

BIOPROFILAXIS DE LA TUBERCULOSIS

ALBERTO LEÓN, M. C., M. P. H. *

LA BIOPROFILAXIS de la tuberculosis se limita a la inmunoprofilaxis y, de ésta, a la inmunización activa artificial, es decir, a los métodos que tienen por objeto estimular artificialmente la resistencia específica del organismo frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Los procedimientos seguidos experimental o prácticamente con tal fin se pueden agrupar en tres categorías: 1) Inmunización experimental con gérmenes muertos; 2) Inmunización experimental inicialmente y, con fines prácticos en la actualidad, con gérmenes vivos de virulencia atenuada, y 3) Inmunización, aún en fase experimental, con productos o fracciones químicas derivadas de los gérmenes.

INMUNIZACIÓN EXPERIMENTAL CON GÉRMENES MUERTOS

El interés por prevenir la tuberculosis por medio de la inmunización artificial específica con una vacuna, se despertó inmediatamente después del descubrimiento del bacilo causante de la tuberculosis por Koch, en 1882. Los primeros ensayos se hicieron con vacunas preparadas con gérmenes muertos. Para matar los gérmenes se han empleado agentes físicos y químicos, persiguiéndose siempre alterar lo menos posible la estructura del germen para preservar sus propiedades antigénicas.

Entre los agentes físicos, se han empleado principalmente el calor y la luz ultravioleta. Las vacunas preparadas con gérmenes calentados a menos de 100°C. no indujeron protección definida en las investigaciones de Calmett, Guérin y Breton (1907)¹ realizadas en cobayos, ni en las investigaciones de Smith (1908)² realizadas en terneras; ni en las de Boquet y Negre (1923),³ en cone-

* Director del Laboratorio del B. C. G., Investigador del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales.

jos; aun cuando estos investigadores observaron que esta clase de vacunas pudieron inducir alergia tuberculínica en algunos casos. Swedberg (1951) ⁴ observó que ratones inyectados con 3 dosis de una vacuna preparada con *M. tuberculosis* humanos virulentos, pero calentados, sobrevivían más que los testigos, no así cuando la vacuna fue preparada con B. C. G. muerto por el calor. En recientes investigaciones realizadas por el U. S. Public Health Service (1955), ⁵ se observó que el B. C. G. vivo a la concentración de un milésimo de la dosis estándar (0.075 mg.) confirió mayor protección a los cobayos (a juzgar por la mayor supervivencia), que el B. C. G. muerto por el calor, aun a una concentración de un millón de veces mayor (mil veces la dosis estándar).

También se han ensayado en el hombre las vacunas preparadas con gérmenes muertos por el calentamiento, Brochman (1930) ⁶ la usó por vía intradérmica y Goodwin (1934) ⁷ por vía intramuscular; ambos observaron solamente que algunos niños así vacunados se hicieron tuberculino-positivos. Opie (1939) ⁸ comunicó resultados alentadores en la vacunación de los internos de los manicomios de Jamaica por medio de una vacuna preparada con gérmenes muertos por el calentamiento; pero Wells (1949) ⁹ no observó resultados satisfactorios en la población general de Jamaica vacunada con la misma vacuna, en cuanto a la protección conferida, aun cuando los vacunados se sensibilizaron a la tuberculina.

Coulaud (1935 y 1938) ^{10, 11} ha empleado vacunas de gérmenes por muertos por el calentamiento, suspendidos en parafina o aceite, para la inmunización experimental de cobayos y conejos, logrando producirles un alto grado de sensibilidad a la tuberculina. Según los trabajos de Rist (1937 y 1938), ^{12, 14} estos antígenos confieren una alergia más intensa y de mayor duración que los mismos gérmenes calentados suspendidos en solución salina. Coulaud (1951) ¹⁵ observó resistencia aumentada a la tuberculosis experimental en los animales dos meses después de inyectados con sus antígenos, y, según Freund y col. (1937), ¹⁶ esta resistencia mayor puede persistir hasta dos años. La mayoría de los autores, entre ellos Yanagisawa y col. (1951), ¹⁷ Yamada (1952) ¹⁸ y Okiyoshi y col. (1951) ¹⁹ concuerdan, sin embargo, en que la resistencia antituberculosa conferida al hombre con gérmenes muertos calentados, ya sea suspendidos en suero fisiológico o en hidrocarruros, es inferior y de más corta duración que la que confiere el B. C. G. vivo, el que generalmente se ha empleado como referencia en todas estas investigaciones.

En resumen, podemos decir, que con grandes dosis de bacilos tuberculosos muertos por calentamiento e inyectados a los animales, se logra producir cierto grado de protección contra la infección virulenta; pero ésta es siempre inferior y de más corta duración que la conferida con vacunas de gérmenes vivos.

La luz ultravioleta fue empleada por Smithburn y Levin (1939) ²⁰ para esterilizar una vacuna preparada con bacilos tuberculosos humanos virulentos, con

la que lograron conferir considerable resistencia a cobayos contra la infección experimental; pero el grado de protección conferida dependió de la presencia y proporción de gérmenes viables en la vacuna, que no fue completamente esterilizada. Olson (1947) ²¹ y col. aplicaron a cobayos tres dosis consecutivas de 5 mg. de una vacuna irradiada por vía intraperitoneal, y lograron aumentar ostensiblemente la resistencia de los animales a la infección experimental, pero sólo a costa de dosis extremadamente grandes. Resultados semejantes fueron observados por Sarber y col. (1950), ²² Smith y col. (1953) ²³ en cobayos, y por Milzer y col. (1950) ²⁴ en ratones. Youmans (citado por Rosenthal) no logró conferir resistencia apreciable a los ratones vacunados con la misma vacuna que usó Smith (*loc. cit.*) en cobayos; pero en cambio se observó marcada resistencia en los ratones testigos vacunados con B. C. G. en los recientes estudios del U. S. Public Health Service sobre vacunación, alergia e inmunidad en la tuberculosis, en los que se incluyó el uso de una vacuna B. C. G. irradiada 24 horas con rayos ultravioleta; se observó mejor protección de los cobayos que con la vacuna B. C. G. calentada, pero muy inferiores que con el B. C. G. vivo, aun a dosis 100 veces menores.

Los agentes químicos han sido usados para matar los gérmenes o atenuar su virulencia. Petraghani (1939) ²⁵ preparó una vacuna tratando gérmenes virulentos con formalina. Esta vacuna, llamada *anatuberculina intragale* Petraghani (A.I.P.), ha sido empleada con cierta amplitud en Italia, para la inmunización del hombre. Salvioli y col. (1952 y 1952a) ^{26, 27} han comunicado la aparición de alergia a la tuberculina, y cierto grado de protección antituberculosa en perros vacunados con esta vacuna por vía subcutánea, intradérmica o por multipuntura. Monaldi (1952) ²⁸ afirma que la vacuna de Petraghani produce alergia tuberculínica, pero no produce el poder de localización de la infección virulenta como lo hace el B. C. G.

El fenol ha sido también usado en la preparación de vacunas antituberculosas por Dubos (1953) ²⁹ y Ferguson (1936), ³⁰ quienes refieren haber conferido cierto grado de resistencia específica a ratones y cobayos. En la citada investigación del U. S. Public Health Service se usó también la vacuna preparada según el método de Dubos y col., y se observó que la inmunidad conferida con ella a los cobayos fue inferior a la observada en los que recibieron dosis muy inferiores de B. C. G. Bloch y Segal (1955) ³¹ también encontraron resultados negativos en los ratones.

Otros agentes químicos empleados en la preparación de vacunas antituberculosas son el yodo, por Vallée (1909); ³² fluoruros, por Rappin (1909); ³³ ácido oleico, por Noguchi (1909); ³⁴ urea, galactosa y glicerina por Levy y col. (1906); ³⁵ tolueno y éter de petróleo, por Vallée (*loc. cit.*); neurina y colina, por Deycke (1910), ³⁶ etc. En general, aunque se logró cierto aumento de la re-

sistencia específica con alguna de estas vacunas, los resultados fueron poco satisfactorios.

INMUNIZACIÓN CON GÉRMESES VIVOS DE VIRULENCIA ATENUADA

Desde 1889 se hicieron intentos de atenuar bacilos tuberculosos humanos y bovinos por medio de cultivos en medios especiales; Dixon (1889);³⁷ Graucher y Martin (1893),³⁸ y de Schweinitz (1894)³⁹ dijeron haber conferido protección a conejos y cobayos en el laboratorio. El primer trabajo extenso sobre inmunización con gérmenes atenuados fue sin duda el de von Behring y col. (1902),⁴⁰ quienes usaron bacilos tuberculosos humanos atenuados por cultivos en medios especiales para la inmunización del ganado vacuno, con resultados satisfactorios; pero la vacuna hubo de abandonarse porque las vacas inyectadas con ella eliminaban bacilos en la leche, lo cual se consideró peligroso para el hombre. Por las mismas razones se abandonaron otras vacunas de gérmenes atenuados que se usaron para la inmunización del ganado, tales como la llamada Tauroman de Koch (1905),⁴¹ que era una mezcla de bacilos tuberculosos humanos y bovinos, atenuados por envejecimiento en cultivos en caldo glicerinado, y la llamada Antifimatol de Klimer (1908),⁴² mezcla de bacilos tuberculosos humanos atenuados por el calentamiento y pasados por la salamandra. Gardner (1932)⁴³ y Dubos (1953)⁴⁴ hallaron la propiedad indiscutiblemente inmunizante de la cepa R_1 para los cobayos y ratones, cepa de origen humano, atenuada espontáneamente después de frecuentes subcultivos en medios artificiales. Se encontró que la cepa $H_{37}Ra$ atenuada por disociación de la original H_{37} por Steenken (1935)⁴⁵ en el Laboratorio Trudeau, confiere el mismo grado de protección que el B. C. G. a los cobayos. Debidamente valoradas, ninguna de las investigaciones realizadas con todas las vacunas preparadas con gérmenes tuberculosos de virulencia atenuada ha mostrado superioridad al B. C. G., ni ha sido tan ampliamente ensayada en los animales y en el hombre. El mismo criterio se aplica en relación con la vacuna preparada con *M. tuberculosis* tipo murino, aislado por Wells (1946)⁴⁶ del *Microtus agrestis*, y mejor conocido con el nombre de "Bacillus vole", cuya vacuna, estudiada por Wells (1940)⁴⁷ y por Birkhaug (1946)⁴⁸ en cobayos; por Griffith (1940)⁴⁹ y Young (1949)⁵⁰ en el ganado, ha sido estudiada en el hombre. El primer informe del Tuberculosis Vaccines Clinical Trials Committee del Medical Research Council de la Gran Bretaña (1956),⁵¹ que la sujetó a la más amplia y controlada investigación de que haya sido objeto en la especie humana, se refiere a que la protección conferida es comparable a la del B. C. G., pero un elevado porcentaje de los vacunados desarrollaron lupus en el sitio de la vacunación, uno o más años después, lo que se debe a que es

aún virulento para el hombre, por lo que esta vacuna no es ya usada ni por los ingleses.

INMUNIZACIÓN CON LE B. C. G.

En 1908, Calmette y Guérin (1909) ⁵² iniciaron el cultivo en patata glicerinada con bilis de buey de una cepa de bacilo tuberculoso bovino aislada por Nocard de un caso de mastitis de una ternera, la que después de algunos meses de cultivarse en este medio perdió algunas de sus características, entre ellas su virulencia, primero para la ternera y después para el cobayo. Calmette y Guérin (1913) ⁵³ la usaron en investigaciones para la inmunización contra la tuberculosis de los bovinos, y Calmette, Negre y Bouquet (1922) ⁵⁴ en ensayos de inmunización de cobayos y conejos. Como los resultados fueron ampliamente satisfactorios, en 1921 fue usado este bacilo, desde entonces conocido con el nombre de B. C. G. para la inmunización antituberculosa del hombre por Calmette, Guérin y Weill-Hallé con la colaboración de Boquet, Negre, Wilbert, Leger y Turpin (1924). ⁵⁵ Desde entonces hasta la fecha el B. C. G. ha sido objeto de las más numerosas y amplias investigaciones de que haya sido objeto vacuna alguna, tanto en los animales de laboratorio como en el hombre, y ha sido aplicada para la inmunización contra la tuberculosis humana a más de 200 millones de habitantes en el mundo entero. El Primer Congreso Internacional del B. C. G. reunido en París en 1948, con la asistencia de 300 hombres de ciencia, representando a 35 países, llegó a las siguientes conclusiones: "1) El estudio de más de 10 millones de vacunaciones llevadas a cabo en todo el mundo, durante un período de más de 25 años, confirma la absoluta inocuidad de la vacunación con el B. C. G. en la especie humana. a) La vacunación con el B. C. G. es el *medio más efectivo* de prevención de la tuberculosis".

Es imposible, en los límites de esta presentación, hacer ni siquiera un breve resumen de los innumerables trabajos que se han publicado sobre la vacuna B. C. G. y su empleo para la inmunización de animales de laboratorio y del hombre; tan sólo debo mencionar algunos de los hechos más importantes que han quedado establecidos después de tan prolongadas investigaciones, o que son objeto de estudio para su perfeccionamiento en la actualidad.

Aceptada su inocuidad y efectividad como agente inmunizante, el B. C. G. ha tomado un lugar definido en la práctica de la lucha contra la tuberculosis por medio de la inmunización. En la mayoría de los países de Europa, América, Asia y Africa ha sido empleado en amplia escala y, hasta julio de 1960, en campañas de vacunación en masa bajo los auspicios de la *Empresa Conjunta*, primero y de UNICEF después, se habían vacunado 110 370 659 personas, de las cuales corresponden 7 870 022 a países latinoamericanos, sin incluir las campañas realizadas

por Brasil, Uruguay y Argentina, en las que se ha vacunado extensamente por cuenta de sus gobiernos. Tan sólo en Japón se habían vacunado hasta 1953 más de 59 millones de personas, según los datos de Sams (1954) ⁵⁶ y es de estimarse que más de 100 millones de personas han sido vacunadas con el B. C. G. en la URSS y países de Europa Oriental, en donde la vacunación antituberculosa es obligatoria, así como lo es en Noruega, Francia, Brasil, Japón y otros países.

Se hacen progresos en el sentido de fijar una técnica estándar y un patrón para el B. C. G. Mientras tanto, se han fijado requisitos mínimos que deben satisfacer los laboratorios, la técnica de preparación y la vacuna misma, por la Oficina de Estandarización de Productos Biológicos de la OMS.

La preservación de la vacuna por medio de la desecación, lo cual tendrá muchas ventajas, se ha venido realizando con creciente interés y éxito. El primer método fue referido por Leschinskaya (1946), ⁵⁷ después del cual han aparecido numerosas publicaciones confirmando la bondad del procedimiento; pero la vacuna fresca aún se considera de mejor potencia y se prefiere en la mayoría de los países. Nuestras investigaciones personales, León y col. (1958), ⁵⁸ confirman este modo de pensar.

En recientes investigaciones personales y de mis colaboradores, León y Bilbao (1956); ⁵⁹ León (1960), ⁶⁰ realizadas primero en el ratón blanco y después en el hombre, hemos demostrado que tres dosis consecutivas por vía intradérmica confieren a los ratones protección absoluta contra la tuberculosis experimental de inoculación intravenosa, hecho por primera vez logrado en la experimentación animal, y que en el hombre confirió mayor protección contra una fuerte exposición al contagio.

INMUNIZACIÓN CON PRODUCTOS O FRACCIONES QUÍMICAS DERIVADAS DE LOS GÉRMESES

Desde los tempranos trabajos sobre inmunización contra la tuberculosis se emplearon extractos del bacilo tuberculoso. Proteínas, como la tuberculina, fueron usadas por Calmette y Guérin (1914) ⁶¹ para la inmunización de bovinos; por Klopstock (1913), ⁶² y por Trudeau (1890) ⁶³ en animales de laboratorio; Kleinschmidt (1910); ⁶⁴ Negre (1950) ⁶⁵ y Negre y Boquet (1921) ⁶⁶ experimentaron los lipoides sin obtener éxito alguno en cobayos, conejos, perros y en el ganado vacuno. Recientemente, Choucrour (1947) ⁶⁷ ha logrado conferir cierto grado de resistencia a los cobayos con un complejo lipopolisacárido. Smith y col. (1955, 1954) ^{68, 69} lograron conferir cierto grado de resistencia a cobayos y ratas con extractos alcohólicos y clorofórmicos. Más recientemente, Weiss y Dubos (1956) ⁷⁰ lograron conferir también alguna resistencia a ratones blancos, con un extracto metílico de bacilos tratados con acetona, el llamado antígeno metílico por Negre y

Boquet (1921).⁷¹ Raffel (1946)⁷² usó, para la inmunización de cobayos, antígenos constituidos por las ceras, fosfátidos, proteínas y polisacáridos de *B. tuberculosis*, solos o combinados, pero con ninguno logró aumentar la resistencia de los animales a la inoculación de prueba, aun cuando las ceras los sensibilizaron a la tuberculina.

En investigaciones personales con mis colaboradores hemos empleado los que llamamos antígenos sintéticos, preparados con polisacáridos del B. C. G. por bio-diálisis y adsorbidos a fosfato de aluminio, o combinados a la inmunogammaglobulina, o una combinación de ambos, con los que hemos conferido a los ratones blancos una resistencia mayor que la inducida con una dosis de B. C. G. vivo contra la inoculación intravenosa de múltiplos de la dosis promedio letal. Si los resultados se confirman en el hombre, estos antígenos pueden ser una promesa para la profilaxis de la tuberculosis en el futuro.

REFERENCIAS

1. Calmette, A., Guerin, C. y Breton M. 1907. *Contribution a l'etude de la tuberculose experimentale du cobaye* (infection et assais de vaccination par la voie digestive), Ann Inst. Pasteur, 21:401.
2. Smith, T. 1908. *The vaccination of cattle against tuberculosis*. J. Med. Research, 18:451.
3. Boquet, A. y Negre, L. 1923. *Sur la sensibilité a la tuberculine des lapins soumis a des injections de bacilles tuberculeux*. Compt. rend. Soc. de biol. 88:1013.
4. Swedberg, B. 1951. *Studies in experimental tuberculosis*. Acta med. Scandinav. Suppl. 254:139.
5. Tuberculosis Program, U.S. Public Health Service: Experimental studies of caccination, allergy and immunity in tuberculosis. III. Effecto of killed BCG vaccine, Bull World Health Organ. 1955. 12:47.
6. Brachman, D.S. 1930. *Immunisation against tuberculosis by the Larger vaccine*. Am. Rev. Tuberc. 22:226.
7. Goodwin, T. C. y Schwentker, F.F. 1934. *Protective inoculation against tuberculosis in infants by the use of heat-killed tubercle bacilli*. J. Pediat. 5:475.
8. Opie, E. I., Flahiff, E. W. y Smith, H. H. 1939. *Protective inoculation against human tuberculosis with heat-killed tubercle bacilli*. Am. J. Hyg. 29:155.
9. Wells, C. W., y Flahiff, E. W. 1944. *Results obtained with heat-killed tubercle bacilli administered to persons in a general population*. Am. J. Hyg. 40:109.
10. Coulaud, E. 1938. *Allergy and immunity from dead tubercle bacilli in vegetable oil*. Ann. Inst. Pasteur. 61:355.
11. Coulaud, E. 1935. *Essais de vaccination du cobaye et du lapin contre la tuberculose avec des bacilles tuberculeux enrobés dans la paraffine solide*. Rev. belge tuberc. 5:1181.
13. Rist, N. 1938. *Les lésions metastatiques produites par les bacilles tuberculeux morts enrobés dans les paraffines*. Ann. Inst. Pasteur. 61:121.
14. Rist, N. 1937. *Lésions ganglionnaires et pulmonaires produites chez le cobaye par inoculation de bacilles tuberculeux morts enrobés dans la paraffine ou l'huile de vaseline*. Compt. rend. Soc. de biol. 126:185.

15. Coulaud, E. 1951. *Comment doit-on concevoir actuellement le probleme de la vaccination antituberculeuse*. Rev. tuberc. 15:676.
16. Freund, J., Casais, J. y Hosmer, P. E. 1937. *Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil*. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 27:509.
17. Yanagisawa, K., Kanai, K., Shiga, Y. e Ito, F. 1951. *Biological properties of paraffin oil extract of dried heat-killed BCG*. Jap. M. J. 4:87.
18. Yamada, S. I. 1952. *Comparison of immunities against tuberculosis between guinea pigs treated with dead tubercle bacilli, paraffin-oil vaccine and those treated with BCG by method of slide cell culture*. Sci. Rep. RITU, Ser. C. 3:333.
19. Okiyoshi, K., Hashimoto, T., y Seki, M. 1951. *Studies on the heat-killed tubercle bacilli suspended in paraffin oil*. Kekkaku, 26:404.
20. Smithburn, K. C. y Lavin, G. I. 1939. *The effects of ultraviolet radiation on tubercle bacilli*. Am. Rev. Tuberc. 39:782.
21. Olson, B. J., Habel, K. y Piggott, W. R. *A comparative study of live and killed vaccines in experimental tuberculosis*. A preliminary note. Pub. Health Rep. 1947. 62:293
22. Sarber, R. W., Nungester, W. J. y Stimpert, F. D. 1950. *Immunization stuares with irradiated tuberculosis vaccines*. Am. Rev. Tuberc. 62:418.
23. Smith, D., Grover, A. y Nungester, W. J. 1953 *Comparison of the immunizing properties of BCG, ultraviolet irradiated vaccines, and various lipid antigens in rats, mice and gunnea pigs*. Univ. of Mich. Med. Bull. 19:122.
24. Milzer, A., Levinson, S. y Lewis, M. 1950. *Immunization of mice with ultraviolet killed tuberculosis vaccine*. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 75:733.
25. Petraghani, G. 1939. *Proposal for a standard method for the preparation of tuberculin and antituberculosis vaccine*. Tubercle. 20:312.
26. Salvioli, G. degli Esposti, A., y Dina, A. M. 1952. *Resistence a la tuberculose chez les chiens vaccines par BCG et par des germs morts*. Presse Méd. 60:1508.
27. Salvioli, G. degli Esposti, A., y Dina, A. M. 1952. *Confronto sperimentale della protezione indotta dai vaccini antituberculari viventi e dai vaccine morti: esperienze sul cane protetto con il BCG (sec. Wallgren e Weill-Hallé) e con l'anatubercolina Petraghani sec. la V. P. S. e la V. D. S.)* Clin. Pediat. 34:137.
28. Monaldi, V., Verga, P., Blasi, A., y Cursi, G., 1952. *Ulteriori ricerche sperimentali sul valore vaccinale del BCG e dell' AiP*. Arch. tisiol. 7:3.
29. Dubos, R. J., Schaefer, W. B. y Pierce, C. H. 1953. *Antituberculosis immunity in mice vaccinated with killed tubercle bacilli*. J. Exper. Med. 97:221.
30. Ferguson, R. L. and Cannon, P. 1936. *The influence of local immunization of the lungs of guinea pigs upon intratracheal injection with bacillus tuberculosis H₂₇*. Am. Rev. Tuberc. 33:328.
31. Bloch, H., y Segal, W. 1955. *Viability and multiplication of vaccines in immunization against tuberculosis*. Am. Rev. Tuberc. 71:228.
32. Vallée, H. 1909. *Recherches sur l'immunisation antituberculeuse*. Ann. Inst. Pasteur, 23:585.
33. Reppin, A. 1909. *Vaccination antituberculeuse des bovidés*. Compt. rend. Acad.sc. 149:408.
34. Noguchi, H. 1909. *Über die Einwirkung von Seifen auf die Lebensfähigkeit und immunisierende Eigenschaft des Tuberkelbazillus*. Zentralbl. Bakt. (Abt. 1), 52:85.
35. Levy, E., Blumenthal, F., y Marxer, A. 1906. *Abtötung und Abschwächung von Microorganismen durch chemisch indifferente Körper*. Zentralbl. Bakt. (Abt. 1), 42:265.

36. Deycke, G. y Much, H. 1910 *Das Problem der Immunisierung gegen Tuberkulose im Meerschweinchenversuch*. Beitr. Klin. Tuberk. 25:284.
37. Dixon, S. E. 1889. *Possibility of establishing tolerance for the tubercle bacillus*. Medical News. 55:435.
38. Graucher, J., y Martin, H. 1893. *Etude sur la vaccination tuberculeuse*. Rev. tuberc. 1:289.
39. De Schweinitz, E. A. 1894. *The attenuated bacillus tuberculosis: its use in producing immunity to tuberculosis in guinea-pigs*. Medical News, 65:625.
40. Von Behring, E., Romer, P. y Ruppel, W. G. 1902. *Erläuterung der Tabellen betreffend die Abstammung und Gewinnung von Modifikationen des Tuberkulosevirus und des Tuberculosegiftes*. Beitr. exper. Therap 5:1.
41. Koch, R., Schultz, W., Neufeld, F. y Meissner, H. 1905. *Über die Immunisierung von Rindern gegen Tuberkulose*. Zschr. Hyg. u. Infektionskr., 49-51:300.
42. Klimmer, M. 1908. *Das dresdener Verfahren Rinder mit Hilfe nicht infektiöser Impfstoffe gegen die Tuberkulose zu immunisieren*. Zschr. Tiermed. 12:81.
43. Gardner, L. U. 1932. *The history of the strain of the R₁ tubercle bacilli*. Am. Rev. Tuberc. 25:577.
44. Dubos, R. J., Pierce, C. H. y Schaefer, W. B. 1953. *Antituberculous immunity induced in mice by vaccination with living cultures of attenuated tubercle bacilli*. J. Exper. Med., 97:207.
45. Steenken, W. jr., 1935. *Lysis of tubercle bacilli in vitro*. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 33:253.
46. Wells, A. Q. 1946. *The murine type of tubercle bacillus*. Med. Research Council Spec. Rep. 259, His Majesty's Stationary Office, London.
47. Wells A. Q. y Brooke, W. S. 1940. *The effect of vaccination of guinea pigs with the vole acid-fast bacillus on subsequent tuberculosis infection*. Brit. J. Exp. Path. 21:104.
48. Birkhaug, K. 1946. *Immunization with the vole bacillus; the protective value of the vole bacillus (Wells) as compared with BCG against tuberculous infection*. Am. Rev. Tuberc. 53:411.
49. Griffith, A. S. y Dalling, T. 1940. *Inoculation and immunity experiments on calves with the vole strain of acid-fast bacillus*. J. Hyg. 40:673.
50. Young, J. A. y Paterson, J. S. 1949. *Studies on the vaccination of cattle as a measure against infection with tuberculosis with the living vole acid-fast bacillus*. J. Hyg. 47:39.
51. First (Progress) Report to the Medical Research Council (Great Britain) by their Tuberculosis Vaccines Clinical Trials Committee: BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescents. Brit. Med. J. February 25, 1956, 413.
52. Calmette, A. y Guérin, C. 1909. *Sur quelques propriétés du bacille tuberculeux d'origine bovine, cultivé sur la bile de boeuf glycéinée*. Comp. rend. Acad. sc. 149:716.
53. Calmette, A. y Guérin, C. 1913. *Nouvelles recherches expérimentales sur la vaccination des bovidés contre la tuberculose et sur le sort des bacilles tuberculeux dans l'organisme des vaccinés*. Ann. Inst. Pasteur. 27:162.
54. Calmette, A., Negre, L. y Boquet, A. 1922. *Essais de vaccination du lapin et du cobaye contre l'infection tuberculeuse*. Ann. Inst. Pasteur 36:625.
55. Calmette, A., Guérin, C. Weill-Hallé, B., con la colaboración de Boquet, A. Negre, L., Wilbert, A., Leger, M. y Turpin, B. 1924. *Essais de prémunition par le BCG contre l'infection tuberculeuse de l'homme et des animaux*. Bull. Acad. méd. 91:787.
56. Sams, C. F. 1954. *Experiences in immunization against tuberculosis with BCG vaccine in Japan*. Am. J. Pub. Health. 44:903.

57. Leshchinskaya, E. N. 1946. *The immunizing value of the BCG dry glucose vaccine*. Am. Rev. Soviet Med. 3:210.
58. León, A. P., y Hernández Ch., A. 1958. *Estudios inmunológicos de vacuna BCG desecada*. Rcv. Mex. de Tuberc. y aparato resp. XIX:403.
59. León, A. P. y Bilbao, B. 1956. *Incremento de la inmunidad inducida contra la tuberculosis por el B. C. G. con vacunaciones múltiples sucesivas por vía parenteral*. Rev. Inst. Salub. y Enf. Trop., XVI, 1:1-13.
60. León, A. P. 1960. *Inmunización contra la tuberculosis con tres dosis consecutivas de B. C. G. por vía parenteral*. Primer Congreso Mexicano de Salud Pública. Memorias en prensa.
61. Calmette, A. y Guerin, C. 1914. *Contribution à l'étude de l'immunité antituberculeuse chez les bovidés*. Ann. Inst. Pasteur 28:329.
62. Klopstock, F. 1913. *Über die Wirkung des Tuberkulin auf tuberkulosefreis Meerschweinchen und den Ablauf der Tuberkulose am Tuberkulinvorbehandelten Tier*. Ztschr. exper. Path. u Therap. 13:56.
63. Trudeau, E. L. 1890. *An experimental study of preventive inoculation in tuberculosis*. M. Rec. 38:565.
64. Kleinschmidt, H. 1910. *Bildung komplementbindender Antikörper durch Fette und Lipoidkörper*. Klin. Wchschr. 47:57.
65. Negre, L. 1950. *Les lipoides dans les bacilles tuberculeux et la tuberculose*. Masson et Cie, Paris.
66. Negre, L. y Boquet, A. 1921. *Recherches sur la valeur antigene des émulsions bacillaires et des extraits éthyliques et méthyliques des bacilles tuberculeux*. Ann. Inst. Pasteur. 35:300.
67. Chucroun, N. 1947. *Tubercle bacillus antigens; biological properties of two substances isolated from paraffin oil extract of dead tubercle bacilli*. Am. Rev. Tuberc. 56:203.
68. Smith, D. W. y Kubica, G. P. 1955. *Comparison of extracts of tubercle bacilli and BCG as immunizing agents in guinea-pigs*. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 90:629.
70. Weis, D. W. y Dubos, R. J., 1956. *Antituberculous immunity by methanol extracts of tubercle bacilli. Its enhancement by adjuvants*. J. Exper. Med. 103:73.
71. Negre, L. y Boquet, A. 1921. loc. cit.
72. Raffel, S. 1946. *The relationship of acquired resistance, allergy antibodies and tissue reactivities to the components of the tubercle bacillus*. Am. Rev. Tuberc. 54:564.