

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica  
Sección de Bioquímica. — Madrid

## **Producción experimental de proteidasas específicas**

### **1.— Experiencias con "Corynebacterium diphtheriæ" muerto**

por A. SANTOS RUIZ, J. LUCAS GALLEGO y M. J. ESCRIBANO ARNAL

(Recibido para publicar el día 10 de Mayo de 1947)

#### **INTRODUCCION**

Creemos innecesario destacar la importancia extraordinaria que para el diagnóstico de los procesos patológicos presenta la reacción de ABDERHALDEN, denominada de las proteidasas defensivas (1).

Los fermentos de defensa, surgen en el organismo en el momento y lugar precisos, para defenderse de los proteídos extraños al mismo. Así, durante el embarazo, aparecen en la sangre enzimas proteolíticas dirigidas contra las albúminas placentarias, y en el cáncer, fermentos específicos de las proteínas propias del tumor de que se trata y del mismo modo en otras enfermedades, como las infecciosas, etc.

La técnica de la caracterización de estas proteínas defensivas se ha simplificado mucho con la utilización de la orina, líquido biológico por donde se excretan estos fermentos. En la Sección de Química Biológica del Instituto Ramón y Cajal, se han realizado diferentes trabajos conducentes a obtener substratos específicos de tejidos tumorales y destinados a comprobar en los enfermos cancerosos, la eliminación urinaria de dichos enzimas (2, 3, 4 y 5).

Los resultados han sido francamente halagüeños, lo que ha dado lugar al planteamiento de nuevas experiencias destinadas a probar la eficacia de la reacción de ABDERHALDEN en el diag-

nóstico de otras enfermedades y entre ellas, a las de tipo infeccioso, y asimismo estudiar las relaciones de las proteidasas defensivas con las hormonas.

En esta primera comunicación, indicamos nuestras investigaciones referentes al diagnóstico de la difteria, por medio de los fermentos de defensa. Las conclusiones de este respecto son claramente positivas. Hemos intentado, por tanto, contribuir al esclarecimiento de las proteidasas específicas e incluimos con estas investigaciones un aporte, posiblemente interesante, para el esclarecimiento de la producción de dichos elementos de defensa en los procesos diftéricos, y en las alteraciones de glándulas endocrinas.

En esta primera comunicación damos cuenta de los resultados experimentales conseguidos con substrato de bacilo diftérico muerto.

El germen objeto de nuestras experiencias es el «*Corynebacterium diphtheriae*». Respecto a sus propiedades morfológicas, cultivos, tinción, bioquímicas, biológicas, etc., omitimos detalles por encontrarse suficiente y claramente expuestos en nuestros trabajos en castellano, originales de autores españoles (6, 7, 8, 9, 10 y 11), o traducciones de extranjeros (12, 13, 14 y 15) y cuya descripción desplazaría de nuestro estudio, y sólo haremos referencia a aquellas que dé forma más o menos directa tengan relación con nuestro tema, como difteria experimental, toxina diftérica, etc.

## PARTE EXPERIMENTAL

**OBTENCIÓN DE LOS SUBSTRATOS.** — Debido a la gran importancia que tienen los substratos en la reacción de ABDERHALDEN, éstos deben ser obtenidos con el máximo de garantías, para lo cual han de seleccionarse las piezas con todo cuidado, desechando las que no reúnan condiciones.

Los órganos o tejidos que se utilizan, proceden unas veces de individuos muertos y otras de intervenciones quirúrgicas recientes. Tanto en uno como en otro caso, se comprobará si presentan signos de descomposición y serán rechazados a la más pequeña sospecha de ella.

Los substratos que hemos tenido que preparar para nuestras experiencias son los de placenta, empleados como control,

y los de toxina diftérica y cuerpos bacilares diftéricos, cuyas técnicas de obtención pasamos a describir :

a) *Substrato de placenta.* — Observada con detenimiento la placenta y comprobado que está completamente fresca y en condiciones de operar, se verifican las manipulaciones que siguen :

Utilizando el cordón umbilical, se hace pasar una corriente de agua a través de ella por espacio de una noche, con lo cual se consigue eliminar la casi totalidad de la sangre contenida en el órgano. A la mañana siguiente y por el mismo procedimiento, se lava con agua destilada, hasta que el líquido salga completamente limpio y la placenta quede casi blanca.

Se procede a la separación del tejido conjuntivo, vasos, grasa, en una palabra, de toda aquella función que no sea albuminoidea. Esto se consigue cortándole en pequeños trozos con tijeras y bisturí y rascando con una espátula o borde no cortante del bisturí, cada uno de los trozos, con lo que se obtiene una papilla.

Se monta un trípode con un colador de tela y se coloca en él la papilla. A continuación se lava en una corriente de agua y se agita continuamente para que sean arrastradas las últimas porciones de sangre y linfa. Después se lava de nuevo con agua destilada. Los tiempos dos y tres, se deben hacer con la mayor rapidez posible, para evitar la lisis de los tejidos.

Se procede al examen de la papilla y se eliminan de ella las partes gruesas y tejidos extraños que contenga.

En este tiempo se desnaturalizan las proteínas, para lo cual se coloca la papilla en un Erlenmeyer al que se añade agua destilada en la proporción de 10 : 1 con relación al substrato y unas gotas de ácido acético al uno por veinte mil y se procede a la cocción durante un tiempo que oscile de diez a quince minutos.

Se decanta el líquido de la primera cocción y se procede a otra nueva con agua destilada, como en el caso anterior, menos el ácido acético, durante diez minutos. Los hervidos se continúan en estas condiciones por ocho veces consecutivas. Si han de interrumpirse estas cocciones, decantando el líquido de la última ebullición hecha, se añade solución fisiológica, unas gotas de toluol y otras de cloroformo y se coloca en la nevera para evitar la autólisis. Al continuar las cocciones, lo primero se decanta el líquido, se sustituye con agua destilada y se continúa

como queda descrito, por lo menos dos veces más. La ebullición se regula con unas gotas de alcohol octílico que evita la formación de espuma y una varilla de vidrio para evitar los saltos bruscos.

Se verifica una prueba para ver si han sido eliminados ya los aminoácidos libres del substrato. Para ello se toma en un tubo de ensayo corriente un centímetro cúbico de la solución de ninhidrina al 1 por 100 y se añade con una pipeta, cinco centímetros cúbicos del líquido de cocción, se calienta hasta la ebullición y se mantiene ésta durante un minuto. Hay que tener la precaución de tomar el tubo con unas pinzas metálicas o con papel, pues tanto la mano como la madera dan la reacción de la ninhidrina.

Si la prueba anterior da reacción positiva se repiten de nuevo las cocciones hasta obtener un resultado negativo. Aconseja ARDERHALDEN que en caso positivo, se debe tener el substrato en suero fisiológico a 37° durante veinticuatro horas y hacer una nueva prueba con la ninhidrina, previa cocción con agua destilada y en caso de positividad, seguir los hervidos. La prueba de la ninhidrina se puede hacer en un portaobjetos excavado, en cuya excavación se colocan dos gotas del líquido y otras dos de la solución de ninhidrina; se llevan a la estufa de 100° y dará la reacción.

Conseguida la negatividad del substrato se filtra por papel. Se saca el filtro del embudo con el substrato y se extiende; se coloca sobre él otro filtro seco y por presión se extrae toda la cantidad posible de agua adherida al substrato.

Se procede al desengrasado, para lo cual se coloca el substrato en un Erlenmeyer con acetona en la proporción de 10 : 1, durante 24 horas, al cabo de las cuales se substituye la acetona por una mezcla de acetona y éter a partes iguales y en una cantidad en relación con el substrato de 10 : 1 y se tiene el mismo tiempo; transcurrido éste, se cambia la mezcla acetona-éter por éter y también se mantiene por espacio de un día. El éter se renovará varias veces y el tiempo se puede alargar o acortar, según la calidad del substrato.

Se filtra y el filtro con el substrato se extiende y deja a la temperatura de 37°, para que se seque, durante 24 horas. Si existen trozos de tejido conjuntivo, vasos, etc., se quitan y a continuación se tamiza por un cedazo, previa pulverización en

un mortero y se obtiene de esta forma un polvo finísimo que se guardará en un frasco cerrado de cristal.

Se valora el substrato por el método de KJELDAHL, para determinar la cantidad de materia nitrogenada y se anota el resultado en la etiqueta del frasco, que permite determinar la cantidad del substrato que se ha de emplear en cada prueba.

Las condiciones que debe reunir el substrato para poder ser utilizado son :

a) Que el sedimento acetónico urinario de personas normales, dé resultado ligeramente coloreado.

b) Que disuelto y hervido en agua, el líquido de cocción dé resultado negativo. Esta comprobación debe hacerse siempre antes de utilizarlo.

b) *Substrato de bacilo diftérico.* — Del medio de cultivo donde se tienen los bacilos, se recogen éstos en suero fisiológico.

Esta suspensión bacilar se hierve en un Erlenmeyer por espacio de un cuarto de hora, previa adición de unas gotas de ácido acético al uno por veinte mil, unas gotas de alcohol octílico para regular la ebullición y una varilla de vidrio o unas perlas, para evitar los saltos bruscos.

Se suspende la cocción y se deja sedimentar, separando el líquido que sobrenada por decantación. Si la sedimentación no se logra bien, se centrifuga y se obtiene de esta forma la separación del líquido.

Se coloca el sedimento en un Erlenmeyer y se añade suero fisiológico en la relación de 10:1 y se procede a la segunda cocción por espacio de diez minutos, con alcohol octílico y unas perlas de vidrio.

Después de decantar o centrifugar, se procede a nuevas cocciones con agua destilada, alcohol octílico y perlas de vidrio, durante diez veces consecutivas. Se hace una prueba con el líquido de cocción y ninhidrina para ver si la eliminación de los monopéptidos es completa. Si resulta positiva, se vuelven a realizar nuevas cocciones con agua destilada, hasta que dé reacción negativa. Si han de suspenderse los hervidos después del centrifugado o decantado, se añade suero fisiológico con unas gotas de toluol y cloroformo y se lleva a la nevera. Para proseguir las cocciones se quita el suero y se substituye con agua destilada para proceder a hervirlo de nuevo, dos veces más como mínimo.

A partir de este tiempo, se sigue igual que en el caso de la placenta expuesto anteriormente, con la única variación de centrifugar en lugar de sedimentar, si esto no es suficiente.

Los bacilos diftéricos para la preparación de este sustrato, fueron de la raza Park-Williams núm. 8 cepa Valls, cultivados en el medio de Loiseau y Philippe, facilitados por el Instituto «Ibys».

*c) Preparación del sustrato de toxina.* — La toxina empleada para la preparación de este sustrato procede de bacilos de la raza Park-Williams núm. 8 y cepa Valls, cultivados en medio Loiseau y Phillippe y para la obtención de él se procede de la siguiente manera :

Se toma la toxina en un matraz de Erlenmeyer y se efectúa una destilación parcial al vacío, durante veinte minutos, y se deja enfriar el líquido.

Una vez enfriado se añade una mezcla de alcohol-acetona a partes iguales y en la proporción de 1 : 1 con la cantidad del líquido que contiene la toxina, con lo que logramos la precipitación de ésta y se procede a su centrifugación, para separar el sedimento.

El sedimento obtenido se disuelve en suero fisiológico en la proporción de 10 : 1 y seguidamente se efectúa una segunda destilación parcial al vacío.

Se deja enfriar el líquido y se añade una mezcla de alcohol-acetona en la misma proporción que antes, y a continuación se centrifuga para separar la toxina precipitada del líquido.

Se disuelve el sedimento en agua destilada en la proporción de 10 : 1 y se verifica su destilación parcial al vacío.

Se procede de la misma manera que en el punto anterior por diez veces consecutivas y si hay que suspender las destilaciones se añade suero fisiológico, unas gotas de toluol, cloroformo y se lleva a la nevera. Para efectuar nuevas destilaciones, se separa la toxina por la mezcla alcohol-acetona y se destila dos veces más.

Se hace una reacción de la ninhidrina con uno de los líquidos de separación para comprobar la negatividad o positividad, hasta que el resultado sea negativo.

A partir de este tiempo se continúa como en los casos anteriores y se emplea para separar la toxina del líquido, la mezcla alcohol-acetona. La toxina, debido a su gran solubilidad, se la

conserva en una disolución en agua destilada. Para su empleo se hacen una serie de diluciones que puestas dos gotas de ella en contacto con una gota de la solución de ninhidrina, da una reacción ligeramente coloreada.

PREPARACIÓN DE LA ORINA. — Para que los fermentos defensivos se encuentren en la orina en cantidad suficiente, ésta ha de tener una cierta concentración que se comprueba si se coloca en un tubo de ensayo cinco centímetros cúbicos de ella con igual cantidad de acetona o una mezcla de alcohol acetona. Si la concentración es suficiente, se producirá un enturbiamiento que condensa y sedimenta a la media hora. En caso contrario se ponen dobles cantidades de orina. De aquí la conveniencia de utilizar la orina emitida durante la noche, por ser la más concentrada.

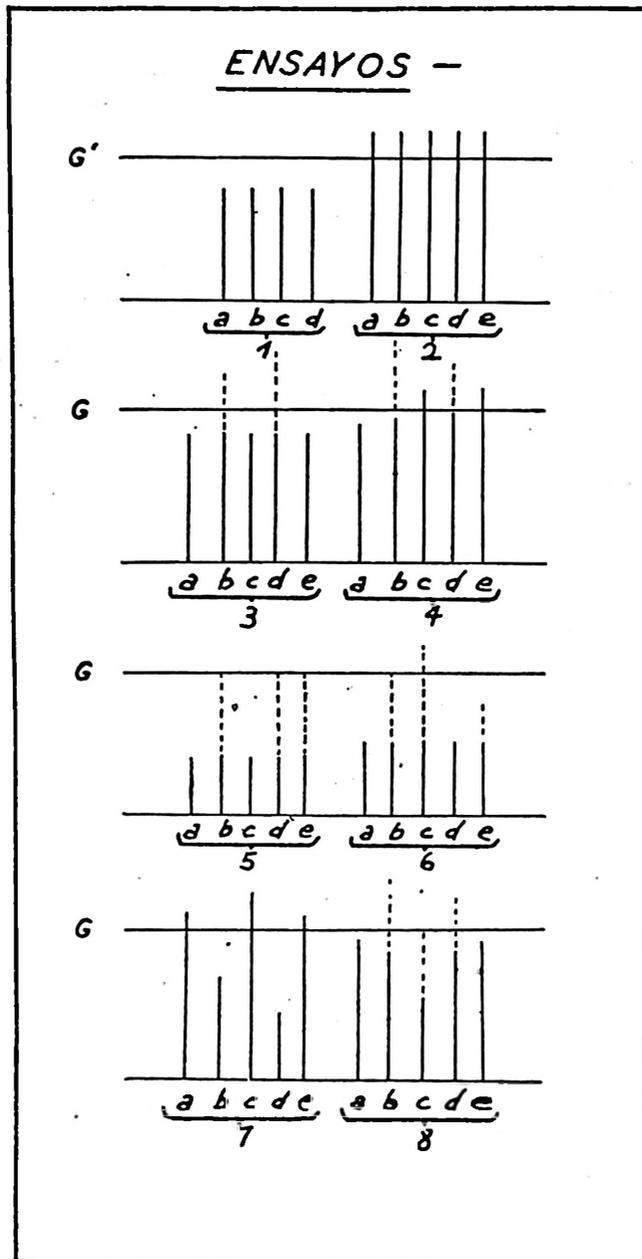
Otra condición es la de ser fresca. Si se conserva la orina en la nevera a cuatro grados de 24 a 48 horas, no se produce alteración, pues las proteínas que contiene no se descomponen. Temperaturas más bajas no son convenientes, por perder su actividad las proteidasas defensivas a  $-10^{\circ}$  y lo mismo les ocurre a temperaturas más elevadas cuando se las mantiene en ellas largo tiempo y cambia la reacción de la orina.

No deben contener albúminas en cantidad y tampoco sustancias medicamentosas que se eliminen por la orina, lo que a veces se reconoce por su color u olor. En caso de necesidad de emplearlas, se repite varias veces la reacción. El pH que ha de tener la orina es 7 y por lo tanto hay que determinar su reacción y neutralizar con ácido clorhídrico o sosa. La comprobación se hace con papel de tornasol, o mejor, con papel indicador universal Merk.

Hay que determinar la cantidad de orina necesaria para cada prueba con la ninhidrina, que demuestra la desintegración albuminoidea del substrato. Como la ninhidrina da en algunas ocasiones resultados positivos con la orina (cuando ésta tiene aminoácidos libres, glicocola, histidina, cisteína y algunas sales amoniacaes, fosfato amónico magnésico), se empleará un tubo control sin la adición de substrato.

La reacción depende del contenido de fermentos defensivos y la intensidad de su actividad.

La actividad de las proteidasas defensivas es a veces tan escasa que la reacción resulta negativa. ABDERHALDEN realiza los



siguientes estudios al objeto de determinar las cantidades de orina a emplear en cada determinación y los resultados se presentan en la gráfica que se incluye.

1. — La concentración no ha alcanzado el límite necesario.
2. — Se presenta positiva en todas, lo cual carece de valor.
3. — *b*, *d* y *e* dan resultado positivo, *c*, no aparece con coloración, siendo por tanto negativo.
4. — *b* y *d*, aparecen con una coloración más intensa que *a*, *c* y *e*, lo que carece de valor por encontrarse éstas por encima de la línea G.
5. — *b*, *d* y *e*, representan una concentración suficiente que no alcanza el límite de la reacción de la ninhidrina, pero que se puede demostrar por la presencia del nitrógeno libre. Los diagnósticos son falsos.
6. — Juntamente al diagnóstico positivo real *c*, se tienen los *b* y *e* falsos, a pesar de haber desintegración, que es insuficiente.
7. — Por presentar coloración *a* y *c*, el *c* carece de valor.
8. — Los tubos *b* y *d*, son positivos y los *c* y *e*, negativos, a pesar de que en el *c*, hay una pequeña desintegración que, al no alcanzar el grado de coloración, es falso.

También puede suceder que la cantidad de substratos sea insuficiente y entonces a pesar de existir desintegración, ésta no es suficiente para dar la reacción positiva. En estos casos de no dar la reacción de la ninhidrina, se puede confirmar si en realidad no se ha producido la reacción o si ésta ha sido insuficiente por los métodos de VAN SLYKE, MICRO-KJELDAHL, y ABDERHALDEN-FODOR.

El procedimiento para fijar la cantidad de orina necesaria para cada prueba es el siguiente:

Se coloca en los microtubos 0,1 c. c. de la solución de ninhidrina al 1 % con 0,5 c. c. de orina filtrada y se calienta en la estufa a 100°, o en el baño maría a 76°. Se observa con un reloj el tiempo que tarda en aparecer una coloración ligera y por el tiempo que tarda en aparecer, se clasifican las orinas en los grupos siguientes:

La primera columna representa los grupos; la segunda el tiempo en minutos que ha de estar a la estufa a 100°; la tercera el tiempo en minutos, si se hace la prueba en baño maría y

finalmente la cuarta el número de centímetros cúbicos de orina a emplear.

Para obtener los fermentos se mezclan las cantidades de orina con cantidades iguales de acetona o una mezcla de alcohol acetona.

**TÉCNICA DE LA REACCIÓN DE ABDERHALDEN.** — Para efectuar la reacción de ABDERHALDEN, hay dos métodos, el directo o micrométodo. Se describe el micrométodo por ser la técnica empleada en la parte experimental y que consta de las partes siguientes :

Se determina la cantidad de orina necesaria para realizar la experiencia, por la técnica ya expuesta con anterioridad.

Se neutraliza con ácido clorhídrico o sosa cáustica a  $\text{pH} = 7$ , con el papel indicador universal Merck y se filtra. Puede emplearse cualquiera de los papeles reactivos que indiquen esta concentración de hidrogeniones.

Se toma tantas veces la cantidad de orina necesaria para la prueba, como número de éstas se han de realizar y se añade una cantidad igual de acetona o mezcla de alcohol-acetona. Se deja reposar durante media hora, con lo que el precipitado va al fondo. Se decanta la mayor parte del líquido que sobrenada (mejor extraerlo por aspiración con la trompa de agua) y la porción de él que resta, se coloca en tubos de centrifugadora con el sedimento formado.

Se procede a la centrifugación durante diez minutos a tres mil revoluciones.

Una vez formado el sedimento, el cual queda adherido al fondo del tubo, se tira el líquido y el tubo se coloca invertido sobre un papel de filtro y se deja unos quince minutos.

Se toma el tubo y se seca bien con papel de filtro o un paño, con objeto de quitar los restos de acetona.

En el tubo que contiene el sedimento se agregan 3 c. c. de suero fisiológico por cada tubo y se disuelve el sedimento. Si se emplea más de un tubo, se hace en los otros la misma operación. Se reúnen los contenidos de los tubos en uno y se añade una solución fisiológica hasta completar la cantidad que resulta de multiplicar el número de pruebas por tres, que es el número de centímetros cúbicos que se ha de utilizar por cada una. Conviene añadir de 1 a 2 c. c. más de suero, para compensar las

pérdidas del pipeteo. Se agita suavemente, haciéndole girar entre las manos, hasta que se forma una mezcla homogénea.

En los tubos de ensayo de 10 cm. de largo por 1,5 cm. de ancho, se colocan los substratos a estudiar, después de comprobar que están en condiciones de ser empleados. Esta comprobación se verifica hirviendo el substrato con agua destilada durante dos minutos. Se toman 5 c. c. del líquido de cocción con 1 c. c. de la solución de ninhidrina y se hierve durante un minuto. Si la reacción es positiva, se siguen las cocciones en agua para eliminar los monopéptidos, hasta que la reacción resulte negativa y entonces se pueden utilizar los substratos.

En los tubos con los substratos, colocamos 3 c. c. del líquido problema preparado en el tiempo 7 y a una gota de alcohol octílico. Además de los tubos con los substratos, se coloca otro con 3 c. c. del líquido problema sin substrato, que sirve de control. Se pueden utilizar como controles tubos con substratos diferentes, tantos como se estime necesario. Se cierran todos los tubos con tapones de corcho o goma y se llevan a la estufa a la temperatura de 37° durante dieciséis horas (nunca menos de doce, ni más de veinticuatro), para que se verifique la digestión de los substratos por los fermentos defensivos, si existen en estado de actividad.

Transcurrido este período de tiempo, se centrifugan a 3.000 revoluciones durante diez minutos y se filtra el líquido. Los tubos que recojan los filtrados correspondientes han de estar limpios y esterilizados.

De cada tubo que contiene el líquido filtrado, se toman 0,5 centímetros cúbicos de éste y se colocan en los microtubos correspondientes; se añaden 0,1 c. c. de la solución de ninhidrina y se cierran con su correspondiente tapón esmerilado, colocándolos en una gradilla metálica.

Esta gradilla así preparada, se lleva a la estufa a 100°, o al baño maría a 76°, hasta que se produce una coloración azul-violeta en cualquiera de los tubos y en este momento se saca la gradilla. La coloración debe aumentar al enfriarse. En el caso que no se produzca coloración a los 15 minutos, se deja media hora y si tampoco se produce, se repite la prueba, por si la concentración de la orina en fermentos defensivos no fuese suficiente y en este caso se utiliza doble cantidad de orina. Si en esta segunda prueba se produce coloración el resultado es positivo y caso de no haberla, se puede dar por negativa.

La representación de estos resultados se hace de la siguiente forma :

a) Si no existe diferencia de coloración en los microtubos de cada determinación, la reacción es negativa y se presenta por (—).

b) Si existe diferencia, pero ésta es muy pequeña, ABDERHALDEN la representa por ((+)).

c) Si es perfectamente apreciable, con la nomenclatura de este autor se representa por (+).

d) Por + cuando es bastante intenso y finalmente

e) Por ++, cuando la diferencia es extraordinaria.

En nuestras determinaciones se han empleado los siguientes signos y cuya correspondencia con los de ABDERHALDEN es :  
 (—) = — ; ((+)) = + = (+) = ++ ; + = +++ ;  
 ++ = ++++.

Cuando exista duda en la lectura se puede facilitar haciendo más intensa la reacción por una mezcla formada por ácido tartárico, sublimado y cloruro sódico en agua, al que se agregan en el momento de su utilización unas gotas de formaldehído.

Realizada la técnica con toda escrupulosidad, se pueden dar los siguientes casos :

Que no aparezca coloración azul-violeta en ninguno de los tubos. La causa reside en que sea escasa la cantidad de ésta. Que el control y las pruebas de cada determinación tengan la misma coloración, en cuyo caso el resultado es negativo. Puede suceder que la coloración sea muy intensa y no permita diferenciaciones. En este caso se diluye en agua destilada, el doble, por ejemplo, y si el resultado sigue igual le daremos negativo.

Que las pruebas de la determinación o algunas de ellas tengan coloración más intensa que el control, en cuyo caso el resultado es positivo.

Que las pruebas de la determinación o algunas de ellas tengan coloración menos intensa que el control o negativa. En este caso el substrato no ha sufrido desintegración y puede ser debido a que esté alterado, tenga poco nitrógeno, o haya inhibido la reacción de coloración.

En los resultados negativos hay que tener en cuenta que en determinadas circunstancias el organismo produce muy pocas o ninguna proteidasas defensivas (estados caquéticos), o que el

riñón no permita su paso. Para dar el resultado negativo, se debe antes añadir unas gotas de ácido ascórbico que exalta la actividad de los fermentos defensivos y ver si da positividad alguna prueba. En caso contrario se debe repetir la determinación y comprobar la función eliminadora del riñón.

En los resultados positivos se ha de tener en cuenta la posibilidad de que la orina elimine enzimas defensivas anespecíficas, como sucede a veces con individuos radiados y en afecciones de hígado y páncreas.

La eliminación de monopéptidos por la orina, da lugar a coloraciones muy intensas, en cuyo caso se debe disminuir la cantidad de orina empleada en cada prueba.

Cuando se emplea el ácido ascórbico, se pondrá la solución al uno por mil, con una solución de ninhidrina a doble concentración y de esta mezcla se coloca 0,1 c. c. en cada microtubo.

EXPERIENCIAS REALIZADAS. — Antes de comenzar a describir las diferentes experiencias realizadas, hemos de hacer una reseña de los métodos empleados para la valoración de los substratos y para la determinación de las dosis de germen utilizado en la reacción.

Es indispensable hacer la valoración de los substratos de placenta, que empleamos como control en todas y cada una de las pruebas de la reacción, de germen, y determinar las dosis a inyectar de suspensiones de substrato de bacilo, bacterias muertas, porque sólo así es posible precisar los resultados.

a) *Valoración del substrato de placenta.* — Consiste esta valoración en determinar la cantidad mínima de substrato que se ha de utilizar en cada prueba, para lo cual hacemos una reacción con orina de embarazada en cuarto mes y empleamos 20 mgrs. de substrato de placenta. Como la reacción es positiva, cuadro 1 A, se verifica una segunda reacción de la misma orina con cinco pruebas, o sea, cinco sedimentos acetónicos de orina que ponemos a actuar en la estufa frente a cantidades distintas de substratos de placenta, en 5 tubos de ataque y colocamos en el primer tubo 5 mgrs. de substrato de placenta, 10 miligramos en el segundo, 15 mgrs. en el tercero, 20 mgrs. en el cuarto y 25 mgrs. en el quinto. Para mayor seguridad en la reacción, con la misma orina de embarazada, empleamos controles con substratos de cáncer de estómago (CE), cáncer de recto (CR), bacilo tífico (BT), bacilo diftérico (BD) y un tubo

control sin sustrato (K). Del cuadro 1 B, se deduce que la cantidad mínima de sustrato de placenta que se debe emplear como control en las reacciones con bacilo diftérico, es de 10 miligramos.

b) *Determinación de dosis mínima y valoración del sustrato de bacilo diftérico.* — En un principio se comprueba que la orina eliminada por los conejos no contiene proteidasas defensivas que desintegren al sustrato de bacilo diftérico, para lo cual hacemos la reacción en un lote de siete conejos y empleamos como sustrato el procedente de bacilo diftérico, en la cantidad arbitraria de 20 mgrs., lo que nos permite determinar, según los resultados del cuadro 2, que los conejos no eliminan proteidasas defensivas específicas, para el sustrato empleado. También en los resultados de este cuadro se aprecia que la reacción es negativa en el tubo control y en el tubo con sustrato de placenta, por espacio de dos días consecutivos.

Una vez comprobada la negatividad de la reacción, se procede a determinar la dosis mínima de sustrato de bacilo diftérico, que inyectado subcutáneamente al conejo, da lugar a la eliminación de fermentos defensivos, para lo cual se parte de una suspensión de sustrato en suero fisiológico estéril (1 gr. en 10 c. c.) y se inyecta al primer conejo con 0,05 c.c., al segundo con 0,075 c. c. y así sucesivamente con 0,2 c. c. En el cuadro 3, observamos la negatividad de la reacción en el conejo 1, inyectado con 0,05 c. c., que además tiene una eliminación normal de orina. A partir del conejo 2, aparece oliguria, por lo cual no se puede practicar la reacción en las 48 primeras horas. En el tercer día, la eliminación de orina aumenta en todos los conejos del lote y es negativa la reacción en los conejos 1 y 2, y positiva en los 3, 4, 5 y 6, y negativa también en el 7. En el cuarto día, persiste la negatividad en los dos primeros y ya es positiva en los cinco restantes, de donde resulta que la dosis mínima a inyectar de sustrato de bacilo diftérico, necesaria para producir la reacción de ABDERHALDEN, es de 0,1 c. c.

A continuación se procede a practicar la reacción en un lote de 3 conejos inyectados con 0,1 c. c. de suspensión de sustrato bacilar y se emplean arbitrariamente 20 mgrs. de sustrato de bacilo para la determinación. En el cuadro 4 A, se comprueba el resultado positivo de la reacción en el tubo con el subs-

trato de bacilo, en tanto que la prueba es negativa en el tubo control y en el que contiene el substrato de placenta.

Para valorar la cantidad mínima de substrato de bacilo que se necesita utilizar en cada reacción, se procede en igual forma que para el substrato de placenta, o sea, empleando cantidades crecientes progresivas de substrato de bacilo a partir de los 5 miligramos, hasta los 25 mgrs. en tubos de ataque diferentes. Del cuadro 4 B, deducimos que la cantidad mínima de substrato que da reacción positiva en un lote de tres conejos es de 10 mgrs. y que es negativa la reacción en los tubos con 5 mgrs. de substrato de bacilo, en el que contiene el substrato de placenta y en el control.

De estas primeras valoraciones se deduce que la dosis mínima de substrato de bacilo diftérico que es preciso inyectar en las experiencias es de 0,1 c. c. y que las cantidades mínimas de substrato de bacilo que se han de emplear en cada reacción es de 10 mgrs.

c) *Determinación de la dosis mínima de bacilo muerto.* — Después de comprobar en un lote de siete conejos la negatividad de la reacción con los substratos de placenta, bacilo, toxina y controles de substrato de toxina y sedimento acetónico, durante dos días consecutivos, inyectamos una suspensión de bacilos muertos por el calor de la forma siguiente:

Se centrifuga una suspensión de dichos bacilos y el sedimento de cuerpos bacilares, se trata con suero fisiológico isotónico estéril y se agita hasta obtener una suspensión que se vuelve a centrifugar y tratar en la forma anterior por diez veces consecutivas, con lo que prácticamente eliminamos las proteínas extrañas que acompañan a los cuerpos bacilares. Se prepara una suspensión de dichos bacilos, en la proporción de 1 gr. en 10 c. c. de suero fisiológico isotónico estéril. La inyección subcutánea se realiza en este lote de conejos en cantidades crecientes en progresión aritmética desde 0,5 c. c. hasta 0,2 centímetros cúbicos, o sea, que aumenta en 0,025 c. c. La dosis de bacilo muerto que debe emplearse es de 0,15 c. c., que es la dosis mínima que empleamos en las experiencias con bacilo muerto.

d) *Valoración del substrato de toxina.* — En igual forma que para la valoración del substrato de bacilo, procedemos a ve-

rificar la reacción de ABDERHALDEN en un lote de siete conejos con diferentes substratos, entre ellos el substrato de toxina, en una cantidad de tres gotas, y observamos que la reacción es negativa en todos ellos en dos determinaciones consecutivas, cuadro 5. Es de notar que en estas determinaciones empleamos un tubo control de toxina sin sedimento acetónico porque en la elaboración del substrato de toxina, no se ha hecho posible la eliminación de una pequeña reacción coloreada. El substrato de toxina lo empleamos en disolución y para preparar ésta, disolvemos un gramo de substrato desecado en un centímetro cúbico de agua destilada y para su uso utilizamos siempre la misma pipeta.

Para valorar la cantidad mínima de substrato que debe emplearse en la reacción, en un lote de tres conejos inyectados con 0,15 c. c. de la disolución de toxina, hacemos la reacción, empleando como substrato de toxina la cantidad arbitraria de tres gotas, que da resultado positivo y es negativo, con los substratos de placenta, bacilo y controles (Cuadro 6 A). A continuación, en el mismo lote de tres conejos, practicamos la reacción empleando cinco tubos con substrato de toxina, en los que se colocan sucesivamente 1, 2, 4, 4 y 5 gotas de la disolución del substrato de toxina, y se comprueba que la reacción comienza a ser positiva en el tubo con dos gotas de substrato de toxina (Cuadro 6 B); es de observar también en este cuadro que la reacción es negativa en los tubos con substratos de placenta, bacilo y controles, y de notar, que el control para la toxina se han empleado también cinco tubos con 1, 2, 3, 4 y 5 gotas.

Como consecuencia de los resultados de estas pruebas se deduce que las cantidades mínimas de substrato a utilizar son dos gotas y la dosis mínima a inyectar, para las experiencias con toxina, es de 0,15 c. c. de la disolución al 1/1200.

e) *Experiencias con suspensión de substrato de bacilo diftérico.* — Después de haber comprobado la negatividad de la reacción al substrato de bacilo diftérico, en un lote de 24 conejos, hemos procedido a la inyección de éstos con la dosis mínima de 0,1 c. c. de suspensión de substrato de bacilo que sabemos es necesaria para demostrar la eliminación de los fermentos de defensa. En este lote se observa la aparición de síntomas de intoxicación, con oliguria intensa durante las primeras 48

horas, que impide practicar la reacción en los dos primeros días. A partir del tercer día, la eliminación urinaria es suficiente y comenzamos las determinaciones, por lo tanto, la primera determinación corresponde al tercer día después de la inyección. En cada prueba utilizamos un control con sedimento acetónico de orina, un control con substrato de placenta y el tubo correspondiente al substrato de bacilo diftérico. Del cuadro 7 se deduce que desde la primera determinación todos los conejos eliminan fermentos defensivos que desintegran al substrato de bacilo en todos los casos y que en la novena determinación todas las reacciones son negativas.

A pesar de que los conejos han sido inyectados con la misma dosis de substrato de bacilo diftérico, la gravedad del proceso ha sido diferente, pues hemos comprobado que en los conejos 2, 3, 6, 13, 14, 16 y 21, (29,1 %), los síntomas de intoxicación eran más alarmantes que en los restantes y que de éstos los 4, 5, 12, 23 (16,6 %) padecieron una intoxicación leve.

En el conejo 9, observamos reacción débilmente positiva con el substrato de placenta en la segunda determinación, en el 11, en la primera, en el 12, en la cuarta, en el 13, en la sexta, en el 16 en la cuarta, y en el 19 en la sexta, pero sin embargo, estas reacciones son negativas en el resto de las determinaciones hechas en cada uno de los conejos antes citados, por lo cual esta positividad carece de valor, por no persistir la reacción positiva.

f) *Experiencias con suspensión de bacilo muerto.* — Estas experiencias han sido realizadas de tres formas diferentes. Un grupo de ellas consiste en la inyección de suspensión de bacilo muerto y observar la eliminación de fermentos sin tratamiento alguno. Otro grupo, se ha practicado la misma inyección y luego se han tratado con anatoxina. El último grupo, se hace una vacunación previa con anatoxina y cuando están en período de inmunidad se inyecta una suspensión de bacilos muertos. En todas estas experiencias hemos partido de la dosis mínima a inyectar de suspensión de bacilo muerto para que se produzca eliminación urinaria de fermentos defensivos, que es de 0,15 c. c. y se han verificado pruebas con substratos de placenta, bacilo, toxina y controles de toxina y sedimento acetónico, de orina.

g) *Experiencias con suspensión de bacilo muerto sin tratamiento, ni vacunación.* — Las hemos practicado en un lote de 60 conejos, previa comprobación de que no eliminaban fermentos que desintegrasen a los substratos de placenta, bacilo y toxina, y los hemos inyectado con 0,15 c. c. de la suspensión de bacilo muerto. En los dos días que siguen a la inyección existe oliguria intensa que no permite verificar la reacción. Al tercer día la eliminación de orina es en cantidad suficiente para practicar la reacción, que resulta positiva en esta primera determinación para todos los casos al substrato de bacilo y mantiene la positividad en determinaciones sucesivas hasta la séptima determinación, que coincide con día noveno a partir de la inyección de la suspensión de bacilo, en la mayoría de los conejos. En el cuadro 8, observamos que accidentalmente aparecen reacciones positivas a los substratos de placenta, conejos 1, 5, 11, 16, 26, 29, 31, 38 y 57, y al de toxina, conejos 1, 3, 6, 20, 23, 27, 44, 46, 49, 61, 54 y 55 en una sola prueba y sin persistir, por lo cual carece de valor.

Si analizamos la gravedad de la intoxicación producida por la administración de suspensión de bacilo muerto en relación con la intensidad de la reacción, observamos que los conejos 1, 11, 13, 15, 18, 22, 25, 26, 30, 35, 37, 41, 52, 56 y 60 (26%), 1, 11, 13, 15, 18, 21, 22, 25, 26, 30, 35, 37, 41, 52, 56 y 60 (26%), que padecen intoxicación más grave, son los que presentan intensidad menor de reacción y que la eliminación de fermentos defensivos alcanza su punto álgido, al estabilizarse el proceso, en tanto que en aquellos que padecen intoxicación leve, conejos 7, 8, 12, 16, 20, 28, 29, 31, 36, 43, 49, 51, 54, 55 y 59 (25%), presentan una acusada reacción desde la primera determinación y los que padecen toxicidad media, que son los restantes, la reacción alcanza su mayor punto en la segunda o tercera determinación.

h) *Experiencias con suspensión de bacilo muerto y tratamiento posterior con anatoxina.* — Las hemos verificado en un lote de 27 conejos que han sido inyectados por vía subcutánea con 0,15 c. c. de suspensión de bacilo muerto y se han realizado pruebas con los substratos de placenta, bacilo, toxina y los controles. A las 36 horas de la inyección se observan síntomas de intoxicación y entonces procedemos a la administración de 0,25 c. c. de anatoxina por vía subcutánea. Durante las

48 horas que siguen a la inyección de suspensión de bacilo, la eliminación de orina es en tan escasa cantidad que no permite realizar la reacción de ABDERHALDEN. En el tercer día, ya con orina suficiente, practicamos la primera determinación.

En el cuadro 9, se observa que todos los conejos eliminan fermentos defensivos que desintegran los substratos de bacilo y de toxina en todos los casos y no digieren al de placenta. Aparece reacción positiva al substrato de placenta en los conejos 2, 8, 15, 18 y 22. Si bien el resultado positivo en estos casos, es aislado y no continuo desde la primera a la séptima u octava determinación, como sucede con los demás substratos empleados.

i) *Experiencias con suspensión de bacilo muerto en lote de conejos vacunados.* — Un lote de 27 conejos vacunados, cuadro núm. 10, y en período de inmunidad, una vez comprobado que no eliminan fermentos defensivos que desintegren a los substratos de bacilo, toxina y placenta, los inyectamos con 0,15 c. c. de suspensión de bacilo muerto. Durante las 48 horas que siguen a la inyección de la suspensión, no se observa eliminación de fermentos, por estar en tan escasa cantidad la orina emitida, que no permite practicar la reacción de ABDERHALDEN y la primera determinación posible se hace al tercer día de la inyección. En esta determinación la prueba es positiva para el substrato de bacilo en todos los casos y sólo de una forma esporádica da reacción positiva a los substratos de placenta, conejos 4, 6, 9, 12, 14, 16 y 22, y al de toxina, los conejos 3, 7, 8, 13, 20 y 25, y sólo en algunas determinaciones.

Por lo que afecta a la intensidad de reacción y gravedad del proceso, vemos que los conejos 4, 6, 12, 21, 22, 25 y 27 (25,9 por 100), que paren el proceso con más gravedad, la intensidad de la reacción es menos marcada y en aquellos otros conejos, 2, 11 y 19 que es más leve, la intensidad de la reacción es mayor, a la vez que también se observa que la eliminación de fermentos defensivos en algunos de éstos, conejos 2, 11 y 19 (11,1 %) cesa en la séptima determinación, mientras que en los primeros en algunos cesa a la novena.

Por lo tanto, de los resultados obtenidos en estas experiencias con suspensión de bacilo muerto, deducimos que aparecen en la orina de los conejos fermentos defensivos que desintegran al substrato de bacilo, cuando se inyectan con la suspen-

sión de bacilo muerto sin tratamiento y en los conejos vacunados; que estos fermentos son demostrables desde la primera determinación; que la intensidad de la reacción es tanto mayor en las primeras determinaciones, cuanto que el proceso sea más benigno; que en estos casos desaparece la positividad más pronto que en los graves, en los que a su vez, la reacción es menos intensa en las primeras determinaciones. Por cuanto a las experiencias realizadas con suspensión de bacilo muerto y tratamiento posterior con anatoxina, se observa desde la primera determinación posible, la eliminación de fermentos que hidrolizan los substratos de bacilo y toxina; que la relación entre la eliminación de fermentos y la intensidad de la reacción, están en razón inversa y guardan paralelismo con las experiencias del grupo anterior.

CUADRO 1

A		PACIENTE	DIAGNÓSTICO	P	K	CE	CR	BD	BT
M. T. de P.	Emb. 4.º mes			++	-	-	-	-	-

B		PACIENTE	DIAGNÓSTICO	P					K	CE	CR	BD	BT
M. T. de P.	Emb. 4.º mes			5	10	15	20	25					
				-	+	++	++	+	-	-	-	-	-

CUADRO 2

CONEJOS	K	P	B	K	P	B
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-

CUADRO 3

Conejos	N.º c. c. iny.	DIA 1			DIA 2			DIA 3			DIA 4		
		K	P	B	K	P	B	K	P	B	K	P	B
1	0,050	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	-
2	0,075	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	-
3	0,100	.	.	.	.	.	.	+	+	++	-	-	+
4	0,125	.	.	.	.	.	.	-	-	++	-	-	+
5	0,150	.	.	.	.	.	.	-	-	++	-	-	++
6	0,175	.	.	.	.	.	.	-	-	+	-	-	++
7	0,200	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	+

Nota: Cuando no hay orinas o están en cantidad insuficiente para hacer la reacción, los representamos por .

CUADRO 4

A	CONEJOS	K	P	B
	1	-	-	++
	2	-	-	+
	3	-	-	+

B		K	P	B <sub>1</sub>	B <sub>10</sub>	B <sub>15</sub>	B <sub>20</sub>	B <sub>25</sub>
CONEJOS	1	—	—	—	+	++	+	+
	2	—	—	—	++	++	++	++
	3	—	—	—	++	++	++	++

CUADRO 5

CONEJOS	K	P	B	KT	T	K	P	B	KT	T
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

CUADRO 6

A		CONEJOS		K	P	B	KT	T
		1	2	—	—	—	—	—
		2	3	—	—	—	—	—
		3		—	—	—	—	—

B		CO-NEJOS		K	P	B	KT <sub>1</sub>	KT <sub>2</sub>	KT <sub>3</sub>	KT <sub>4</sub>	KT <sub>5</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>
		1	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+	+
		2	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	+	++	++
		3		—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++

CUADRO 7

Conejos Subs.		DETERMINACIONES								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—	—
2	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	+	—	—	—	—	—	—
	B	+	+	+	+	++	+++	+++	+	+
3	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	+	—	—	—	—	—	—	—
	B	+	+	+	+	++	+++	++	+	—
4	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—	—
5	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	+	—	—	—
	B	+++	+++	++++	++++	++++	++	+	—	—
6	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	+	—	—	—	—
	B	+	++	++	++	++	+++	+++	+	—
7	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	—	—
8	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	++	+++	++	+++	++	+	—	—
9	K	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	+	—	—	—	—	—	—	—
	B	+++	+++	+++	+++	++	++	++	—	—

10	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	++	+++	+++	+++	+++	+	—
11	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	+	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	++	++	+++	+++	+++	+	+
12	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	+++	+++	+++	+++	++	++	—
13	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	+	+	+	+	++	+++	+++	+
14	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	+	+	+	++	++	++	+	—
15	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	+	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	++	+++	+++	+++	+++	+	—
16	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	+	—	—	—	—
	B	+	+	+	+	++	++	++	+
17	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	++	+++	+++	+++	+++	+	—
18	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	+++	+++	++++	++++	++++	++	+	—
19	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	++	++	+++	+++	+++	+	—
20	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	++	+++	+++	++	++	+	+
21	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	+	++	++	++	++	+++	++	+
22	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	+	—	—	—	—	—	—	—
	B	+++	+++	+++	+++	+++	++	—	—
23	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	+++	+++	+++	++++	+++	+	—
24	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	++	++	+++	++	++	+	—

CUADRO 8

DETERMINACIONES

Cont.Jos	Subs.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
K		—	—	—	—	—	—	—	—	—
P		—	+	—	—	—	—	—	—	—
B		++	++	++	++	+++	+++	+++	+	—
K	T	—	—	—	—	—	—	—	—	—
T		—	—	—	+	—	—	—	—	—

PROTEIDASAS ESPECÍFICAS

2	K P B KT T	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- + -- --	-- -- -- --	-- -- -- --
3	K P B KT T	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- ++ -- --	-- ++ -- --	-- -- -- --
4	K P B KT T	-- ++ -- --	-- ++ -- --	-- ++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- -- -- --
5	K P B KT T	-- ++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- ++ -- --	-- ++ -- --	-- -- -- --
6	K P B KT T	-- ++ -- --	-- ++ -- --	-- ++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- ++ -- --	-- -- -- --
7	K P B KT T	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- ++++ -- --	-- ++++ -- --	-- +++ -- --	-- ++ -- --	-- -- -- --
8	K P R KT T	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- + -- --	-- + -- --	-- -- -- --
9	K P B KT T	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- ++ -- --	-- +++ -- --	-- ++ -- --	-- ++ -- --	-- -- -- --
10	K P B KT T	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- ++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- + -- --	-- -- -- --
11	K P B KT T	-- + -- --	-- + -- --	-- + -- --	-- + -- --	-- ++ -- --	-- ++ -- --	-- ++ -- --	-- -- -- --
12	K P B KT T	-- +++ -- --	-- ++++ -- --	-- ++++ -- --	-- ++++ -- --	-- ++++ -- --	-- ++ -- --	-- + -- --	-- -- -- --
13	K P B KT T	-- ++ -- --	-- ++ -- --	-- ++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- ++ -- --	-- ++ -- --	-- -- -- --
14	K P B KT T	-- +++ -- --	-- ++ -- --	-- ++ -- --	-- +++ -- --	-- +++ -- --	-- ++ -- --	-- + -- --	-- -- -- --

15	K P B KT T	- - + - -	- - + - -	- - + - -	- - ++ - -	- - ++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - + - -	- - - - -	- - - - -
16	K P B KT T	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - + - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
17	K P B KT T	- - ++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - + - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
18	K P B KT T	- - + - -	- - ++ - -	- - ++ - -	- - ++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
19	K P B KT T	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - ++ - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
20	K P B KT T	- - ++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - +	- - +++ - -	- - ++ - -	- - + - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
21	K P B KT T	- - + - -	- - ++ - -	- - ++ - -	- - ++ - -	- - ++ - -	- - +++ - -	- - ++ - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
22	K P B KT T	- - + - -	- - + - -	- - + - -	- - + - -	- - + - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
23	K P B KT T	- - +++ + -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - + - -	- - + - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
24	K P B KT T	- - ++ - -	- - ++ - -	- - ++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - ++ - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
25	K P B KT T	- - ++ - -	- - ++ - -	- - ++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - ++ - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
26	K P B KT T	- - ++ - -	- - ++ - -	- - ++ - -	- - ++ - -	- - ++ - -	- - +++ - -	- - ++ - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
27	K P B KT T	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - -	- - +++ - +	- - +++ - -	- - ++ - -	- - ++ - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -





54	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-
	KT	+	-	-	-	-	-	-	-
55	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
	KT	+	-	-	-	-	-	-	-
56	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	+	+	+	+	++	+++	++	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
57	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	++	++	+++	++	++	++	+	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
58	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
58	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	++++	++++	++++	+++	++	+	+	-
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-
60	K	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	+	+	+	+	+	++	++	+
	KT	-	-	-	-	-	-	-	-

CUADRO 9

DETERMINACIONES

Consejos		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	++	++	+++	+++	++	++	+	-	-
	KT	++	++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
2	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	+++	+++	++	+++	++	++	+	-	-
	KT	++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
3	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	++	++	++	+++	+++	+++	++	-	-
	KT	++	++	++	+++	+++	+++	+	-	-
4	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
	KT	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-

5	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	+	+	++	+++	+++	++	++	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+	+	+	++	++++	+++	++	+
6	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	++	+++	+++	++	++	++	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	+++	+++	+++	++	+	—
7	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	—
8	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	+	—	—	—
	B	+++	++++	++++	+++	+++	+	—	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++++	++++	++++	++++	++	+	—	—
9	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	+++	+++	++++	++++	++	++	+	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	+++	+++	+++	++++	+++	+++	++	—
10	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	+++	+++	++	++	++	+	+	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	+++	+++	++	++	+	—
11	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	+++	+++	+++	++	++	++	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	++	+++	+++	+++	++	—
12	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	++	+++	+++	++	+	+	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	++	++	++	++	+	—
13	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	+++	+++	+++	++	+	+	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	+++	++++	++++	+++	++	++	—
14	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	+	+	++	+++	+++	++	++	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	+	+	++	+++	+++	++	+
15	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	++	++	+++	+++	++	+	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	++	++	+++	+++	++	—
16	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	++	++	+++	+++	+++	++	+	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	++	+++	+++	++	++	—
17	K	—	—	—	—	—	—	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
	KT	—	—	—	—	—	—	—	—
	T	++	++	+++	+++	+++	++	++	—







CUADRO 11

Substratos	Valoración de substratos. Cantidades en									
	Gotas					Miligramos				
	I	II	III	IV	V	5	10	15	20	25
Placenta						—	+	++	++	++
Bacilo						—	++	++	++	++
Toxina	—	++	++	++	+					

CUADRO 12

Substrato	Valoración en dosis mínimas. C. c. a inyectar								
	0,050	0,075	0,100	0,125	0,150	0,175	0,200	0,225	0,250
de bacilo	—	—	+	+	+	+	+		
Bacilo muerto	—	—	—	—	+	+	+		

CUADRO 13

Productos	Substrato que digieren			Tiempo de duración de la eliminación en días
	D.	T	P	
Substrato de bacilo	100 %	0 %	0 %	9
Bacilo muerto	100 %	0 %	0 %	9
Bacilo muerto más ana toxina	100 %	100 %	0 %	9
Vacunación y bacilo muerto	100 %	0 %	0 %	9

## CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS

Como consecuencia de los resultados obtenidos en las anteriores experiencias, deducimos las siguientes consideraciones:

En cuanto al desarrollo de la técnica, ya hemos dicho que se ha procedido a la valoración de los substratos empleados y a la determinación de dosis mínima capaz de producir la eliminación de fermentos defensivos por la orina, demostrables por la reacción. Del cuadro núm. 11 se desprende que la cantidad necesaria de substrato en cada prueba para conseguir que sea positiva es de 10 miligramos, pero los substratos de bacilo y de placenta y de dos gotas para el de toxina. La reacción de ABDERHALDEN se verifica en buenas condiciones, cuando previamente evaluamos el substrato, al objeto de no obtener resultados erróneos. En el cuadro núm. 12, que resume la valoración

de dosis mínimas, se comprueba que el substrato de bacilo comienza a la dosis de 0,1 c. c. y para el bacilo muerto a la de 0,15 c. c., por lo cual para provocar la aparición de fermentos defensivos, bastan dosis muy pequeñas de proteidos extraños.

El tiempo exacto que transcurre desde la administración de proteínas extrañas, hasta la presentación de los fermentos defensivos, no se puede fijar en nuestros experimentos, puesto que hasta el día tercero, no orinan los conejos en cantidad suficiente para realizar la reacción de ABDERHALDEN; ahora bien, se demuestra que es positiva en todos los casos al tercer día, por lo que admitimos una aparición rápida de los fermentos defensivos en el organismo animal.

En los ensayos verificados con las suspensiones de substrato de bacilo y de bacilo muerto, incluídos en el cuadro número 13, observamos que los resultados son positivos en el 100 % de las pruebas. Así, pues, la reacción ha resultado específica en la totalidad de los casos para el substrato adecuado que confirma las experiencias de ABDERHALDEN, sobre la eliminación de las enzimas defensivas en las enfermedades infecciosas.

Se demuestra que las proteidasas en los ensayos practicados, dejan de eliminarse transcurridos nueve días a partir de la inoculación para la toxina, bacilo muerto y substrato de bacilo, cuando se emplean dosis mínimas.

Es de señalar que los inyectados con bacilo muerto, a pesar del tratamiento con la anatoxina, o de la vacunación previa, continúan originando fermentos para el substrato de bacilo en igual forma que los no tratados, y esto nos lleva a creer que la eliminación de las proteidasas específicas se mantiene en los procesos infecciosos hasta su curación, no obstante el tratamiento efectuado.

La intensidad de la reacción está en razón inversa con la gravedad del proceso y a peor pronóstico, corresponde en todos los casos menor positividad de aquélla y viceversa; resultaría que durante la fase de eliminación de fermentos, puede comprobarse dicha gravedad por la debilidad de la prueba.

Suponemos, de las experiencias con bacilo muerto y tratamiento posterior con anatoxina que dan resultado positivo para los substratos de bacilo y de toxina, que también se producen fermentos específicos por las albúminas de la anatoxina cuya ratificación será objeto de otra comunicación posterior. Es de notar que los animales vacunados previamente a la administra-

ción de bacilo muerto no producen desintegración del substrato de toxina.

## CONCLUSIONES

Primera. — La producción de enzimas específicas eliminadas por la orina, en nuestras experiencias con «*Corynebacterium diphtheriae*» muerto, ha dado resultados positivos en la totalidad de las pruebas por la reacción de la ninhidrina.

Segunda. — Se comprueba que la cantidad de substratos de bacilo diftérico y placenta necesarios para determinar la eliminación de proteidasas defensivas, es de 10 mgrs. y para el substrato de toxina diftérica de dos gotas.

Tercera. — Las dosis mínimas de proteidos extraños imprescindibles para provocar la formación de éstos fermentos, son siempre pequeñas y oscilan entre 0,1 c. c. y 0,2 c. c.

Cuarta. — En el primer día de eliminación de orina por los conejos, inyectados con cantidades suficientes, se demuestra la presencia de los fermentos defensivos.

Quinta. — La reacción es específica para el substrato que corresponde a la substancia proteica administrada en el 100 por 100 de las pruebas.

Sexta. — Los casos en que la reacción de ABDERHALDEN es débil son los que cursan con mayor gravedad, ya que la capacidad defensiva del organismo está disminuída, y viceversa.

## Summary

The authors, in this first communication demonstrate by the ninhydrine reaction that the production of specific enzymes, eliminated by urine, in their experiences with dead «*Corynebacterium diphtheriae*», gives a positive result in all the tests.

That the quantity of substrates of diphterial bacillus and placenta needed to determine the elimination of defensive proteidasas is of 10 mg., and of two drops for the substrate of diphteric toxin.

That the minimal dose of alien proteides indispensable to provoke the formation of these ferments are always small, and waver between 0,1 ml. and 0,2 ml.

That on the first day of urine elimination by the rabbits, injected with sufficient quantities, the presence of the defensive ferments is demonstrated.

That the reaction is specific for the substrate corresponding to the administered proteic substance, in 100 % of the tests.

And that the cases in which the ABDERHALDEN reaction is weak are gravest ones, as the defensive capacity of the organism is diminished, and viceversa.

#### Bibliografía

1. ABDERHALDEN (E). Die Abderhaldensche Reaktion, 6.º 1941; 5.º, 1922; Z. phys. Chem. 415, 1909; Handb. d. Bioog. Arbeitmethod, 1933.
2. LUCAS GALLEGO (J.). Tesis Doctoral de Medicina. Madrid, año 1942.
3. LUCAS GALLEGO (J.). Medicina. 12, n.º 5, mayo de 1944.
4. ESCRIBANO ARNAL (M. J.). Tesis Doctoral de Medicina. Madrid, 1946.
5. SANTOS RUIZ (A.) y LUCAS GALLEGO (J.): Boletim de Escola de Farmacia. Coimbra, 1946.
6. MATILLA (V.): Man de Mier., II, 331, 1942.
7. ZAPATERO (E.): Lec. de Micr., 307. Man. de Téc. 225, 1942.
8. RUIZ FALCÓ: A. d. Micr. Med., 84, 1932-1933.
9. ELEICEGUI (J.). Difteria: Epidemiología, diagnóstico clínico y tratamiento. Madrid, 1941.
10. SANCHO MARTÍNEZ: Citado por ELEICEGUI.
11. CALLAO (V.): Tesis Doctoral de Farmacia, Madrid 1944.
12. DOPTER (C H.) y SACQUEPEE (E.): Man. d. Bact., I 576, 1941.
13. GOTSCBLICH (E.): T. p. d. Micropar. y Sero., 233, 1932.
14. TOPLEY (W. W. C.) y WILSON (G. S.): Bact. e Inm., 323, 1055, 1942.
15. MAX GUNDELLH Tra. Cont., 174, 1940.

