre del año 38, en el Pabellón N° 5 del Hospital de Maternidad, tomamos 100 muestras de sangre, correspondientes a mujeres de puerperio normal, y a un grupo de alumnas del curso de Obstetricia que galantemente se prestaron a la investigación. Los resultados y porcentajes obtenidos están sintetizados en el cuadro N° 5.

De Enero a Febrero de 1939 hemos obtenido 107 muestras de sangre en el Hospital Militar de San Bartolomé, todas corresponden al contingente de conscriptos del presente año, la edad de los sujetos está comprendida entre 18 y 22 años, proceden de distintas provincias, los resultados obtenidos están representados en el cuadro N° 5.

CUADRO Nº 5

Tasa de antitoxina natural en el suero de 100 mujeres de diferentes edades; no padecen actualmente de estafilococias.

0.1-0.2	0.2-0.5	0.5-1	1 - 2	2 - 3	3 - 5	5 - 7	7 - 10
12 casos	24 casos	44 casos	16 casos	2 casos	2 casos	0 casos	0 casos
12%	68%		16%	4%		00%	

Antitoxina natural en el suero de 107 hombres sin afección estafilocócica actual

0.1-0.2	0.2-0.5	0.5-1	1 - 2	2 - 3	3 - 5	5 - 7	7 - 10
0 casos	27 casos	47 casos	27 casos	4 casos	2 casos	0 casos	0 casos
0%	69.2%		25.2%	5.5%		00%	

*INVESTIGACION DE LA TASA DE ANTITOXINA ESTAFILOCOCICA
NATURAL EN EL SUERO DE SUJETOS ENFERMOS ANTES
DEL TRATAMIENTO*

Hemos reunido en un cuadro, el título antitóxico del suero de 124 enfermos, antes de iniciarles el tratamiento con la anatóxina. Están comprendidos: las forunculosis, antrax, acné, acné pustuloso, sicosis, mastitis y osteomielitis de diferentes edades.

CUADRO Nº 6

Unidades de antitoxina natural en el suero de 124 enfermos antes del tratamiento anatóxico.

0.1-0.2	0.2-0.5	0.5-1	1 - 2	2 - 3	3 - 5	5 - 7	7 - 10
5 casos	31 casos	41 casos	22 casos	14 casos	5 casos	4 casos	2 casos
3.9 %	58%		17.7	11.2	8.7 %		

Hemos podido constatar que en un 8.7 % de los casos, la tasa de antitóxina es elevada, correspondiendo en su mayor parte a osteomielitis.

G. RAMÓN, R. RICHOU, CH. GERNEZ & PANNEQUIN (12) han investigado igualmente la antitóxina natural al comienzo de la inmunización en 115 individuos, copiamos en el cuadro N° 7, los valores encontrados por ellos y que pueden ser comparados con los nuestros.

CUADRO N° 7

0.1-0.2	0.2-0.5	0.5-1	1 - 2	2 - 3	3 - 5	5 - 7	7 - 10	10
5 casos	46 casos	28 casos	18 casos	12 casos	2 casos	2 casos	1 caso	1 caso
68.7%			15.6	10.4	5.2%			

Todos los autores están de acuerdo que la antitóxina de los sujetos que padecen de osteomielitis, está prácticamente elevada, los porcentajes en los sujetos normales son más o menos semejantes; concluyen en que, tanto en el hombre como en el animal, la infección estafilocócica oculta, engendra la aparición en el suero de una antitóxina específica.

INMUNIZACION POR LAS INYECCIONES DE ANATOXINA

Hemos practicado en muchos enfermos sometidos al tratamiento anatóxico, dosajes periódicos de sus sueros para estudiar la evolución cronológica de la antitóxina estafilocócica.

En casi todos los casos existe en la sangre antes del tratamiento, una tasa de antitóxina débil pero evidente: gracias a las inyecciones de anatóxina, la antitóxina específica se eleva rápidamente, después de cada una de las inyecciones este aumento se hace cada vez mayor, alcanzando al final del tratamiento cifras bastante considerables. Este aumento depende del número de inyecciones y de la frecuencia con que son colocadas G. RAMÓN (12) y colaboradores.

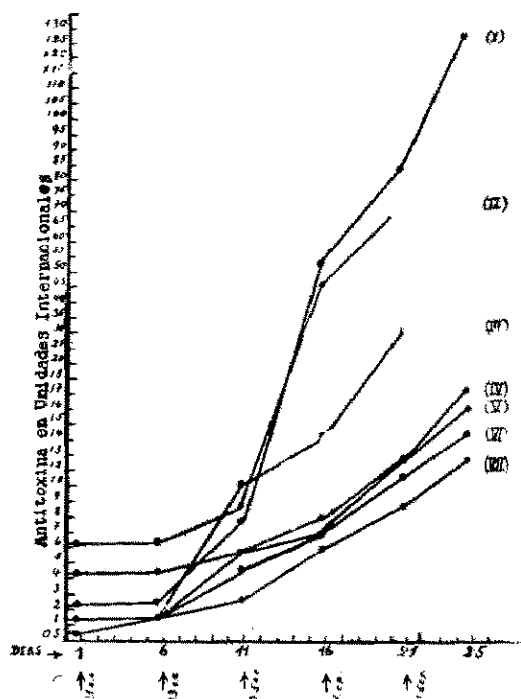
Nosotros hemos seguido el desarrollo de la inmunidad en más de 35 casos tratados a dosis progresivamente crecientes, colocadas con cinco días de intervalo; los dosajes de la antitóxina específica han sido hechos justamente antes de poner la inyección siguiente.

FORMACION Y DURACION DE LA INMUNIDAD ANTITOXICA

En numerosos enfermos sometidos al tratamiento hemos podido constatar como, la antitóxina estafilocócica después de cada inyección se presenta mas elevada, para alcanzar su máximo 3 ó 4 días después de la última inyección. Desde este momento tiende a decrecer para mantenerse

CUADRO N° 8

Evolución cronológica de la inmunidad antiestafilocócica en seis sujetos tratados con anatóxina titulada en 16 Unidades antigénicas.



algunas semanas, y muchas veces algunos meses; para luego descender y permanecer siempre por encima de la tasa inicial. Esquematizamos en la gráfica anterior la evolución cronológica de la inmunidad como lo describe últimamente P. SACHI & E. FIORI (17) 1938, en la cual se puede ver como la antitóxina se forma rápidamente bajo la influencia del tratamiento anatóxico. De los 36 sujetos a quienes hemos seguido en el desarrollo de su inmunidad, tomamos, solamente seis, los cuales representan los distintos tipos de respuestas obtenidas.

En un cuadro final resumimos el tratamiento de 36 pacientes, el número de inyecciones colocadas, la tasa de antitóxina antes del tratamiento y el dosaje final después de cuatro días de la última inyección, como se puede apreciar en muchos casos hemos alcanzado cifras elevadas.

CUADRO Nº 9

Tasa de antitóxina antes y después del tratamiento

Nº de orden	Nombre del enfermo	Edad en años	Naturaleza de la afección	Tasa Ini.	Tasa Fin.	Nº de inyecc.	Anat. c.c.	Resultados
1	T.M.	17	Acné y Forun.	0.1	16	5	3.5	C.
2	S.R.	16	Ostecmielitis	2.3	125	5	3.5	M.
3	A.L.	18	Ostecmielitis	5.5	6	5	3.5	M.
4	L.C.	12	Ostecmielitis	2.0	20	5	3.5	C.C.
5	M.T.	41	Ostecmielitis	1.0	20	5	3.5	F.N.
6	L.M.	22	Osteitis	0.3	6	5	3.5	M.
7	B.V.	28	Ostecmielitis	1.6	6	5	3.5	M.
8	A.G.	44	Ostecmielitis	1.0	6	5	3.5	M.
9	L.L.	27	Ostecmielitis	6.6	6	5	3.6	A.
10	A.G.	42	Ostecmielitis	6.0	20	5	3.5	A.
11	J.A.	22	Ostecmielitis	1.6	12	5	3.5	A.
12	F.Y.	20	Ostecmielitis	1.4	30	5	3.5	C.C.
13	G.F.	19	Ostecmielitis	5.0	70	5	3.5	C.C.
14	S.A.	14	Acné cara	0.6	4	7	7.5	M.
15	G.Z.	47	Forunculosis	0.4	8	5	3.5	C.
16	A.C.	20	Acné pustuloso	1.0	12	9	11.0	M.M.
17	P.R.	21	Rinofima	0.6	10	5	3.5	C.
18	V.L.	25	Anthrax	0.6	3	5	3.5	C.
19	E.R.	40	Forunculosis	0.6	10	5	3.5	C.
20	V.A.	16	Forunculosis	4.0	12	5	3.5	C.
21	M.G.	38	Hidrosad. y F.	1.6	6	4	2.0	C.
22	E.C.	27	Forunculosis	2.5	20	4	2.0	C.
23	G.C.	42	Anthrax	1.4	14	4	2.0	C.
24	E.C.	28	Anthrax	0.6	3	5	3.5	C.
25	E.P.	28	Forunculosis	1.6	7	5	3.0	C.
26	M.J.	32	Hidrosadenitis	0.6	8	4	2.0	C.
27	S.A.	21	Forunculosis	1.6	4	3	1.0	C.

28	A.L.	39	Antrax	0.6	10	4	2.0	C.
29	V.O.	30	Orzuelos	0.6	10	3	1.0	C.
30	C.M.	16	Forunculosis	1.6	8	5	3.5	C.
31	C.D.	15	Forunculosis	0.3	8	4	2.0	C.
32	A.M.	49	Forunculosis	0.6	3	4	2.0	C.
33	G.A.	19	Forunculosis	0.3	4	4	2.0	R.
34	J.C.	39	Forunculosis	1.6	6	5	5.5	C.
35	C.C.	19	Osteomielitis	2.5	18	6	5.5	M.
36	J.R.	20	Osteomielitis	0.3	20	5	3.5	C.C.

C. C., clínicamente curado; F. N., fracasó neoplasia;

M. M., muy mejorado.

El número de casos y los porcentajes de las respuestas antitóxicas en nuestro grupo de pacientes es el siguiente:

13	casos	han	subido	entre	3 - 6	unidades...	36.1 %
5	"	"	"	"	6 - 10	"	14.0 "
15	"	"	"	"	10 - 20	"	41.8 "
1	"	ha	"	a	30	"	2.7 "
1	"	"	"	"	70	"	2.7 "
1	"	"	"	"	125	"	2.7 "
36							100. %

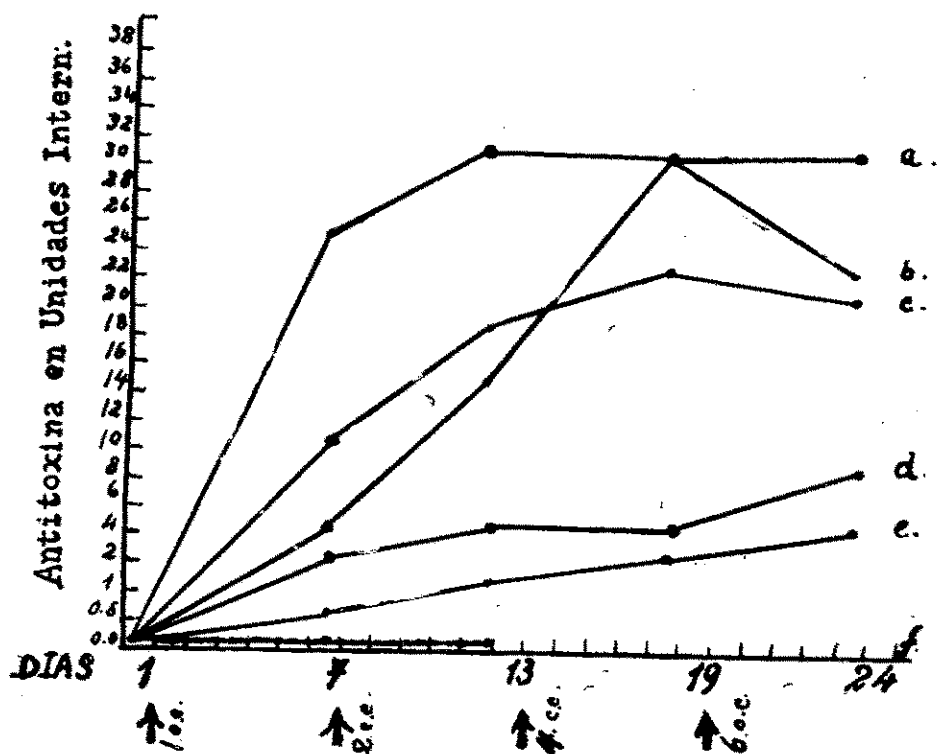
DESARROLLO DE LA INMUNIDAD EN LOS CONEJOS SOMETIDOS A LA VACUNACION CON LA ANATOXINA ESTAFILOCOCICA

Con el objeto de obtener antitoxina específica para nuestras experiencias, sometimos a la vacunación por la anatoxina un lote de 15 conejos. Todos han sido inyectados por vía subcutánea a la dosis de 1 c.c., 2, 4, y 6 c.c., con intervalos de seis días, la respuesta antitóxica ha sido variable, el desarrollo de la inmunidad lo hemos seguido por dosajes hechos en el suero antes de cada inyección, y cuatro días después de la última. Para estos dosajes hemos empleado el método hemolítico, comparativamente con el método floculante, el valor antitóxico del suero está expresado en Unidades internacionales.

Sintetizamos en el cuadro siguiente nuestras observaciones representando con seis curvas las diferentes respuestas que nos han dado los conejos vacunados con ligeras variantes; el peso de los animales emplea-

CUADRO Nº 10

Evolución cronológica de la inmunidad antiestafilocócica en conejos vacunados con anatóxina de 16 Unidades



dos está comprendido entre 1.500 y 2.500 grs. Como se puede apreciar no todos los animales responden igualmente a la vacunación, en muchos pese a las inyecciones repetidas, no se ha desarrollado la antitóxina específica en la sangre circulante; estos animales no productores de un suero antitóxico han sido desechados.

De 15 conejos vacunados nos han hecho las curvas como:

(a)	Solamente	1	conejo
(b)	„	1	„
(c)	„	2	conejos
(d)	„	2	„
(e)	„	5	„
(f)	„	4	„

CONCLUSIONES

1. De un buen número de cepas investigadas, dos han sido seleccionadas, como productoras de una verdadera exotoxina que hemolisa los glóbulos rojos, produce lesiones necróticas en la piel y mata sistemáticamente conejos a débiles dosis por inyección endovenosa.
2. Esta toxina transformada en derivado anatóxico es inofensiva para el hombre y los animales, posee propiedades antigénicas y es igualmente titulable.
3. La anatoxina en estas condiciones es llevada a la clínica y sorprende constatar que se destaca como un agente terapéutico de primer orden en las estafilococias cutáneas. Hemos visto varios casos de osteomielitis beneficiarse notablemente con el tratamiento anatóxico.
4. Las reacciones durante el tratamiento son poco importantes; accidentes no hemos tenido.
5. Las inyecciones de anatoxina, tanto en el hombre como en el animal, provocan la aparición de la antitoxina específica en la sangre circulante, donde es fácilmente dosificable.
6. La antitoxina constituye el papel primordial de la inmunidad antiestafilocócica, y rige de una manera bastante fiel el estado clínico del sujeto.
7. La inmunidad antitóxica aparece rápidamente desde el segundo día para alcanzar su máximo tres o cuatro días después del tratamiento.
8. La acción de la antitoxina puede ser explicada por la neutralización en el organismo del veneno elaborado por el estafilococo, permitiendo de esta manera que las defensas celulares actúen sin inconvenientes.

9. En un porcentaje de casos, a la verdad muy restringido, la inmunización antitóxica es dificultada por ciertos estados patológicos como: la diabetes, uremia, trastornos endócrinos especialmente. Pero la gran mayoría rápidamente establecen su inmunidad antitóxica trayendo como consecuencia la pronta curación de las estafilococias.

BIBLIOGRAFIA

1. P. MERCIER : *L'anatoxine staphylococcique et le traitement des affections a staphylocoques - These pour le doctorat en medicine* — Paris.
2. J. DUMAS : *Annales Institut Pasteur*, v. 28, p. 213, 1914.
3. M. NICOLLE ET E. CESARI : *Annales Institut Pasteur*, v. 28, p. 213, 1914.
4. J. PARKER : *Journal Experimental Medicine*, v. 40, p. 761, 1924.
5. F. M. BURNET : *Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 33, p. 1, 1930.
6. F. M. BURNET : *Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 32, p. 717, 1929.
7. E. L. BURKY : *Journal Immunology*, v. 24, p. 93, 1933.
8. F. M. BURNET : *Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 34, p. 759, 1931.
9. H. J. PARISH, WINIFRED H. CLARK : *Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 34, p. 593, 1931, v. 35, p. 251, 1932.
10. G. RAMÓN : *Compt. Rend. Soc. Biol.*, v. 121, p. 375, 1936.
11. G. RAMÓN, A. BERTHELOT, Mlle. G. AMOUREUX : *Compt. Rend. Soc. Biol.*, v. 102, p. 515, 1936.
12. G. RAMÓN, CH. GERNEZ, R. RICHOU, CHR. PANNEQUIN : *Revue d'Immunologie*, v. 2, p. 556, 1936.
13. P. NELIS : *Compt. Rend. Soc. Biol.*, v. 125 B, p. 128, 1937.
14. H. J. PARISH, O. MEARA & CLARK : *The Lancet*, v. 226, p. Lo 54, 1934.
15. P. NELIS : *Revue d'Immunologie*, v. 1, p. 152, 1935.
16. G. RAMÓN, A. BOCAGE, A. BOIVIN, P. MERCIER, R. RICHOU & M. DEFRAANCE : *Presse Medicale* N° 48, junio 1937.
17. P. SACCHI & E. FIORI : *Giornale di Batteriol. e Immu.*, p. 574, 1938.
18. P. RICHOU & P. MERCIER : *Compt. Rend. Soc. Biol.*, v. 124, p. 808, 1937.
19. P. RICHOU & P. MERCIER : *Compt. Rend. Soc. Biol.*, v. 124, p. 202, 1937.