

Sobre la "Hemoglobinuria de los bovinos". Poder patógeno de *Bacillus sp.*

Por A. Sordelli y J. Ferrari

(SEGUNDA MEMORIA)

Desde el comienzo de nuestros estudios pudimos comprobar que el germen designado por nosotros como *Bacillus sp.* era en inyección intramuscular patógeno para la cobaya. (Ver página 801).

El estudio sistemático de las propiedades patógenas será tema de esta memoria, en la que nos ocuparemos además de sus variaciones, de las toxinas producidas por los cultivos de las dos cepas 10 y 14 de *Bacillus sp.*

I

Poder patógeno.

a) Ambas cepas son patógenas, de virulencia semejante y producen lesiones iguales.

1) Cultivo en caldo Tarozzi glucosado de 24 horas de incubación a 37°. Inocúlase a cobaya por vía intramuscular en la dosis de 0.5 cm.³.

B. sp. 10 cobaya 555 + en 40 horas

B. sp. 14 „ 503 + en 25 „

2) Cultivo en caldo con trozos de hígado. (Tarozzi con hígado en sustitución de la carne).

B. sp. 10 cobaya 338 + en 30 horas

B. sp. 14 „ 396 + en 20 „

En todos los animales inoculados las lesiones locales y las alteraciones macroscópicas de los órganos, son iguales. (Ver el estudio anátomo patológico).

b) Ambas cepas tienen en el organismo infectado igual morfología y distribución.

En la lesión local de animales recién muertos se observan gérmenes de dimensiones y aspectos iguales a los vistos en las lesiones hepáticas del bovino.

Una diferencia la constituye la falta de esporulación de los gérmenes en la mayor parte de las cobayas; en algunos ésta aparece esbozada y bien manifiesta en otros. No se ha podido aún establecer cuáles son las causas que determinan esta diferencia.

En los preparados de parénquima de órganos, bazo-hígado, no se observan gérmenes. En cambio es frecuente observarlos en la superficie del hígado como bacterias típicas solas o de a pares, sin esporular y con un halo que hace sospechar la existencia de cápsula. No se observan cadenas largas ni filamentos. En los animales sacrificados o recién muertos no se ven gérmenes en la superficie del hígado.

En los preparados de sangre no aparecen bacterias. La hemocultura es a veces positiva.

Variación del poder patógeno. Influencia de la acidez del medio

En las páginas anteriores hemos referido la influencia de la acidez del medio sobre el desarrollo y visto que el óptimo correspondía al medio de pH 6.

La acción patógena de los cultivos de distintos pH es paralela al desarrollo, como puede apreciarse por el protocolo que sigue.

Cultivo de 20 horas en caldo con peptona P. Davis esterilizado bajo parafina y vaselina.

El poder patógeno se prueba por inoculación de 0.5 cm.³ por vía intramuscular al cobaya.

pH del medio	<i>B. sp. 10</i>		<i>B. sp. 14</i>	
	Cobaya	Tiempo de muerte	Cobaya	Tiempo de muerte
5.90	577	15 horas	590	17 horas
6.40	571	15 „	593	12 „
6.8	545	30 „	547	22 „
7.2	549	22 „	575	30 „
7.8	597	Sobrevive	555	30 „

Poder patógeno en medios de cultivo diferentes.

1ª experiencia.

Son preparados los siguientes medios:

Medio I. Al agua de carne se agrega 2 % de peptona P y Davis, 5 % de Cl Na; este medio sin alcalinizar es esterilizado bajo capa de parafina, a 120° 20'. Antes de sembrar se le agrega 30 % de extracto de hígado (pH 6).

Medio II. Igual al caldo I sin adición de extracto de hígado (pH 6).

Medio III. Caldo II al que se añade 1 % de glucosa después de esterilizar (pH 6).

Se siembran estos medios con un cultivo de *B. sp. 14* de 24 horas, en caldo II.

Al cabo de 14 horas a 37° el desarrollo es muy intenso y determinado por opacidad da las siguientes cifras:

Medio I	15.000 millones por cm. ³
Medio II	10.000 „ „ „
Medio III	25.000 „ „ „

En el cuadro siguiente están protocolizados los resultados de la determinación del poder patógeno, a las 14, 24, 48 y 72 horas.

PODER PATÓGENO EN TIEMPOS DISTINTOS DE CULTIVO

DETERMINACIÓN DEL PODER PATÓGENO DEL CULTIVO DE *B. sp. 14* EN CALDOS I, II, III*El cultivo es suspendido en caldo II (pH 6); el volumen total inyectado es de 1 cm.³; inoculación intramuscular*

	CULTIVO DE 14 HORAS			CULTIVO DE 24 HORAS			CULTIVO DE 48 HORAS			CULTIVO DE 72 HORAS		
	Dosis	Cobaya	Peso y resultado	Dosis	Cobaya	Peso y resultado	Dosis	Cobaya	Peso y resultado	Dosis	Cobaya	Peso y resultado
Caldo I	0.05	560	280 grs. edema no muere	0.05	546	260 + 20 hrs.				0.05	673	200 grs. 0
	0.1	591	280 + 14 hrs.	0.1	516	240 + 48 hrs.				0.1	607	260 „ 0
	0.2	507	260 + en la noche de la inoculación	0.2	512	250 + 36 hrs.	0.2	700	200 grs. + en la noche de la inoculación	0.2	685	280 „ 0
Caldo II	0.05	513	260 grs. edema no muere	0.05	572	240 + 36 hrs.						
	0.1	509	250 grs. edema no muere	0.1	526	260 edema no muere						
	0.2	531	280 g. + 36 h.	0.2	509	250 + 20 hrs.	0.2	655	210 + en 36 h.			
Caldo III	0.05	522	240 grs. edema no muere	0.05	570	260 poco edema no muere						
	0.1	R	270 edema no muere	0.1	564	270 edema no muere						
	0.2	539	280 + en la noche de la inoculación	0.2	510	260 grs. edema + a las 48 hrs.	0.2	699	260 poco edema no muere			

Los cultivos en medio II (caldo simple) y en medio I (caldo II con extracto de hígado) tienen un poder patógeno semejante.

En el medio III (caldo glucosado) en el que hay gran desarrollo, *B. sp.* 14 revela un poder patógeno menor y que desaparece más rápidamente. Probablemente el tiempo mínimo de observación 14 horas es ya demasiado largo para este medio, en el que el desarrollo tan abundante revela un crecimiento muy rápido. La acidificación mayor de este medio puede ser causa de la atenuación rápida del poder patógeno.

El tiempo de incubación óptimo para el medio I está comprendido entre 14 y 48 horas. Como cada dosis ha sido determinada en un solo animal es muy difícil sacar conclusiones definitivas.

En 72 horas la atenuación es muy marcada.

En el medio III la atenuación es rápida y se puede apreciar ya a las 24 horas. En 48 horas el poder patógeno es escaso.

*
* *

2ª experiencia.

Medio IV. Igual al medio III (pH 6).

Medio V. Igual al medio I (pH 6.4).

Medio VI. Medio II, al que se agrega 20 % de trozos de hígado cocido y extraído (pH 6.4).

Medio VII. Medio I al que se agrega 20 % de carne molida, cocida y extraída (pH 6.4).

Se siembran estos caldos con un cultivo de 14 horas de *B. sp.* 14. A las 14 y a las 48 horas se determina el poder patógeno. Los resultados que pueden verse en el siguiente protocolo, revelan que en los caldos 5 y 6 el poder patógeno es más elevado y que se conserva por más tiempo.

	CULTIVO DE 14 HORAS		
	Dosis cm. ³	Cobaya	Peso
Caldo IV	0.05	R	260 grm. 0
	0.1	648	250 ed. + en 72 horas
Caldo V	0.05	663	250 gr. ed. no muere
	0.1	691	250 gr. + 22 horas
Caldo VI	0.05	689	200 gr. ed. + en 32 horas
	0.1	604	260 gr. ed. + en 40 horas
Caldo VII	0.05	666	260 ed. no muere
	0.1	603	260 gr. ed. + en 23 horas

Julio, 1930

A. SORDELLI Y J. FERRARI

823

CULTIVO DE 48 HORAS		
Dosis	Cobaya	Peso
0.1	342	240 gr. 0
0.1	644	260 ed. + 14 horas
0.1	524	260 ed. + 14 horas
0.1	545	260 ed. no muere

Poder patógeno para el bovino. Reproducción experimental de la enfermedad por inoculación (1).

El cultivo en caldo de *B. sp.* 14 ha revelado poseer un alto poder patógeno para el bovino inoculado por vía muscular y por vía hepática.

1ª experiencia.

De un cultivo de 14 horas en caldo extracto de hígado (medio I) de *B. sp.* 14 se inoculan 10 cm.³ en la masa muscular de la pata izquierda de un bovino de 200 kilogramos. La D. M. M. del cultivo inyectado era para la cobaya de 0.10 cm.³.

La región inoculada se pone tumefacta y dolorosa. La temperatura se eleva, el animal está enfermo evidentemente; el número de glóbulos rojos disminuye. Al tercer día la fiebre ha desaparecido y el animal comienza a reponerse. En el mismo animal, en la masa muscular de la pata derecha se inyectan 26 cm.³ de un cultivo igual al anteriormente inoculado. Se producen fenómenos semejantes aunque más intensos que con la otra inyección. Aparece hemoglobinuria y el animal a las 60 horas de esta segunda inyección muere. En el sitio de 1ª y 2ª inoculación se observa un regular número de bacterias semejantes a las vistas en el hígado. Difieren en la escasa esporulación. En el músculo sano contiguo a la lesión se encuentran poquísimas bacterias. La esporulación apenas aumenta dejando al músculo a temperatura ambiente y a 37°. No han sido observados gérmenes ni en la superficie del hígado ni en el parénquima del bazo y del riñón, (observación hecha tres horas después de la muerte).

Los cultivos de la lesión local, tanto de la primera como de la segunda inoculación contienen *B. sp.* 14. Los cultivos de hígado, bazo y de sangre permanecen estériles.

2ª experiencia.

Bovino inoculado en el músculo de la pata con una mezcla de 15 cm.³ de cultivo en medio 1, y 15 cm.³ de cultivo en

* (1): Estas experiencias que sólo mencionamos al pasar en esta memoria, fueron realizadas en colaboración con los doctores Juan A. Zuccarini y Miguel Kuhn, quienes realizan el estudio anátomo-patológico.

medio VI. La enfermedad tiene un curso uniforme que determina la muerte del animal al cabo de 72 horas.

La hemoglobinuria fué más intensa y las lesiones macroscópicas locales y generales muy marcadas.

3ª experiencia.

Se mezclan partes iguales de cultivos de *B. sp. 14* en caldo I y caldo VI. Se centrifugan 30 cm.³ y el residuo suspendido en 10 cm.³ del caldo sobrenadante se inocula en el hígado de un bovino de 200 kilogramos; el curso de la enfermedad es muy rápido y en 62 horas el animal sucumbe. La lesión hepática es macroscópicamente idéntica a las observadas en la enfermedad natural. El examen bacteriológico fué practicado tres horas después de la muerte del animal.

En la lesión hepática se ven gérmenes típicos; llama la atención la escasísima esporulación. Dejando el material a temperatura ambiente durante la noche se observa un escaso número de esporangios. En los preparados de la superficie del hígado no se hallaron gérmenes. Igual aconteció con la sangre del corazón.

Con siembra del material de la lesión hepática se obtiene un cultivo de *B. sp. 14*, contaminado con un germen filamentosos, granuloso, delgado que no toma el Gram, y ya visto en un cultivo de material de la enfermedad natural. Por siembra de sangre de corazón se obtiene un cultivo de *B. sp. 14* y de un estreptococo de cadenas largas. (No es hemolítico ni viridans).

II

PROPIEDADES TOXIGÉNICAS DE *Bacillus sp. 14*

Medio y tiempo de incubación óptimos para la producción de toxinas.

Se emplean los medios de cultivos I, II, III, ya usados en la investigación del poder patógeno. Se estudia la acción tóxica de los filtrados de cultivos de *B. sp. 14* en estos medios a las 14, 24 y 48 horas. Con el objeto de averiguar la existencia de toxinas agudas fueron inoculados cobayas por vía venosa.

TOXINA AGUDA PARA COBAYAS DE CULTIVO *B. sp. 14* EN CALDO I, II Y III FILTRADO POR L 3

Via venosa a cobayas

CULTIVO DE 14 HORAS	CULTIVO DE 24 HORAS	CULTIVO DE 48 HORAS
20-VIII		
<i>Caldo I</i>		
2 cm. ³ 542 — + 20'
1 cm. ³ 508 — + 38'
0.5 cm. ³ 532 — + 2 horas	0.50 582 — + 1.30 horas
0.25 cm. ³ 652 — + 1.10 horas	0.25 698 — + 2.15 horas	0.25 — 683 — 00
<i>Caldo II</i>		
2 cm. ³ 527 — + 30'
1 cm. ³ 553 — + 40''
0.5 cm. ³ 521 — + 50''	0.50 660 — + 2 horas
0.25 cm. ³ 602 — + 45'	0.25 584 — + 1.30 horas	0.25 — 674 — 00
<i>Caldo III</i>		
2 cm. ³ 581 — + 38'
1 cm. ³ 536 — + 50'
0.5 cm. ³ 583 — + 1 hora	0.50 628 — + en la noche
0.25 cm. ³ 676 — + 1.10 horas	0.25 650 — + en la noche	0.25 — 661 — 00

TOXINA CON INCUBACIÓN PARA COBAYA, DE CULTIVO *B. sp.* 14 EN CALDO I, II Y III FILTRADO POR L 3

Intramuscular en cobayas completado a 1 cm.³, con caldo pH 6

CULTIVO 14 HORAS	CULTIVO 24 HORAS	CULTIVO DE 48 HORAS
20-VIII		21-VIII
<i>Caldo I</i>		
0.25 cm. ³ 578 p. ed. p. ed. 22	0.25 cm. ³ 624 g. ed. g. ed. 22
0.50 cm. ³ 558 g. ed. ed. + en la noche	0.5 cm. ³ 638 g. ed. g. ed. 22
1 cm. ³ 565 muerto en la noche	1 cm. ³ 687 + en la mañana	1 cm. ³ 646 00
<i>Caldo II</i>		
0.25 cm. ³ 592 g. ed. ed. 22	0.25 cm. ³ 651 g. ed. ed. 22
0.50 cm. ³ 534 g. ed. g. ed. 22	0.5 cm. ³ 620 g. ed. g. ed. 22
1 cm. ³ 529 g. ed. + en la noche $\frac{21}{22}$	1 cm. ³ 694 g. ed. + en la noche $\frac{21}{22}$	1 cm. ³ 616 00
<i>Caldo III</i>		
0.25 cm. ³ 519 g. ed. ed. 22	0.25 cm. ³ 680 ed. 0 22
0.5 cm. ³ 540 + en la noche	0.50 cm. ³ 518 ed. p. ed. 22
1 cm. ³ 562 + en la noche	1 cm. ³ 599 ed. ed. 22	1 cm. ³ 668 00

En los tres medios de cultivo se han formado sustancias tóxicas de actividad comparable. El tiempo óptimo de incubación es inferior a 24 horas. A las 48 horas hay una atenuación muy grande. La elección del caldo II para la obtención de la toxina fué determinado por la simplicidad de su preparación, la menor cantidad de sustancias precipitadas por $\text{SO}_4 \text{Am}_2$ y la mayor estabilidad de la toxina dentro de las 24 horas, comparada con los caldos I y III.

La toxina no tiene las características de las toxinas agudas de algunos gérmenes de la gangrena gaseosa, pues 10 veces la dosis que produce la muerte en 45', apenas acorta el tiempo de incubación a 30'. La actividad de la toxina inyectada por vía venosa es mucho mayor que por vía muscular.

Formación de toxinas in vivo.

En la masa muscular del bovino muerto por la infección experimental, fué obtenido un extracto que filtrado por bujía Berkefeld poseía propiedades tóxicas para la cobaya; al mismo tiempo manifestó una intensa acción hemotóxica.

Sensibilidad de diversas especies.

La sensibilidad de especies distintas a la toxina producida por *B. sp.* fué investigada valiéndonos de una toxina precipitada cuya estabilidad permite la comparación con exactitud mayor. La toxina fué obtenida por siembra de caldo II con un cultivo de 48 horas de *B. sp.* 14 incubado por 14 horas a 37°, alcalinizado a pH 7.5 con NaOH, filtrado por papel y bujía Berkefeld y precipitado por sulfato de amonio a saturación. De 2 litros de cultivo se obtienen 10 grs. de toxina. Se designa en los protocolos como toxina I. ⁽¹⁾.

(1) La toxina tiene acción hemotóxica sobre glóbulos rojos de vaca, oveja, conejo, cobaya, rata, etc.

SENSIBILIDAD DE LA COBAYA INOCULADA POR VÍAS DISTINTAS

Via venosa

Cobaya	Peso	Dosis	Resultado
622	250	0.02	+ en 30'
643	250	0.01	+ en 35'
630	260	0.005	+ en 1 hora 15'
696	270	0.005	+ en 1 hora 10'
670	250	0.0025	+ en la noche
587	250	0.0025	+ en la noche
513	260	0.0020	+ en la noche
570	250	0.0015	+ en la noche
625	260	0.00125	+ en la noche
511	260	0.0012	No muere en dos días
581	260	0.0008	No muere en dos días
598	250	0.0006	No muere en dos días

Via intramuscular

Cobaya	Peso	Dosis	Resultado
636	270	0.20	+ en la noche
632	260	0.10	g. edema + en 48 horas
621	270	0.05	g. edema no muere
619	250	0.04	g. edema + en 48 horas
645	240	0.025	ed. no muere (escara)
688	260	0.02	ed. no muere (escara)
601	250	0.01	ed. no muere (escara)
633	260	0.005	ed. no muere
681	230	0.0025	poco edema, no muere

Vía peritoneal

Cobaya	Peso	Dosis	Resultado
644	260	0.02	+ en 24 horas
610	250	0.04	no muere
626	260	0.02	+ en la noche
671	250	0.02	+ en la noche
609	280	0.01	+ en 24 horas
634	260	0.01	no muere
682	240	0.01	no muere
624	220	0.005	+ en la noche
639	260	0.005	+ en la noche

La sensibilidad de la cobaya inoculada por vía venosa con la toxina precipitada es mucho mayor que inyectada por vía muscular. La relación es de 30 a 1 aproximadamente.

En cuanto a la vía peritoneal es evidente ante todo la irregularidad de la muerte, pero al mismo tiempo es cierto también que en algunos casos la sensibilidad es elevada. Puede tratarse de una sensibilidad excepcional o más probablemente de una absorción diferente.

Sensibilidad de distintas especies inyectadas con toxina por vía venosa

LAUCHA — Se inyectan en una vena de la cola, animales de 20 grs. de peso

Dosis	Resultados
0.002	+ en 1 h. 30'
0.0005	+ en 2 horas
0.0005	+ en la noche
0.0001	+ en la noche
0.00008	+ en 21 horas
0.00006	no muere

CONEJO — Se inyectan en la vena marginal de la oreja, animales de 1 kg. de peso.

Dosis	Resultados
0.020	+ en 1 hora
0.010	+ en la noche
0.005	+ en la noche
0.0025	no muere

RATA — Se inyectan en una vena de la cola, animales de 120 grs. de peso

Dosis	Resultados
0.005	+ en la noche
0.0025	+ en la noche
0.001	+ en 20 horas
0.0007	+ en la noche
0.0005	no muere
0.00025	no muere

PALOMA — Se inyectan en la vena axilar, animales de 300 grs. de peso

Dosis	Resultados
0.01	+ en la noche
0.055	+ en la noche
0.0025	no muere
0.001	no muere

Oveja.

Una oveja de 30 kilogramos de peso fué inyectada con 0.200 grs. de toxina y a las 24 horas con 0.400. El animal muestra apenas signos de enfermedad; no sucumbe a la intoxicación.

La sensibilidad del bovino a la intoxicación ha sido objeto de un estudio realizado por el señor J. Zuccarini y aparece en una memoria separada como asimismo las alteraciones hemáticas provocadas en otras especies por dosis subletales de toxina.

INVESTIGACIÓN DE LA ACCIÓN AGUDA DE LA TOXINA EN EL PERRO (*)

Perro de 7,15 kilogramos de peso. Se prepara el animal anestesiado con cloralosa, por vía intravenosa, registrándose gráficamente la presión arterial y la respiración. La toxina se empleó por vía intravenosa y en solución acuosa al 1 %. Se inyectaron dosis de 2.5, 3.5 y 75 mgs. sucesivamente, comprobándose la ausencia de efectos vasculares o cardíacos y respira-

(*) Llevada a cabo por A. Torino.

terios durante 4 horas posteriores a la inyección. La acción hemotóxica es muy intensa, pues en el suero se encontraba disuelta hemoglobina en la proporción del 33 % del total.

Sobre la presión arterial del conejo, tampoco se producen modificaciones con la dosis de 1.5 mgs. de toxina por kg. de peso y por vía intravenosa.

La sensibilidad de los animales inoculados por vía venosa puede ser apreciada en la siguiente tabla, en que se expresa la dosis mínima por animal y por gramo de peso.

Especie	Peso	Dosis mortal mínima por animal
Laucha	20 gramos	0.00008
Rata	120 „	0.0007
Cobaya	250 „	0.00125
Conejo	1.000 „	0.005
Paloma	300 „	0.005

Sensibilidad por gramo de peso

Laucha	0.000004
Rata	0.000006
Cobaya	0.000004
Conejo	0.000005
Paloma	0.000017

Es digna de notar la proximidad de los valores de la D. M. por gramo de peso para la laucha, rata, cobaya y conejo.

*
* *

El aspecto macroscópico de las lesiones producidas por la toxina puede ser resumido en la siguiente forma.

Cobaya por vía venosa. — Fenómenos congestivos generales y más marcados en las vísceras. A veces derrame hemorrágico en el peritoneo. Congestión intensa de la medular suprarrenal. Las zonas contiguas al riñón aparecen conges-

tionadas y a veces hemorrágicas. Congestión pulmonar con focos hemorrágicos. El color de los pulmones es gris violáceo en el momento de la autopsia; al cabo de un rato el color se pone rutilante. Hay manifiesta hemolisis. Rara vez aparece la orina tinta de sangre. Es frecuente la hemorragia nasal.

Cobaya por vía muscular. — Gran edema en el lugar de la inoculación y en el tejido subcutáneo, de color cereza. Las alteraciones viscerales asemejan las de la inyección venosa.

Cobaya por vía peritoneal. — Exudado hemorrágico en el peritoneo. Demás alteraciones iguales a las de la vía venosa. A éstas hay que agregar una congestión hemorrágica intensa de los pulmones y muy abundante derrame pleural tinto en sangre.

Conejo por vía venosa. — Derrame hemorrágico en la cavidad peritoneal. Bazo con focos hemorrágicos. Congestión renal intensa. Hígado congestivo y friable. Vejiga con orina roja vinosa. Hemoglobinuria.

Laucha por vía venosa. — Hemorragia en estómago. Contenido intestinal hemorrágico. Congestión intensa de bazo y riñón. Hemorragias pulmonares. Vejiga con sangre hemolizada. Hemoglobinuria.

Influencia de la toxina sobre el poder patógeno de los gérmenes.

La existencia de una toxina que reproduce las lesiones determinadas por la infección experimental y que puede, por lo tanto, permitir explicar la mayor parte de los síntomas y alteraciones anatómicas, nos indujo a investigar si los gérmenes desprovistos de toxina tienen poder patógeno o si la toxina es capaz de facilitar la infección. Se hicieron dos series de experimentos, una con formas vegetativas y otra con esporas.

a) *Acción de la toxina sobre la infección con formas vegetativas.*

10 cm.³ de un cultivo de *B. sp.* de 14 horas en caldo V se alcaliniza hasta pH, 7.5, se centrifuga y se suspende el residuo en 10 cm.³ de caldo estéril de pH 6.7. Esta emulsión de bacilos sin toxina se inocula por vía muscular sola y mezclada con una solución de toxina seca.

Dosis de emulsión de bacilos	Dosis de toxina	Resultado
0.2	0.0	00
0.1	0.0	00
0.05	0.0	00
0.2	0.005	+ en 23 horas con lesiones típicas
0.2	0.002	+ en 52 horas con lesiones típicas
0.1	0.005	+ en 24 horas con lesiones típicas
0.1	0.002	+ en 32 horas con lesiones típicas
0.5	0.005	+ en 40 horas con lesiones típicas
0.05	0.002	Gran edema, no muere
0.00	0.005	Poco edema
0.00	0.002	Poco edema

En todos los animales muertos fué posible constatar la presencia de bacilos típicos.

b) *Acción de la toxina sobre la infección con esporos.*

Un cultivo total en caldo Tarozzi de 2 días a 37° y 8 días a temperatura ambiente, filtrado por algodón, es alcalinizado a pH 7.5 y centrifugado. El residuo es suspendido en un volumen igual al primitivo de caldo de pH 6 y calentado durante 1' a 100°. Se repite una experiencia análoga a la anterior.

Dosis de emulsión de esporos	Dosis de toxina	Resultado
0.5	0.0	00
1.0	0.0	00
0.5	0.005	Poco edema, no muere
0.5	0.0025	Poco edema, no muere
1 c. c.	0.005	+ en 48 horas con lesión típica
1 c. c.	0.0025	+ en 72 horas con lesión típica

Es evidente que la influencia de la toxina es decisiva para la invasión por el germen. Quedaría por demostrar si otras sustancias específicas distintas de la toxina son capaces de determinar la infección o si otras acciones no específicas tienen algún rol importante.