

Medio de cultivo para el *Streptobacilo* de Ducrey

Por NÉSTOR MORALES VILLAZÓN
y RICARDO A. MARGNI

Hasta el año 1944 la Sección Vacunas Bacterianas del Instituto Bacteriológico "Malbrán", contaba con algunas cepas del germen productor del chanero blando; unas procedían de laboratorios extranjeros, y otras habían sido aisladas en el país. La última partida de vacuna con un total de 1400 dosis, se elaboró el 10 de diciembre del citado año. Debido a un accidente de laboratorio se perdió la colección. Desde entonces no fué posible conseguir nuevos cultivos, pues los que se remitieron desde distintos Institutos extranjeros, nunca desarrollaron en los transplantes.

El actual Director, Dr. Enrique Savino, interesado en que se remediara una falta difícil de justificar en un establecimiento de la categoría del nuestro, encargó al Dr. Juan Carlos Ferrario, que en cumplimiento de una misión científica visitaba el Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro, procurara conseguir alguna cepa, la que nos fué entregada el 5 de noviembre del año próximo pasado. Nuestro agradecimiento a tan distinguidos profesionales.

Recibimos dos tubos cuyos rótulos decían: "Bacilo de Ducrey, cepa Sordelli".

Desde el primer momento nos llamó la atención que el medio que se había utilizado para dichos cultivos, fuera de color rojo oscuro, muy distinto al que caracteriza al agar sangre ordinario. Preguntamos al Dr. Julio César Escudero, antiguo y competente técnico de la Sección, en qué forma se habían hecho las resiembras anteriores, y nos informó que en agar sangre de conejo al 20 por ciento. Pensamos entonces que quizá ésta era la causa de los repetidos fracasos sufridos y que el medio utilizado no fuera conveniente, y suponiendo que el precedente de Río de Janeiro había sido calentado, actuamos como sigue: tubos con agar licuado y a 45°C se mezclaron con sangre desfibrinada de conejo en la proporción del 20 por ciento; en seguida se les colocó en el baño de maría a 56°C por media hora. Incluidos, se dejaron enfriar. Los repiques efectuados en este medio desarrollaron bien. Posteriormente daremos los detalles de la experiencia.

Presentado en la reunión de comunicaciones del 2 de noviembre de 1948.

Historia: Se debe al médico italiano Ducrey el descubrimiento de este germen, y el resultado de sus investigaciones fué comunicado al Congreso de Dermatología y Sifilografía reunido en París (Compt. rend., 1890, 229, París). Desde aquella fecha, algunos bacteriólogos se han ocupado de su estudio, aunque el número es relativamente escaso, lo que le permite afirmar a Romero D'Cunha (1943), que durante el último medio siglo poco o nada se ha progresado en su conocimiento.

Lugar en la sistemática: Hasta época reciente al bacilo de Ducrey, se lo consideraba como integrante del género *Hemophilus*. Bergey, en las distintas ediciones del "Manual of Determinative Bacteriology", lo incluye en él, y divide al género en aerobios y anaerobios, designándoles, respectivamente, con los nombres de *Hemophilus* y *Dialister*. A los primeros, que por el momento son los únicos que nos interesan, los subdivide en la siguiente forma:

A) — Los que afectan al aparato respiratorio: 1) *Hemophilus influenzae*. 2) *Hemophilus hemoliticus*. 3) *Hemophilus pertusis*.

B) — Los que atacan la conjuntiva: 1) *Hemophilus conjunctivitis*. 2) *Hemophilus lacunatus*.

C) — Los que infectan el aparato genital: 1) *Hemophilus ducrey*. 2) *Hemophilus canis*. 3) *Hemophilus melaninogénicus*.

A los gérmenes de la lista anterior, en la última edición de la citada obra, añade los siguientes: *Hemophilus suis* y *para-influenzae* al primer grupo, y *Hemophilus duplex* al segundo.

En época reciente varios autores, teniendo en cuenta que el bacilo de Ducrey puede desarrollar en ausencia de los factores X y V, indispensables para los *Hemophilus*, le colocan en grupo independiente junto con el *Morax Axenfeld*, *pneumosintes*, *granulosis*, *monocitógenos*, *alcaligenes*, *bartonella*, *epirythrozon* y *grahamella*. Este conjunto mal delimitado y al que Topley y Wilson (1936) designan con el calificativo de *Micelánea*, posiblemente con nuevas investigaciones recibirá el lugar definitivo que le corresponde en la sistemática.

Cultivos: Istamanoff y Aspianz (1897) dicen haber obtenido por primera vez cultivos puros del bacilo de Ducrey utilizando agar con sangre humana pulverizada; Lenglet (1901) llega al mismo resultado con agar peptonado y sangre humana. Teague y Deibert (1922) aconsejan el medio que lleva su nombre, que se prepara como sigue: sangre de conejo tomada por punción cardíaca se distribuye en tubos pequeños a razón de un centímetro cúbico por tubo. Se deja coagular y se calienta al baño de maría a 56°C por cinco minutos. Algunos investigadores creen que este medio es excelente para aislar el germen de la lesión primaria, y entre ellos Quiroga, Miravent y

Sosa (1926), que dicen haber obtenido un cien por ciento de resultados felices, opinión compartida por D'Amico (1937). Pero hay otros como Assi (1926), Brams (1924) y Saelhof (1924) quienes afirman que carece de todo valor. Romero D'Cunha, que le ha utilizado en gran número de enfermos, declara que sobre cincuenta, en los que ha recurrido al Teague y Deibert, no consiguió ni un solo caso positivo.

Para lograrlo puro, es bastante más fácil recurrir a las adenitis que habitualmente complican al chanero blando, o bien, de no ser esto posible, provocando por autoinoculación del pus, un absceso de cuyo contenido es casi seguro que se lo podrá aislar. Con esta técnica, Lenglet (1898), Fischer (1903), Lipschutz (1905), Ito (1913), Nicolle (1923), Reenstierna (1923), Nicolau y Banciú (1924), Frei y colaboradores (1932) y Maxinowa (1936), han conseguido resultados altamente satisfactorios.

Partiendo del material arriba indicado, el porcentaje de casos positivos fué el siguiente: Banciú, D'Amico, Sanderson, Greeblat, en fisiológica peptonizada con veinte por ciento de sangre humana desfibrinada, 69 veces sobre 104 casos; Bezancon, Griffon y Lesourd, usando agar con sangre desfibrinada de conejo, equina o humana, el 30 por ciento; Maxinowa y Moor, el 8 por ciento, empleando en sus experiencias suero inactivado de conejo o caldo con sangre humana.

Romero D'Cunha, con idéntico fin, aconseja la siguiente fórmula: agar al 3 por ciento en caldo hígado de bovino con glucosa y peptona al 1 %, y al que, en el momento de usar, añade 50 % de sangre desfibrinada de caballo.

Medios de cultivo: Anteriormente hemos dado la fórmula de varios de los habitualmente utilizados, a los que podemos añadir los que a continuación se mencionan: suero inactivado de conejo, caldo con agar sangre, caldo Martín con 20 por ciento de sangre desfibrinada de conejo, y el medio de Romero D'Cunha que se prepara como sigue:

A) — Se mezclan dos partes de hígado de bovino en trozos, con una de agua destilada; baño de maría a 50°C por media hora. Se filtra por trapo y se añade 1 % de peptona, de preferencia proteosa peptona Difco. Colorimétricamente y con solución normal de hidróxido de sodio se ajusta a pH 7,6. Hervir a fuego lento por algunos minutos, filtrar por papel y distribuir en balones y tubos. Esterilizar al autoclave por veinte minutos a 110°C.

B) — A una parte de glicerina Merck esterilizada, se añaden dos partes de sangre desfibrinada de bovino tomada asépticamente por punción venosa. Se puede conservar indefinidamente en la heladera, pero sólo se usará después de ocho días, para permitir la lisis total de los glóbulos.

En el momento de empleo, se añade a (A) un 1 por ciento de sangre glicerinada.

Ya hemos indicado en otro punto que, al recibir la cepa de Ducrey, nos llamó la atención el color rojo oscuro del medio de cultivo, y, sospechando que previamente hubiera sido calentado, procedimos así: tubos con agar licuado y a la temperatura de 45°C recibieron por cada cinco centímetros cúbicos de medio, uno de sangre desfibrinada de conejo. Se calentaron a baño de maría a 56°C por treinta minutos, se dejaron enfriar a 42°C, y procurando homogeneizar lo mejor posible la mezcla, se les hizo solidificar inclinados.

Los transplantes se hicieron abundantemente en los medios más abajo citados, y la lectura, después de 48 horas en la estufa a 37°C.

Cepa utilizada "Sordelli"	Medios de cultivo empleados		
	Agar sangre	Medio de Teague y Deibert	Agar sangre calentado
Desarrollo observado	Muy escaso	Nulo	Abundante

No dejó de sorprendernos el resultado que antecede, tanto más, que nuestra confianza en el Teague y Deibert era absoluta, pero tenía la ventaja de explicarnos el motivo de los fracasos anteriores. Era indudable que el calentamiento había introducido un nuevo factor, que actuaba haciendo fértiles medios que en otras condiciones no lo eran. Las muchas veces que especímenes de Ducrey recibidos de diferentes Institutos habían fracasado en las resiembras, no tenía interpretación racional, particularmente si se piensa que el germen es poco exigente respecto a la temperatura, y su vitalidad en los medios artificiales es bastante prolongada.

El éxito obtenido con el agar sangre calentado nos hizo sospechar que, posiblemente, la temperatura actuaba destruyendo el complemento, al que suponíamos dotado de una acción inhibitoria, presunción no confirmada por los estudios posteriores, que demostraron que se podían obtener buenos cultivos en suero, en el que aquel elemento no fué eliminado.

Para mayor seguridad empezamos por repetir la experiencia anterior. Nuevas siembras en agar sangre, agar sangre calentado y medio de Teague y Deibert, dieron resultados absolutamente iguales, en vista de lo cual se imponía buscar la fracción de la sangre que obraba como elemento fertilizante. Con este fin se prepararon los siguientes medios, todos a base de agar, al que se le adicionó plasma, glóbulos lavados, suero, sangre total desfibrinada, sangre total sin desfibrinar, sangre citratada y lisado hemático. Las siembras fueron

abundantes y por duplicado. La lectura se hizo después de 24 y 48 horas de permanencia en estufa a 36°C, y los resultados se consignan en el Cuadro que sigue:

	<u>24 horas</u>	<u>48 horas</u>
Agar plasma	+	+
Agar glóbulos rojos lavados	±	±
Agar suero	+	+
Agar sangre total desfibrinada	+	+
Agar sangre total sin desfibrinar	0	0
Agar sangre total citratada	0	0
Agar lisado hemático	++	+++

(Los signos se interpretarán como sigue: 0 desarrollo nulo, ± dudoso, + desarrollo bastante escaso, ++ desarrollo algo más abundante, +++ desarrollo abundante).

Esta experiencia demostró un hecho significativo: en todos los casos en que se usaba sangre sometida a un proceso de agitación mecánica, los cultivos, si bien poco abundantes, fueron evidentes, mientras que aquellos en los cuales se evitó la destrucción de los hematíes, el resultado fué nulo; y por último, que, añadiendo al medio sangre lisada, se conseguían óptimos resultados.

Para aclarar cualquier duda y determinar al mismo tiempo la cantidad de sangre que se debía usar, se hizo el siguiente ensayo:

Cinco tubos conteniendo cada uno diez mililitros de agua destilada estéril, recibieron: un mililitro de sangre desfibrinada de conejo, el primero; dos el segundo, y así sucesivamente hasta el último, al que se le añadió cinco mililitros. Baño de maría por media hora a 56°C. Luego, se tomó un mililitro de cada mezcla y se añadió a un número igual de tubos con cinco mililitros de agar licuado a 45°C. Inclinados se dejaron enfriar. Se sembraron abundantemente con bacilo de Ducrey, y después de 48 horas de permanencia en estufa a 36°C se comprobó que había desarrollo igualmente copioso en cualquiera de ellos. Dos conclusiones se podían sacar del precedente ensayo: 1º, que el lisado obra como activador del cultivo; y 2º, que un aumento en la cantidad de sangre utilizada no tiene acción inhibitoria.

Preparación del lisado: En vista de estos hechos resolvimos preparar un lisado que no sólo fuera eficaz, sino que pudiera usarse en cualquier momento; se procedió como sigue: en un frasco con tapa esmerilada conteniendo 100 mililitros de agua destilada estéril, se vierten 50 mililitros de sangre de conejo tomada por punción cardíaca y previamente desfibrinada; se agita suavemente evitando hacer espuma y se calienta por treinta minutos en el baño de maría a 56°C. Durante este tiempo hay que remover una o dos veces el

líquido, para evitar que los hematíes no lisados se depositen en el fondo. Para asegurar la conservación se añaden 0,25 ml. de cloroformo, por ciento, y luego de cubrir la tapa con una delgada capa de vaselina estéril, se puede guardar por largo tiempo sin que pierda sus propiedades, sea en la heladera o a la temperatura ambiente.

La experiencia que se detalla a continuación, fué realizada con el objeto de controlar la eficacia del preparado. Se tomaron tres tubos conteniendo cada uno 10 ml. de agua destilada estéril; en el primero se virtió un mililitro de lisado, del que una cantidad igual se transfirió al segundo, y de éste al tercero. Por consiguiente las diluciones son al décimo, centésimo y milésimo. Por otra parte se licuaron cuatro tubos con 5 ml. de agar y una vez a 45°C se les añadió 0,5 ml. de lisado puro, al primero, y cantidades iguales de las diluciones arriba mencionadas, a los otros tres. Inclutados se dejaron coagular y se sembraron con cultivo fresco de Dueroy. Estufa a 36°C por 48 horas. El desarrollo fué evidente en todos los tubos, pero en bastante más cantidad en los que contenían mayor proporción de lisado; en los últimos dos tubos apenas si era apreciable, y el número de colonias escaso. Esta observación demuestra que sólo se requieren cantidades mínimas del activador para tener resultados positivos.

Influencia de los factores X y V: Era conveniente conocer la forma en que estos factores, cuya existencia en la sangre ha demostrado Fildes, se comportaban frente al germen que se estudia.

MATERIAL Y TÉCNICA

Factor X: Se preparó siguiendo la técnica de Paul Beeson (1946). 40 ml. de sangre de corazón de conejo se dejan coagular y se les añade 8 ml. de solución fisiológica. Se hierve por cinco minutos y se filtra por gasa y papel. El filtrado se distribuye en ampollas de 2 ml. y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 15 minutos. Se usa en la concentración del cuatro por ciento.

Factor V: 20 gr. de levadura de cerveza se emulsionan en mortero de vidrio con 80 ml. de agua destilada; se deja caer gota a gota solución normal de ácido clorhídrico, y usando el rojo de metilo como indicador se ajusta a pH 4,6. Se hierve por diez minutos y se centrifuga por veinte a 2.000 revoluciones por minuto. Se recoge con pipeta a bola la porción clara sobrenadante y se distribuye en ampollas de 20 ml. No es necesario esterilizar. Se usa a la concentración del diez por ciento.

Beeson estudiando la influencia de ambos factores sobre diversas cepas microbianas, obtiene resultados que da a conocer en el volu-

men 61 de "Proceeding of the Society for Experimental Biology" los que nos permitimos completar con los publicados por Bergey y los nuestros.

<i>Microorganismo</i>	<i>Factor X</i>	<i>Factor V</i>	<i>Factor X y V</i>	<i>Sangre total</i>	<i>Sangre lisada</i>
Ducrey 1	0	0	0	++++	
Ducrey 2	0	0	0	++++	
Ducrey 3	0	0	0	++++	
Ducrey 4	0	0	0	++++	
Ducrey 5	0	0	0	++++	
Ducrey 6	0	0	0	++++	
Ducrey Sordelli	0	0	0	++	++++
H. influenzae 6.208	0	0	++++	++++	
H. influenzae I	0	0	++++	++++	
H. influenzae II	0	0	++++	++++	
H. para influenzae 7.901	0	++++	++++	++++	
**H. influenzae 1	0	0	++++	++++	++
**H. influenzae 2	0	0	++++	++++	++
**H. influenzae 3	0	0	++++	++++	++
*H. hemoliticus	0	±	++++	++++	
*H. haemoglobinophylus	+++	0	++++	++++	
*H. suis	0	0	++++	++++	

Los signos significan:

0 desarrollo nulo; ± dudoso; ++ regular; +++ abundante; ++++ muy abundante.

Las cepas señaladas con un asterisco corresponden a Bergey. Las que llevan dos fueron aisladas en el Instituto, una por el doctor Miravent de un caso de meningitis, y las otras por nosotros, de catarras estacionales.

Respecto a la cepa "Sordelli" debemos advertir que los dos primeros trasplantes fueron débilmente positivos tanto en los medios con los factores X y V independientemente, como en el que contenía ambos. Como la semilla provenía de cultivos con lisado, cabe suponer que el estreptobacilo puede retener en su protoplasma cierta cantidad de los elementos que le son necesarios para sobrevivir.

Naturaleza del factor de crecimiento: Debe encontrarse seguramente en el protoplasma de los glóbulos rojos, sea al estado de pureza o mezclado con otras sustancias, y únicamente se difunde al medio exterior cuando los eritrocitos son destruidos o se encuentran en un medio hipotónico. Es presumible que pertenezca a las enzimas u hormonas, o bien al grupo de los hoy llamados mejoradores, como la biotina, caseína hidrolizada, colchicina, ácido nicotínico y otras, que

en cantidades infinitesimales acrecientan grandemente el valor de los medios nutritivos.

Esta suposición no es en manera alguna aventurada. Estudios recientes prueban, que las sustancias orgánicas pueden contenerlas en cantidades más o menos grandes e influir sobre las propiedades nutritivas de los medios de cultivo. Así, por ejemplo, J. Solomides en un trabajo publicado en los Annales de L'Institute Pasteur de París, del año en curso, y con el título de "Mis en evidence dans le jaune de oeuf de facteur de croissance pour certains microbes" después de recordar que Besredka y Jupille y posteriormente F. Van Beise, demostraron que la yema de huevo constituía un excelente medio de cultivo y conservación para los más diversos microbios, da cuenta de una serie de experiencias que le permiten afirmar, que la yema de huevo añadida al caldo peptonado en cantidades del 1/2.000 al 1/20.000, basta para aumentar considerablemente su valor nutritivo, con la circunstancia particular de que esta acción benéfica, no es igual para los distintos gérmenes, y mientras para el estafilococo, estreptococo y neumococo es clara y se manifiesta prematuramente, no pasa cosa igual con el coli y el subtilis. Habría pues cierta preferencia selectiva.

Discusión: Para sostener que posiblemente nos encontramos frente a un factor nuevo, nos basamos en los siguientes hechos: el bacilo de Ducrey no desarrolla en medios a los que se han añadido los factores X y V, sea aisladamente o en conjunto, mientras que bastan cantidades mínimas del lisado para obtener cultivos abundantes. En este punto nuestras experiencias están de perfecto acuerdo con las de Romero D'Cunha. En segundo término tenemos, que mientras que el factor X es termoestable y soporta la temperatura de 120°C., el que estudiamos, más allá de los 70°C. pierde paulatinamente su eficacia. La siguiente prueba es demostrativa a este respecto. Si un frasco con lisado, y antes de añadirle el cloroformo, se pone por diez minutos al baño de maría en ebullición, los restos del estroma globular y de albúmina coagulada precipitan al fondo y en la superficie queda un líquido claro, apenas ligeramente opalino. Se filtra por gasa y papel y luego de distribuirle en ampollas, se hierve por algunos minutos. Los medios a los que se agregan cantidades hasta diez veces mayores que el lisado, del líquido que antecede, apenas si dan cultivo del Ducrey; las colonias son raras, muy pequeñas y es difícil distinguirlas del medio.

Afirmamos que el papel fundamental del lisado en el cultivo del estreptobacilo, somos los primeros en señalar. Es cierto que muchos autores inconcientemente se han servido de él, pero ninguno se ha detenido en la función primordial que le corresponde. Teague y Deibert calientan por cinco minutos su medio, pero no indican el fin

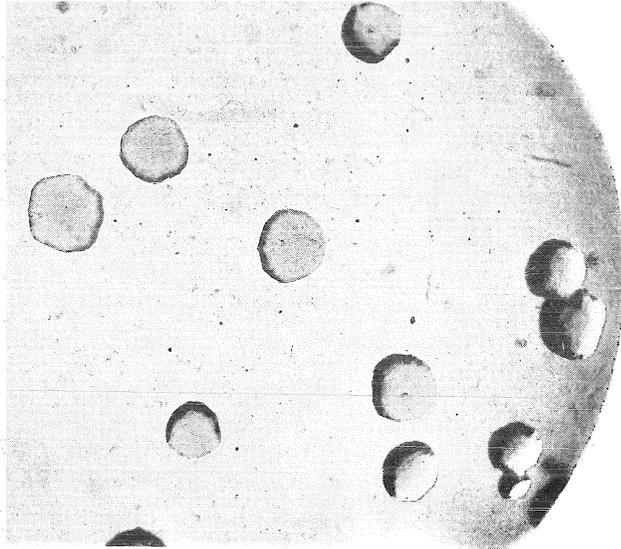


FIG. 1. — Conjunto de colonias de bacilo de Duerey. Agar-lisado hemático. 48 horas a 37°C.

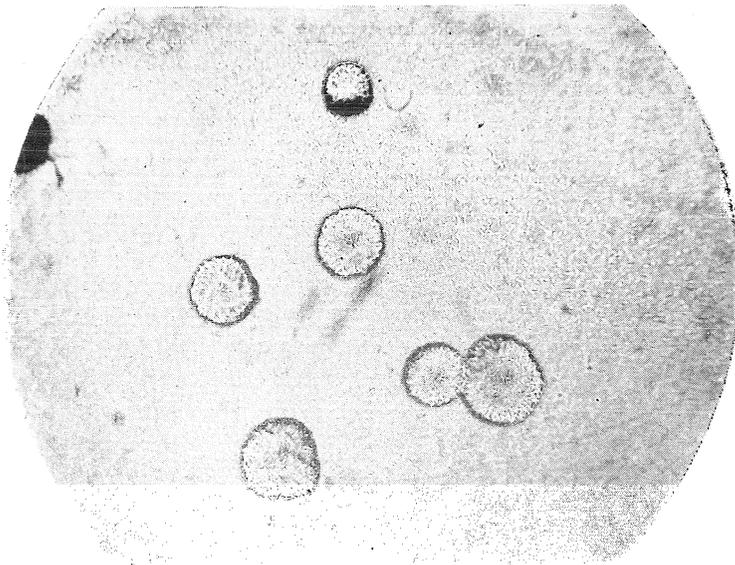


FIG. 2. — Conjunto de colonias de bacilo de Duerey. Agar-lisado hemático. Cinco días a 37°C.

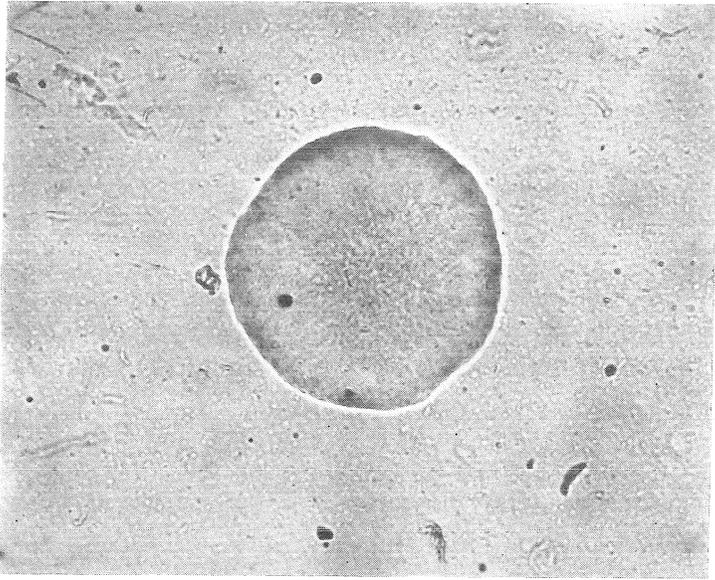


FIG. 3. — Colonia aislada de bacilo de Ducrey. Agar-lisado hemático. 48 horas a 37°C.

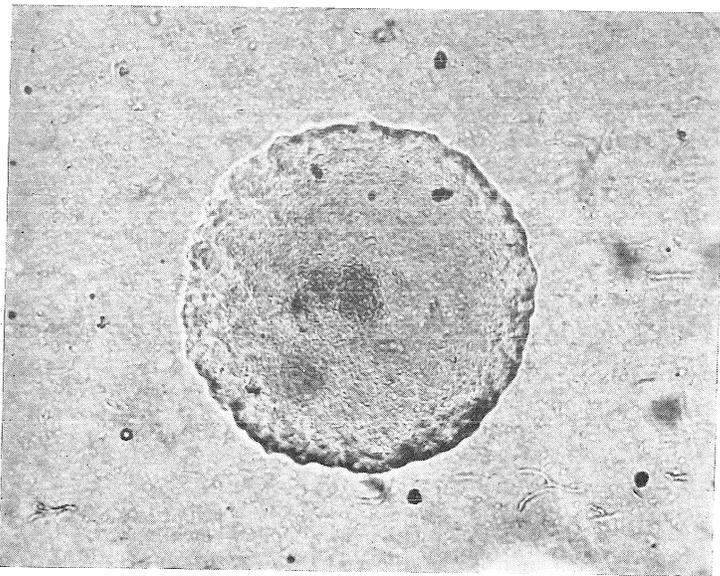


FIG. 4. — Colonia aislada de bacilo de Ducrey. Agar-lisado hemático. Cinco días a 37°C.

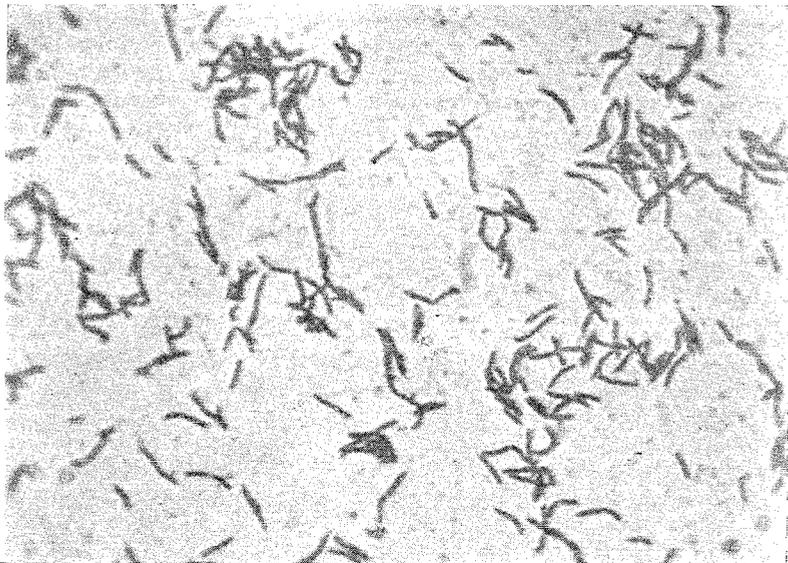


FIG. 5. — Bacilo de Ducrey. Preparado efectuado con material tomado de la superficie del medio (agar-lisado hemático).

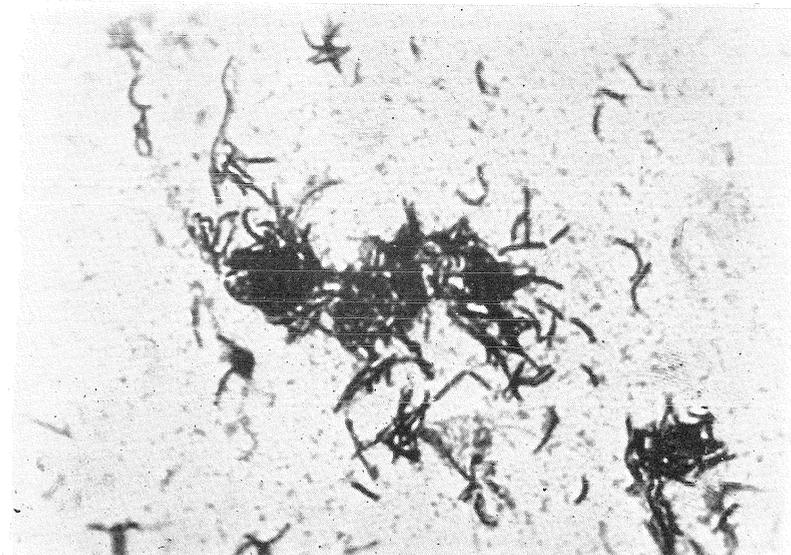


FIG. 6. — Bacilo de Ducrey. Preparado efectuado con material tomado del agua de condensación del medio (agar-lisado hemático).

del detalle, que ninguna acción podría ejercer para inactivar complemento, si tal tubiera sido el propósito, pues el tiempo es a todas luces insuficiente. Lo que seguramente ocurre, es que con el calentamiento hay lisis de eritrocitos, lo que hace que el medio adquiera propiedades nuevas. Los autores que usan sangre desfibrinada, como al agitar desintegran muchos hematíes, dan lugar a un fenómeno absolutamente comparable. Finalmente, Romero D'Cunha lisando la sangre con glicerina, y sin percatarse, obtiene resultados en todo comparables a los señalados por nosotros. La glicerina quizá desarrolle algún papel facilitando el aislamiento del germen, pero de ninguna manera mejora los resultados obtenidos con la sangre simplemente lisada.

Quizá se podría pensar en que son fermentos leucocitarios los que obran en el lisado; basta para anular semejante suposición, considerar que en los casos en que se usa sangre citratada, hay proporción infinitamente mayor de elementos de la serie blanca, que en el lisado, y sin embargo los cultivos son negativos. Por otra parte el citrato no tiene ninguna acción inhibitoria, como se demuestra por la siguiente experiencia: añadiendo solución de citrato al lisado, en cantidad doble de la que se usa en la sangre total, los tubos con agar así preparados, convienen al desarrollo del germen tanto o más que el lisado solo. La única forma de interpretar el fenómeno es admitiendo que el citrato evita la hemólisis e impide la difusión del factor de crecimiento.

Revisando la literatura llegamos a la conclusión de que los únicos autores que han usado lisado, sea únicamente en agua destilada o con el añadido de saponina, son Quiroga, Miravent y Sosa.

Vitalidad: Hemos comprobado que tubos de agar-lisado hemático sembrados con bacilo de Ducrey, dejados tres a cuatro días en estufa a 36°C y luego a temperatura ambiente, preferiblemente parafinando los tapones, o cerrando los tubos a la llama, se mantienen viables por más de cinco meses.

CONCLUSIONES

1. No creemos equivocarnos al considerar a la sustancia contenida en el lisado hemático como un factor nuevo, cuyo rol es facilitar y activar el desarrollo del estreptobacilo de Ducrey, en medios en los que de ordinario no prospera.

2. El desacuerdo entre los resultados obtenidos por otros autores y los detallados en el presente estudio, posiblemente se debe a que ellos trabajaron con cepas recién aisladas, mientras que nosotros, por desgracia, no obstante los esfuerzos realizados para conseguir cepas en tales condiciones, tanto en el país como en el extranjero,

sólo pudimos hacerlo con una de colección, y seguramente muy habituada a los medios artificiales.

3. Para llegar a resultados inobjetables será conveniente repetir estas experiencias sobre nuevas cepas.

BIBLIOGRAFÍA

- ALESSANDRINI, A., PAMPANA, E., FICAI, G. y SABATUCCI, M.: *Gli esami di laboratorio*, 1936.
- ANDERSON, K. y SNOW, J.: *Amer. Journ. Path.*, 1940, XVI, 1.
- ASSI, A.: *Comp. rend. Soc. Biol.*, 1926, 95, 100.
- ASSI, A.: *Compt. rend. Soc. Biol.*, 1927, 96, 472.
- ASSI, A. y FRAGA, A.: *Ann. brasil. dermat. e sifil.*, 1926, 2, 1.
- BEESON, P.: *Proced. of Society for Exper. Biol. Med.*, 1946, 61, 81.
- BERGEY: *Manual of determinative bacteriology*, 1939.
- BRAMS, J.: *Jour. Amer. Med. Ass.*, 1924, 82, 1166.
- COLE, H. y LEVIN, E. A.: *Journ. Amer. Med. Ass.*, 1935, 105, 2040.
- CUNHA, R.: *Hospital. Rio de Janeiro*, 1943, 23, 393.
- D'AMICO, G.: *Giorn. ital. dermat. e sif.*, 1937, 78, 1223.
- D'ANTONA, M.: *Giorn. de batteriolog. e immunolog.*, 1938, 21, 664.
- DUCREY, A.: *Monatsch. Prakt. Dermat.*, 1898, 9, 387.
- FICHER, F.: *Dermat. Ztschr.*, 1903, 10, 481.
- FONTANA, A.: *Zentra Bakt.*, 1911, 37, 433.
- FREI, W.: *Zentral Bakt.*, 1922, 85, 245.
- GRADVOHL, R. B. H.: *Clinical laboratory methods*, 1938.
- HABABOU SALA, J.: *Comp. rend. Soc. Biol.*, 1925, 92, 498.
- HUNT, G. A.: *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1935, 35, 293.
- ITO TETSUDA: *Archi. Dermat. Syph.*, 1913, 116, 341.
- KOCH, F. E.: *Arch. Dermat. Syph.*, 1936.
- KOLMER, J. A.: *Tecn. de labor.*, 1938.
- LENGLET.: *Ann. dermat. Syph.*, 1901, 209.
- LIPSCHUTZ, B.: *Arch. Dermat. Syph.*, 1905, 76, 209.
- LIPSCHUTZ, B.: *Arch. Dermat. Syph.*, 1905, 77, 191.
- LIPNSKI, W.: *Compt. rend. Soc. Biol.*, 1925, 93, 657.
- MARECHAL, M. G.: *Comp. rend. Soc. Biol.* 1909, 52, 1115.
- MAXINOWA, A.: *Ann. Dermat. et Syph.*, 1936, 7, 840.
- NICOLAU, S. y BANCÚ: *Ann. de Malad. Ven.*, 1934, 29, 801.
- NICOLLE, C.: *Compt. rend. Soc. Biol.*, 1923, 88, 871.
- NICOLLE y DURAND: *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1924, 13, 243.
- QUIROGA, R., MIRAVENT, J. M. y SOSA, H.: *Rev. Inst. Bacteriol.*, 1926, 519.
- REENSTIERNA, J.: *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1923, 12, 273.
- SAELHOF, C. C.: *Journ. Inf. Dis.*, 1924, 35, 591.
- SANDERSON, C. C. y GREENBLATT: *Laboratory Methods and diagnosis*, 1938.
- SOLOMIDES, J.: *Ann. Instit. Pasteur*, 1948, 74, n.º 1, 70.
- SOSA, H.: *Rev. Soc. Argent. Biol.*, 1930, n.º 9 y n.º 10, 667.
- TEAGUE, O. y DEIBERT, O.: *Journ. Med. Research*, 1922, 43, 61.
- TOPELY y WILSON: *Bacteriol. e Inmunidad*, 1943.