Algunos detalles sobre purificación de antígenos de Wassermann y especialmente del utilizado en una modificación reciente.

Por JUAN M. MIRAVENT

A los estudios iniciales de Wassermann, Neisser y Bruck, y de otros autores, basados en el uso de extractos acuosos de órganos sifilíticos, así como a los inmediatos sobre antígenos alcohólicos de órganos normales, siguen muy de cerca las primeras tentativas de purificar dichos extractos, con la finalidad doblemente útil de librarles de substancias inactivas y perjudiciales, al tiempo que profundizar el análisis de la fracción antigénica.

El uso de los extractos alcohólicos de corazón de bovino, difundido universalmente, con exclusión casi completa de otros órganos, ha contribuído en gran parte al conocimiento de la naturaleza de estos productos.

Más tarde, la substitución de los extractos primarios, por los denominados secundarios, previo tratamiento con solventes distintos, significa nuevo adelanto en el estudio de la fracción activa. Esta substancia, capaz de combinarse con la reagina sifilítica, representa una mínima parte, dentro de la mezcla de substancias — algunas inactivas, perjudiciales o reforzadoras otras — de composición química variada (lipoides, derivados de proteinas, grasas, etc.), que forman el total de los extractos alcohólicos, aún de los purificados.

Las numerosas tentativas para islar e identificar dicha substancia activa, no sólo han fracasado, sino que han dado origen a las opiniones más opuestas. El aislamiento de tal producto es el ideal al que muy lentamente se van acercando los investigadores, pues, más bien que su obtención en estado de pureza, se van conociendo y separando las fracciones inactivas acompañantes. Por esta razón los resultados son más prácticos que teóricos, al limitar el contenido de aquéllas, pero manteniendo siempre, cierta proporción, en los más puros extractos de la fracción activa.

La naturaleza de esta cuestión y las dificultades más diversas, han obligado a los investigadores que se ocuparon del tema, a separar dos problemas con límites bien definidos. El primero, de orden eminentemente práctico, ha sido resolver la purificación de los extractos hasta cierto límite y con poca pérdida de la fracción activa, para ser útiles en reacciones de alta sensibilidad y especificidad. Es el problema de aplicación, bastante analizado actualmente.

El segundo problema, el teórico y más interesante, es el de la individualización de la fracción activa. Bajo este aspecto debemos reconocer que aun nos hallamos en el terreno de las hipótesis.

En este resumen nos ocuparemos de nuestras experiencias, como contribución al conocimiento de ambos problemas, dividiendo los ensayos en la forma dicha.

I. — ASPECTO PRÁCTICO DE LA PURIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE WASSERMANN. REDUCCIÓN DE SUBSTANCIAS INACTIVAS

Los primeros ensayos dirigidos en el doble sentido de reducción de impurezas, conservando la mayor proporción de substancias activas, se realizaron al comparar la actividad del antígeno de Eagle (que requiere varias extracciones por éter), con otro que posteriormente al éter se tratara con acetona. Así se comprobó la pérdida de gran proporción de substancia fijadora, pero del contenido suficiente para ser aprovechada y más libre de impurezas. Un método semejante es usado por Cassiniga y Estábile.

Más tarde, se probó de usar como aconsejan Fischer y Günsberger, la extracción por cloroformo repetida tres veces, antes del alcohol, pero de esta forma la pérdida era muy grande, si se calcula la actividad fijadora de lo que se pierde por cloroformo, con relación a lo extraído por el alcohol. La pérdida era menor por una sola extracción de cloroformo.

Esta última observación y lo dicho por Fischer y Günsberger, sobre la distinta solubilidad del principio antigénico, mayor en alcohol y luego en proporción decreciente en cloroformo, éter y acetona (casi nada), nos indujo a disminuir la acción disolvente del cloroformo por combinación con acetona. Buscamos la reducción de pérdida del principio activo, por la conocida acción de la acetona, de impedir la solubilidad de los fosfatidos, acción que limitaría la del cloroformo, pero conservando la mezcla su actividad disolvente sobre otras substancias. Tal ha sido el origen de nuestro antígeno al que procuramos purificar más por diversos ensayos, hasta que observamos que la extracción posterior del polvo con éter (en pro-

porción de 1 gr. y 10 c. c., durante 24 h.) nos reducía las substancias acompañantes sin pérdida alguna de substancia activa. El éter, empleado después de la mezcla cloroformo-acetona, no extrae antígeno, a la inversa de lo que acontece cuando se usa en primer término (método de Eagle, etc.).

Para la extracción alcohólica final, nos basamos en lo dicho por varios autores, en cuanto a la escasa acción disolvente sobre el antígeno, del alcohol de baja concentración, que por otra parte según Kline, disuelve substancias perjudiciales. Por estas razones siempre usamos el de 98-99° con buen resultado. En razón de cierta pobreza de substancia activa, cuando la extracción se hacía en proporción de 1 gr. de polvo seco y 10 c. c. de alcohol, buscamos de concentrarla por aumento del « soporte » de substancias acompañantes. La relación de 1 gr. de polvo y 4 c. c. y la extracción de 2 días a temperatura ambiente, nos permitió obtener una concentración alta de substancia antigénica, como se verá más adelante.

El método final de preparación es el siguiente: 100 gr. de polvo de corazón bovino (el usado para ant. de Kahn) se tratan con 500 c. c. de una mezcla por partes iguales de cloroformo y acetona, químicamente puros, agitando cinco minutos al comienzo, brevemente y una sola vez en el transcurso de 24 h., al final de las cuales se agita otra vez durante cinco minutos y finalmente se filtra por aspiración, procurando extraer la mayor parte de la mezcla dicha. Se deseca nuevamente el polvo de órgano, a temperatura ambiente, lo que se consigue en dos horas, extendiendo el órgano. La segunda extracción se realiza por éter (1.000 c. c. para los 100 gr. anteriores). Diez minutos de agitación al añadir el éter, nueva agitación después de varias horas y finalmente una tercera de 10 minutos después de 24 h. completan esta extracción, seguida por filtración al vacío. De igual manera que anteriormente, se procura eliminar todo el éter, y se deseca el corazón pulverizado, durante 2 horas a temperatura ambiente.

La extracción alcohólica final se ejecuta una vez que el polvo restante quede libre de olor a éter. Se usa 1 gr. de éste y 4 c. c. de alcohol 98-99°. Se agita bien 10 minutos esta mezcla, que se deja durante 48 horas a temperatura ambiente, pero agitando más o menos cada 12 h., es decir, unas cuatro veces, para uniformar lo mejor posible el contenido del frasco. Al término de las 48 h., y previa agitación de 10 minutos se filtra por aspiración, aprovechando lo mejor posible el extracto que es el antígeno. Se conserva bien tapado, al abrigo de la luz.

Quedaba ahora por demostrar: 1º Que se conseguía un extracto alcohólico con alta concentración de antígeno.

2º Que la pérdida de substancia activa no era exagerada, en la mezcla de cloroformo-acetona.

3º Que el alcohol, en nuestras condiciones de trabajo, extrae la mayor parte del antígeno.

4º Que este antígeno era utilizable en la fijación de complemento con fines diagnósticos y en la floculación.

Para la demostración de los tres primeros puntos, se preparó antígeno según se ha dicho y al mismo tiempo se probó lo extraído por cloroformo acetona, luego del tratamiento siguiente: evaporación, lavado por acetona (2 veces) y toma por alcohol (con volumen igual al del extracto p. dicho), para tener una comprobación cuantitativa de la pérdida de substancia fijadora. Los dos extractos alcohólicos se colesterolaron al 0,6 %. Al mismo tiempo se preparó antígeno de Eagle (fijación), y con el extracto etéreo se procedió en forma similar: evaporación, lavado 2 veces por acetona, y disolución en alcohol con volumen igual al del ant. Eagle p. dicho. Tanto el antígeno de Eagle como el residuo de éter llevan 1 % de colesterol. Así obtuvimos 4 fracciones: nº 1, ant. Eagle; nº 2, residuo de Eagle (extracto etéreo purificado); nº 3, antígeno estudiado (le llamaremos mod. o M.); y nº 4, residuo del anterior (extracto clorofórmico acetónico purificado). Además, con fines experimentales, añadimos: nº 5 que representa la porción soluble en acetona del nº 4; lo soluble en éter después de cloroformo acetona, nº 6, y finalmente lo soluble en piridina, luego de la extracción alcohólica final, nº 7.

Para la mayor claridad resumiremos en el esquema siguiente (nº 1) la extracción de los distintos productos y la prueba de fijación de complemento.

ESQUEMA Nº 1.

Obtención de antígenos y productos residuales

Polvo de corazón + éter (4 veces)	Subst. solubles (evap. eter, lavadas con acetona y tomadas en alcoh.; colesterol 1 % (nº 2).
Extracción por alcohol y colesterolado 1 %	(nº 1) Eagle.
Polvo de coraz. + clorof. acetona	Subst. solubles (evap. lavadas con acetona (nº 5) y tomadas en alcohol; + colest. 0,6 % (nº 4).
Extracción por éter	Subst. sol. (evap. y tomadas en alcohol) (nº 6).
Extracción por alcohol y colesterolado 0,6 %	(nº 3) (ant. mod. M).
Extracción por piridina	Subst. sol. (evap. y tomadas en alcohol) (nº 7).

Fijación de complemento con estas fracciones

Suero +	1/1	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	1/7	1/8 (1)
Extracto nº 1 (Eagle) 1/50 0,2 cc.	0	0	0	0	0	ph	H	H
Ext. resid. nº 2 » » » »	0	0	0	0	0	½ H	H	H
» mezcla nº 1 + 2 » » »	0	0	0	0	0	ph	H	H
» nº 3 (M) » » »	0	0	0	0	0	ph	H	H
» resid. nº 4 (M) » » »	0	0	0	0	ph	c.h.	H	H
» mezcla nº 3+4 » » »	0	0	0	0	0	ph	H	H
» nº 5 » » »	ph	H	H	H	H	H	H	H
» nº 6 » » »	H	H	H	H	H	H	H	H
» nº 7 » » »	ch	H	H	H	H	H	H	H

(1) Suero sifil. puro y diluído en normal; cantidad 0,1 cc.

Todos los extractos se diluyen gota a gota en solución fisiológica, a 1/50, empleándose 0,2 c. c. El suero positivo se usa puro y diluído 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 1/7, 1/8, en suero normal humano. Se añade 0,3 c. c. de complemento 1/30 y luego de 3 horas de fijación a 0° se agrega 0,5 c. c. de mezcla hemolítica (glob. 10 % y 2 ½ dosis de suero hemolítico). Lectura a los 15 minutos con hemolisis completa de los controles de suero.

Esta experiencia demuestra:

a) Que por la extracción de cloroformo acetona no se pierde mayor cantidad de antígeno que con el método de Eagle.

b) Que las substancias residuales de los ant. Eagle y M. no refuerzan la actividad de los respectivos extractos.

c) Que el éter usado en segundo término no extrae antígeno.

d) Que de lo extraído por cloroformo acetona, solamente lo insoluble en acetona contiene antígeno (en los fosfátidos).

e) Que el alcohol extrae casi todo el antígeno del cual sólo quedan residuos obtenidos en piridina.

Conviene tener presente, además, un aspecto cuantitativo de las extracciones y el tanto por ciento del peso de órgano que se pierde por los tratamientos anteriores. En el antígeno M. se pierde el 13,5 % antes de la extracción por alcohol (12 % por clorof. acetona y 1,5 % por éter). En el de Eagle, en iguales condiciones, 11 % y 10 % en el de Kahn. Estas cifras son el término medio de las halladas.

Por estos ensayos parece que se consigue eliminar mayor cantidad de substancias inertes, conservando gran proporción de las activas. Que la extracción por éter no reste antígeno, podría expli-

carse por la solubilidad de éste en algunas substancias que ya fueron extraídas en cloroformo acetona o que necesite cierta concentración de substancias inertes para pasar a solución. Siempre es interesante esta purificación sin pérdida de antígeno.

En cuanto a la utilidad de este antígeno en la práctica del suero diagnóstico ya se ha dado a conocer en comunicaciones anteriores.

Antes de seguir con el comentario de experiencias relativas al principio activo de Wassermann daremos algunas cifras de los análisis químicos efectuados por el Sr. Julio Laffué a quien agradecemos dicha contribución. Figuran resumidas en el cuadro siguiente (nº 2) y representan el promedio de varias determinaciones. El Sr. Laffué analizó los antígenos de Bordet, Eagle y el estudiado (M.), todos ellos sin agregado de colesterol.

CUADRO Nº 2.

ANALISIS QUIMICO DE VARIOS ANTIGENOS

Cifras obtenidas por el señor J. Laffué

Antígeno	N. gr. ‰	P. gr. ‰	E. seco gr. ‰	Ind. iodo
Bordet	0,444	0,245	9,2	6
Eeagle (1)	0,804	0,247	13,1	5
M. (1)	1,050	0,292	15,8	28

(1) Sin agregado de colesterol.

El antígeno M. por la forma de extracción alcohólica 1/4 tiene una concentración ± 25 % mayor que el de Eagle.

ALGUNOS DETALLES SOBRE LA NATURALEZA DE LA SUBSTANCIA ANTIGÉNICA DE WASSERMANN

A partir de los trabajos de Porges y Meier (1908) que indican a una lecitina como principio activo, aparecen nuevas contribuciones al conocimiento de dicha substancia, problema de cuya solución aún estamos distantes. Erlandsen y luego Noguchi estudian las extracciones por el éter y alcohol y los productos que se obtienen según el orden de acción.

Se puede decir que el primer trabajo analítico es el de Neymann y Gager, que atribuyen propiedades antigénicas a la lecitina y al diaminomonofosfatido y se la niegan a la cefalina. Sin embargo, Kiss prepara más tarde una fracción con cefalina fuertemente antigénica.

La lecitina o sus impurezas son para la mayor parte de los autores, las portadoras de actividad antigénica. Browning, Cruickshank y Mc. Kenzie así lo consideran por sus características de solubilidad; Scaltritti por la precipitación por cloruro de cadmio y también Eagle por el contenido en N. de los lipoides activos adsorbidos por cristales de colesterol, igual a la lecitina. Weil y Besser hallan antígeno en lecitina sintética.

Otros autores, en cambio, niegan a la lecitina propiedades antigénicas y hallan la fracción activa fuera de ella. Wadsworth, Maltaner y Maltaner, tanto como Fujimura no encuentran actividad en lecitina purificada con cloruro de cadmio.

Entre los estudios recientes debe citarse el de Pangborn, que encuentra la substancia activa en la cefalina cruda y en la lecitina. Wellman y Lankelma (1941) afirman que la substancia activa está en la lecitina o en una contaminación de ella. Para probarlo extraen polvo de corazón con éter y luego por alcohol (las dos veces con Soxhlet); las fracciones de ambas partes insolubles en acetona y solubles en alcohol, las reunen y purifican por Cl_2Cd, según una modificación del método de Levene y Rolf. Hallan poder antigénico alto y fórmula similar a lecitina, salvo el alto número de iodo.

Brown y Kolmer, también en 1941, se ocupan del tema con la base del análisis de los precipitados formados por antígeno de Kahn con sueros positivos, en proporciones óptimas. Los estudios preliminares muestran que dicho precipitado contiene todas las substancias antigénicas activas presentes en el antígeno de Kahn. Estudian 6 fracciones según solubilidad en acetona, éter y alcohol, que luego prueban en ensayos de fijación de complemento. En el diaminomonofosfatido no encuentran actividad y en cambio la demuestran en otras dos fracciones que tienen las características de la lecitina y cefalina, descubriendo que cada una contiene un 40 % de una substancia fosforada, no nitrogenada, desconocida. Dicen que ni la lecitina ni la cefalina son directamente responsables de la actividad antigénica y que ambas contienen el principio que no es idéntico a ellas. El alto contenido de P. $\pm$ 4 % y bajo de N. $\pm$ 1 %, tanto como el alto número de iodo (81 para la fracción lecitínica) están en exceso para el contenido de 60 % de lecitina de tal fracción y hacen pensar en una substancia desconocida adsorbida en proporciones iguales por lecitina y cefalina.

Las investigaciones de Ronai, Weil y Berendes y sobre todo de Ö. Fischer al mostrar que la substancia activa puede obtenerse de los extractos por adsorbentes distintos (caolín, hidróxido de aluminio, fosfato de calcio, etc.), para luego recuperarse por elución en benzol, permiten mayores posibilidades de caracterización química.

Según Ö. Fischer, el contenido de N. y fosfatidos es muy reducido en los extractos purificados, con relación a los originales, mientras el contenido en ácido graso y la capacidad de reducción están aumentadas. La fuerte disminución de N. y P. habla en contra, según este autor, de la intervención de las substancias nitrogenadas y fosfatidos en el antígeno.

Fischer y Günsberger, mediante el método de extracción clorofórmica repetida y luego por alcohol, consiguen un extracto al que también purifican por adsorción, con solo el 7 % del residuo seco del total (de un extracto alcohólico de corazón de bovino) y que contiene abundante P. y N.; está libre de lecitina (no se enturbia por cloruro de cadmio) y de cefalina. Según ellos, dichos productos purificados, que no son substancias químicas, son difícilmente solubles en alcohol y cloroformo, y por tal razón no creen que se trate de lipoides.

Nuevos métodos de purificación ideados por Fischer y Steiner, por repartición del antígeno residual de cloroformo, entre alcohol de 80° y éter de petróleo, les permiten afirmar, por su igual distribución, que en el éter de petróleo con un contenido de P. cinco veces superior, hay igual antígeno o menos que en el alcohol. Luego Fischer y Fischer-Dallmann, añaden ácido al extracto alcohólico y observan que todo el antígeno pasa al éter de petróleo. Concluyen afirmando que el principio activo no depende del contenido de P. y que es muy escaso con relación a los componentes inactivos.

Por lo expuesto se deduce que el problema dista de estar resuelto y a las dificultades del planteo se agregan las propias de la química de lipoides. La obtención de estas substancias en estado de pureza, significa procedimientos largos y de dudosos resultados, por cuanto las contaminaciones con pequeñísimas cantidades de otros productos, son muy difíciles de eliminar.

En vista del buen resultado práctico del antígeno obtenido por extracción alcohólica después de tratamiento por cloroformo acetona y por éter, hemos buscado mayor pureza, siguiendo un método semejante al de Lustig y Mandler, vale decir extracción después de hidrólisis pépsica en medio ácido. Digeridas gran parte de las substancias contenidas en el corazón de bovino, en la forma dicha, por 24 horas, se filtra por Büchner y se elimina el líquido de digestión (que no contiene antígeno de Wass). El residuo se lava abundantemente con agua para eliminar el exceso de ácido y pepsina, para luego secarse a 37°. Entonces se extrae con la mezcla de cloroformo acetona (en proporción de 1 parte y 20) durante 24 horas y al día siguiente por éter (1 parte y 40), durante igual número de horas. La extracción final es por alcohol (1 parte y 20)

durante dos días. Por pruebas de fijación se determina la existencia de antígeno en el extracto cloroformo acetónico y en el alcohólico.

Luego por la prueba del cloruro de cadmio se halla un menor contenido en lecitina en el alcohólico, que en el clorofórmico, que resulta mucho menor que en el extracto alcohólico sin digestión previa, y extraordinariamente inferior al del antígeno de Eagle.

Por su débil contenido en lecitina, así como por los tratamientos previos nos ha resultado interesante para estudio y hemos buscado una mayor pureza precisamente por tratamiento por Cl_2Cd. Por adición de un exceso de solución saturada alcohólica de Cl_2Cd al antígeno, se observa ligera opacificación que se intensifica al día siguiente. Después de filtración se repite la prueba con resultado negativo, lo que demuestra ausencia de cantidades apreciables de lecitina. Sometido este extracto (que llamaremos Mb) a la prueba de fijación de complemento con suero sifilítico, resultó provisto de intenso poder antigénico. Su análisis practicado por el Sr. Laffué dió solo vestigios de P. y 0,056 gr. ‰ de N. (unas 20 veces menos que el antígeno M).

En el esquema siguiente figuran dos ensayos de fijación, con antígenos distintos y la preparación de ambos.

ESQUEMA Nº 3.

Preparación y ensayos con antígeno (M)

1º Extracción por cloroformo acetona.

2º » » éter.

3º » » alcohol (ant. M., N 1,05 gr. ‰ P. 0,292 gr. ‰ Ex. s. 15,8 gr. ‰, I. iodo 28).

Ant. M + acetona	Subst. sol.	se eliminan
Trat. por éter	» insol.	» »
Extracc. por alcohol	Precipitac. por clor. cadmio	

	El pp. diluído 1/25 sol.f.					El sobrenad. diluído 1/25 sol.f.			
Suero + c.c.	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Ant. 1/25 c.c.	0,3	0,15	0,05	0,02	—	0,3	0,15	0,05	0,02
Sol. f. c.c.	—	0,15	0,25	0,28	0,3	—	0,15	0,25	0,28
Resultado	0	0	0	0	H	0	0	0	0

Fijación de 3 h. a 0º. Controles de antígenos más suero negativo H.

Preparación y ensayos con antígeno (Ma)

1° Digestión por pepsina, con HCl.
2° Lavado con agua y secado a 37°.
3° Extracción por cloroformo acetona 1/20.
4° » » éter 1/40.
5° » » alcohol (ant. Ma).
6° Precip. por clor. cad. y eliminación del pp.
7° Comprobación de ausencia de lecitina, por clor. cad.
8° Desecación y eliminación del clor. cad. por lavado rápido con agua (Mb).
9° Emulsión en sol. fis. 1/20.
10° Ensayo de fijación.

Suero + c.c.	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	—
Ant. 1/20 c.c.	0,3	0,15	0,05	0,02	—	0,3
Sol. f. c.c.	—	0,15	0,25	0,28	0,3	0,15
Resultado	0	0	0	ph	H	H

Fijación de 3 h. a 0°.

La experiencia primera muestra que en la fracción probablemente sin lecitina hay antígeno y por ello repetimos el ensayo con otro producto Ma, más purificado. Los resultados figuran resumidos en los cuadros adjuntos. Agregaremos también que el producto libre de lecitina Mb, carece de poder anticomplementario y rotatorio destrógiro.

DISCUSIÓN

Un antígeno de uso práctico se consigue por extracción cloroformo acetónica y luego por éter, antes de la final por alcohol. Por su fórmula de N. P. Ex. seco e I. iodo se acerca bastante al de Eagle del que se diferencia por mayor I. iodo. Este producto denominado por nosotros (M), por fraccionamiento y precipitación con cloruro de cadmio, muestra que en él existe una fracción posiblemente libre de lecitina, con alto contenido antigénico.

Un segundo antígeno conseguido en forma semejante, pero después de digestión clorhidro-pépsica, por tratamiento repetido con Cl_2Cd. ofrece una fracción aparentemente libre de lecitina, con solo vestigios de P. que posee alto poder fijador y nulo anticomplementario.

CONCLUSIONES

Un antígeno de gran utilidad en el suerodiagnóstico se obtiene en la forma indicada y otro antígeno experimental de mayor pureza, muestra que posiblemente sin lecitina y con solo vestigio de P. se conserva el principio fijador de Wassermann.

BIBLIOGRAFIA

EAGLE, H.: *The Laboratory diag. of Syphilis.* St. Louis, 1937.

CASSINIGA, J. A. y ESTÁBILE, M. E.: *Arch. Soc. Biol.*, Montev. 1936, 7, nº 3.

FISCHER, O. und GÜNSBERGER, O.: *Z. f. Immunitätsf.* 1935, 84-85, 233 y 1936, 85-86, 400.

KLINE, B. S.: *Ven Dis. Inf.* 1940, 387; *Am. J. Cl. Path.* 1940, 10, 853.

MIRAVENT, J. M.: *Semana Méd.* 1941, 48, 1126.

NEYMANN, C. A. and GAGER, L. T.: *J. Immunol.* 1917, 2, 573.

KISS, J.: Z. *f. Immunitätsf.* 1932, 77, 195.

BROWNING, C. H., CRUISKSHANK, J. and MC. KENZIE, I.: *J. Path. Bact.* 1910, 14, 484.

EAGLE, H.: *J. Immunol.* 1935, 29, 467.

SCALTRITTI, A.: *Ann. Inst. Pasteur,* 1928, 42, 1608.

WEIL, A. J. und BESSER, F.: *Klin. Wchnschr.* 1931, 10, 1941.

WADSWORTH, A., MALTANER, E. and MALTANER, F.: *J. Immunol.* 1934, 26, 25.

FUJIMURA, S.: *J. Biochem.* 1937, 25, 595.

PANGBORN, M. C.: *J. Bact.* 1940, 39, 80.

WELMANN, J. H. and LAKELMA, H. P.: *Ven. Dis. Inf.* 1941, 22, 12.

BROWN, H. and KOLMER, J. A.: *J. Biol. Chem.* 1941, 137, 525.

RÓNAI, T.: *Z. f. Immunitätsf.* 1932, 75, 125.

WEIL, A. J. and BERENDES, J.: *Klin. Wchnschr.* 1932, 11, 70.

FISCHER, Ö.: *Klin. Wchnschr.* 1932, 11, 512 y 2081; *Z. f. Immunitätsf.* 1931, 71, 441; 1932, 72, 344, y 1933, 78-79, 391.

FISCHER, Ö. und STEINER, J.: *Klin. Wchnschr.* 1936, 15, 1322.

FISCHER, Ö. und FISCHER-DALLMANN, R.: *Klin. Wchnschr.* 1936, 15, 1408.

LUSTIG, B. und MANDLER, E.: *Biochem. Zeitschr.* 1932, 249.