

Medición del suero anti-*perfringens* (*B. Welchii*)

Por A. Sordelli, F. Jiménez de Asúa y J. Ferrari

(PRIMERA COMUNICACIÓN.—PRIMERA PARTE)

PREPARACIÓN DE UNA TOXINA ACTIVA Y ESTABLE

Desde el año 1924 hemos utilizado para la preparación de las toxinas de los gérmenes anaerobios de la gangrena gaseosa un mismo caldo básico obtenido por maceración a temperatura ambiente de 1 parte de carne en 2 de agua, durante la noche; ebullición durante 30'; filtración; adición de 5 ‰ de ClNa y 2 ‰ de peptona P. & Davis; alcalinización a pH 8.4. Precipitación a 115° y esterilización a 110° durante 20'.

La toxina de *B. welchii* se prepara con este caldo al que se añade 1 ‰ de glucosa después de la esterilización. La siembra se hace con un trozo grande de músculo de paloma inoculada por vía muscular, con un cultivo en agar o en caldo de *B. welchii*. La incubación se hace a 37° por 8 a 12 horas. Luego se coloca en la heladera por el tiempo restante hasta el momento de la inoculación (+ 8 a 10 horas más), esta técnica es prácticamente la de Bull y Pritchett (9), (10). Estos autores añaden un trozo de músculo de paloma a un tubo con 10 cm.³ de caldo simple y cuando se han cerciorado de su esterilidad, siembran *B. welchii* e incuban bajo parafina en vacío.

El cultivo de 12 horas centrifugado o filtrado por papilla de papel y arena tiene una toxicidad pequeña, pues la D. M. M. para la cobaya inoculada por vía venosa es rara vez inferior a 1.5 cm.³. El valor mínimo encontrado ha sido de 1 cm.³. Estas cifras corresponden al valor de la toxina aguda, pues el tiempo de observación no pasa de 3 horas. En los últimos años fué

observada además una disminución de la toxicidad. Es sabido que estas variaciones ocurren con otras bacterias toxígenas, sin que se haya hasta el momento, encontrado la causa que determina la variación.

Se mantuvo exaltada la virulencia por pasajes, en la cobaya inoculada por vía muscular. Muchas cepas fueron ensayadas sin poder alcanzar valores más bajos que los indicados.

La D. M. M. del cultivo entero fué determinada en muchas ocasiones y se la encontró siempre próxima a 0.1 cm.³ (1).

Si se compara el valor de nuestras toxinas con el de las obtenidas por Bull, puede apreciarse que las nuestras son de una toxicidad muy inferior.

Veremos más adelante que la toxicidad de un filtrado de *B. Welchii* no es índice absoluto de su poder antigénico antitóxico lo que permite explicar que hayamos obtenido sueros de actividad grande utilizando toxinas de escaso valor tóxico. Pero a pesar de ser buenos antígenos, estas toxinas no pueden ser utilizadas para la determinación del valor antitóxico del suero, pues el volumen que habría que inyectar sería demasiado grande. Además se inyectarían simultáneamente con el tóxico específico, sustancias tóxicas de naturaleza no antigénica que harían imposible toda determinación. Para resolver el problema de la obtención de una toxina fueron estudiados los siguientes asuntos:

- a) Elección del caldo.
- b) Tiempo de incubación óptimo.
- c) Atenuación de la toxina por el tiempo.
- d) Atenuación de la toxina por filtración.
- e) Estabilización por precipitación.

a) *Elección del caldo*

En 1921 fué ya estudiado este asunto (2) y se decidió entonces usar la técnica aconsejada por Bull y Pritchett (9-10) que permitió preparar toxinas suficientemente activas y además conseguir sueros antitóxicos activos.

(1) La inoculación era hecha completando el cultivo hasta 1 cm.³ con caldo, pues si se usa solución fisiológica, los resultados son siempre irregularísimos. Este método lo usamos para todos los experimentos de determinación de poder patógeno.

Como Bengston (8) indica que con la técnica de Kruif, Adams e Ireland (11), se pueden obtener toxinas líquidas de *B. Welchii* cuya D. M. M. para las palomas oscila entre 0.12 cm.³ y 0.20 (en realidad entre 0.12 y 0.30, pág. 20), seguimos las indicaciones de estos autores y tuvimos oportunidad de comprobar sus observaciones.

La técnica seguida para la obtención del caldo es la siguiente: 3 litros de caldo preparado en la forma indicada en la página 527 se colocan en un frasco grande con dos kilos de carne molida cocida y bien exprimida que ha servido para la obtención de agua de carne. Se esteriliza por calentamiento a 100° durante una hora y por 10' a 115°. El caldo se enfría rápidamente con ventilador y luego en agua fría hasta 38°. Se toman 10 cm.³ del caldo sobrenadante, se titula con Na OH hasta pH 8.4 y se añade NaOH (20 %) estéril en proporción de la cantidad de caldo que se ha usado (3 litros). La reacción queda aproximadamente a pH 7.6. Se añade glucosa estéril en proporción del 2 ‰. Se siembra con un cultivo fresco de agar blando (0.25 % en agar) y se incuba a 37°.

Bull y Pritchett han observado que la adición de músculo esterilizado no favorece la formación de toxina, mientras que la de músculo fresco la aumenta considerablemente.

De Kruif, Adams e Ireland confirman este resultado (página 585) y agregan que no hay diferencia en la toxicidad de los filtrados, ya se añada poco o mucho músculo estéril (desde una cantidad de músculo igual al volumen del caldo hasta igual a 1/5).

Estos autores prueban que el músculo fresco añadido al caldo y esterilizado después aumenta considerablemente la producción de toxina, pero que la toxicidad es mucho mayor si se agrega una proporción grande de músculo. Las diferencias son ya muy marcadas entre una mezcla de 1 parte de músculo y una de caldo, y una de músculo y dos de caldo.

La contradicción entre los datos de Bull y los de De Kruif es solo aparente, pues las condiciones en que ambos autores han experimentado son tan diferentes que permiten explicar perfectamente que las deducciones sean distintas.

Nuestros experimentos (protocolo a), confirman los de De Kruif, Adams e Ireland, como ya lo hicieron Bengston (8) en 1920 y varios autores ingleses (6) en 1919 (Medical Re-

search Comittée, Special Report Series N° 39, pág. 10 y 118, año 1919).

Importancia del agregado de carne cocida al caldo para la obtención de filtrados de gran toxicidad.

En un frasco de un litro de capacidad, se colocan 300 grs. de carne molida y cocida y 500 cm.³ de caldo con peptonas P. D. 2 % y 0.5 % de ClNa.

En otro frasco se colocan 800 cm.³ del mismo caldo y se esterilizan ambos mediá hora a vapor y 10' a 115°.

Ambos se alcalinizan en la forma indicada más arriba. Se añade al primero 9 cm.³ de sol. de glucosa al 10 % y al segundo 14 cm.³ y se siembran ambos con cultivo en agar blando de 6 horas.

A las 13 horas de incubación a 37° se filtran por papel y por bujía Berkefeld y se prueba la toxicidad del filtrado en cobayas por vía endovenosa.

8 - II - 27

Toxicidad del filtrado del caldo con carne	Toxicidad del filtrado del caldo sin carne
0.2 vive	0.5 vive
0.3 + 3 horas	0.8 vive
0.4 + 3 horas	1.8 vive
0.5 + 2 horas	1.5 + 2.45 horas
0.8 + 40'	2 + 30'

Esta experiencia revela que la adición de carne cocida y ya extraída para obtener agua de carne, aumenta la toxicidad del filtrado de *B. Welchii* 5 veces.

La toxicidad es un poco menor que la de las toxinas de de Kruif y de Begnston, pero en otros ensayos hemos alcanzado valores iguales.

b) *Tiempo de incubación*

Bull y Pritchett (9) (10) han determinado que el tiempo óptimo de incubación para la producción de toxina, es de 18-24 horas. La atenuación de la toxicidad en caldos con músculo, adicionados de 0.5 % y 1 % de glucosa es relativamente lenta, pues en algunos casos apenas se nota disminución en 3 días. En 6 días se reduce mucho la toxicidad y llega a veces a ser sólo 1/5 de la máxima.

De Kruif y Bengston incuban por tiempo igual al aconsejado por Bull y Pritchett.

Es general la opinión de que el máximo de toxicidad se alcanza muy rápidamente y siempre antes de las 24 horas de incubación, hecho que, por otra parte, está de acuerdo con los caracteres de cultivo de *B. Welchii*, que desarrolla con una rapidez e intensidad considerables.

En los protocolos que siguen reproducimos los resultados de las experiencias hechas para averiguar la variación de la toxicidad con el tiempo de incubación.

En frascos de 6 litros de capacidad se colocan 3 litros de caldo con peptona Parke 2 % y 0.5 % de cloruro de sodio y 2 kilos de carne molida extraída y cocida.

Una vez esterilizados se alcalinizan con NaOH en la forma ya descripta.

Se enfrían los frascos y se añaden 60 cm.³ de glucosa al 10 % y se siembran con cultivos de *B. Welchii* en agar blando de 30 horas.

Primera experiencia

A las 8 y a las 24 horas de incubación a 37° se filtra un litro por papel y bujía Berkefeld y se prueba la toxicidad en palomas y cobayas.

Toxicidad del filtrado a las 8 horas de incubación a 37°

24 - I - 28

Cobayas (\pm 280 gs.) inyec. endov.	Palomas (\pm 280 gs.) inyec. intram.
1.0 + 2 horas	0.4 vive
1.2 + 55'	0.5 + en la noche
1.5 + 35'	0.6 + en la noche

Toxicidad del filtrado a las 24 horas de incubación a 37°

25 - I - 28

Cobayas (280 gs.) inyec. endov.	Palomas (280 gs.) inyec. intram.
0.8 vive	0.6 vive
1.0 + 24 horas	0.8 vive
1.5 + en la noche	1.0 vive

Al mismo tiempo se hace otra experiencia igual, utilizando el mismo caldo, pero agregándole 2 kilos de carne cruda y molida y esterilizando después.

*Segunda experiencia**Toxicidad del filtrado a las 8 horas de incubación a 37° con carne cruda*

24 - I - 28

Cobayas (\pm 280 gs.) inyec. endov.	Palomas (\pm 280 gs.) inyec. intram.
1.0 + 2.20 horas	0.3 vive
1.2 + 2 horas	0.4 + en la noche
1.5 + 15'	0.6 + en la noche

Toxicidad del filtrado a las 24 horas de incubación a 37° con carne cruda

25 - I - 28

Cobayas (280 gs.) inyec. endov.	Palomas (280 gs.) inyec. intram.
1.0 cm. ³ vive	0.6 vive
1.5 cm. ³ vive	0.8 vive
2.0 cm. ³ +	1.0 cm. ³ vive

Se realiza otra experiencia con el mismo caldo con carne cocida.

*Tercera experiencia**Toxicidad del filtrado a las 13 horas de incubación a 37° con carne cocida*

6 - II - 28

Cobayas (\pm 280 gs.) inyec. endov.	Palomas (\pm 280 gs.) inyec. intram.
0.1 vive	0.07 vive
0.2 + en la noche	0.1 + en la noche
0.3 + 140'	0.2 + en la noche
0.4 + 1 hora	0.3 + en la noche

Toxicidad del filtrado a los 3 días de incubación a 37° con carne cocida

6 - II - 28

Cobayas (280 gs.) inyec. endov.	Palomas (280 gs.) inyec. intram.
1 vive	0.2 vive
1.6 vive	0.4 vive
2 vive	0.8 vive

De estos protocolos se deduce que el tiempo óptimo para la producción de toxina de *B. Welchii* en el medio con carne es inferior a 24 horas. A las 13 horas la toxicidad es igual a la que hallaran De Kruif y Bengston en el tiempo óptimo de 18 - 24 horas.

La enorme diferencia entre los valores de los filtrados de las 13 y las 24 horas hace suponer que el óptimo debe estar más próximo de 13 horas que de 24 horas. Esta suposición está apoyada también por la misma diferencia que hay entre 8 y las 13 horas de incubación. A los 3 días la toxicidad ha desaparecido prácticamente. Nuestros resultados están de acuerdo con los de Henry y Lacey (13), quienes hallan que el máximo de toxicidad se alcanza entre las 12 y 24 horas de incubación y que la alteración es muy rápida, desapareciendo la toxicidad entre el 2º y 3º día.

Al mismo tiempo se ve que la carne extraída y cocida tiene la misma capacidad activante de la formación de toxina que

la carne cruda sin extraer. Este hecho de escasa importancia teórica puede significar una economía apreciable si se considera la cantidad grande de carne que se agrega.

c) *Atenuación de la toxina filtrada conservada a la temperatura de 5°*

Bengston ha estudiado la atenuación de la toxina después de filtrada, habiendo hallado a 5° una disminución a la 1/2 de la toxicidad en los 10 primeros días. Luego la atenuación aunque menos marcada existe siempre. La dosis test para la medición del suero se modifica, pero con mucho menos rapidez que la toxicidad. Este hecho es un indicio de la facilidad con que la toxina del *B. Welchii* debe transformarse en toxoides. Henry y Lacey (13) observan una atenuación muy grande a temperatura ambiente y menor aunque evidente a baja temperatura.

Balones con 300 cm.³ de caldo y 200 grs. de carne se esterilizan; se alcalinizan por adición Na OH estéril en la forma habitual y se agrega después de enfriados a 38°, 6 cm.³ de glucosa al 10 %. La siembra se hace con un cultivo de 22 horas de *B. Welchii* en agar blando. Se toman dos cultivos de la misma cepa M., uno el original de la colección y otro son siete pasajes por paloma. A las 24 horas de incubación a 37° se filtran por papilla de papel y arena seca y estéril y por bujía Berkefeld. Se distribuye la toxina en ampollas de 10 cm.³ que se conservan a 5°.

Medición en paloma (por vía muscular) de la D. M. M. de la toxina perfringens original y 7° pasaje el 14-IX-27 (día de la filtración).

Original		7° Pasaje por paloma	
Cabeza roja	0.15 + 15	Cabeza azul	0.15 vive
Lomo rojo	0.30 + 15	Lomo azul	0.30 + 15
Cola roja	0.50 + 15	Cola azul	0.50 + 15
16-IX-27 (a dos días de la filtración)			
Coja roja	0.15 vive	Cola violeta	0.25 vive
Cabeza roja	0.20 + 17	Cabeza azul	0.30 vive
Lomo rojo	0.30 vive?	Lomo azul	0.40 + 17
Cola roja	0.40 + 17	Cola azul	0.50 + 17

A los doce días de filtradas ambas toxinas son nuevamente medidas en palomas por vía muscular.

26 - IX - 27

Original			7º Pasaje por paloma		
Cabeza roja	0.20	vive	Cabeza azul	0.30	vive
Lomo rojo	0.30	vive	Lomo azul	0.40	vive
Cola roja	0.40	+ 27	Cola azul	0.50	vive

La atenuación en el término de doce días ha sido muy grande, pues la D. M. M. ha aumentado en un caso de 0.15 a 0.40 y en otro de 0.30 a más de 0.50. Esta atenuación indica claramente que la toxina no puede ser empleada como toxina test aún en el caso de que varíe poco la dosis test, pues el número de D. M. M. en cada dosis se reduciría tanto que haría al método poco sensible.

Los protocolos anteriores parecen indicar que el pasaje por un animal sensible no produce aumento del poder toxígeno, sino por el contrario, una disminución.

Esta conclusión no puede considerarse como definitiva, puesto que las toxinas han sido obtenidas por incubación a 37° durante 24 horas, en cuyo tiempo puede haberse atenuado más la toxina de 7º pasaje por haber desarrollado más rápidamente el germen.

d). *Atenuación de la toxina por filtración*

Las toxinas que se usen en la medición de los sueros deben estar exentas de gérmenes para evitar la producción de toxinas en el sitio de la inoculación, pues se introduciría variaciones no controlables que harían imposible toda determinación de la actividad antitóxica de los sueros.

Esta circunstancia es sólo real para el caso de la inoculación muscular o subcutánea, mientras para la vía venosa tiene importancia relativa desde el momento que los gérmenes inoculados en pequeño número difícilmente pueden dar en la sangre origen a nuevas toxinas.

Es un hecho bien probado que la filtración de algunas toxinas por bujía reduce mucho la toxicidad, siendo necesario recurrir a otros medios para esterilizarlas. En el caso del *B.*

Welchii el problema tiene un interés muy grande por la pequeña actividad de la toxina que en general se obtiene.

Bull y Pritchett (9) (10) observaron una atenuación por filtración de la toxina preparada en caldo, mientras que esa atenuación no se observa si se filtra toxina preparada en caldo, con músculo fresco estéril. Este comportamiento tan diferente es muy curioso.

La experiencia que sigue revela que la toxina preparada en un caldo con carne cocida pierde el 50 % de su actividad por filtración a través de bujía Berkefeld.

Un cultivo de 12 horas de *B. Welchii* en caldo con carne cocida, es filtrado por papel plegado e inmediatamente por bujía Berkefeld perfectamente seca y estéril.

Se compara la toxicidad de ambos filtrados inyectando cobayas por vía endovenosa.

6 - II - 28

Filtrado por papel plegado	Filtrado por Berkefeld
0.1 + en 20 horas	0.1 vive
0.2 + 1.40'	0.2 + en la noche
0.3 + 1.40'	0.3 + 1.40'
0.4 + 55'	0.4 + 1 hora

La atenuación de acuerdo con estos datos es muy grande. Aunque este experimento sea objetable porque la toxina filtrada por papel contiene gérmenes vivos que pueden haber contribuido a matar las cobayas, es evidente que la atenuación existe.

e) *Estabilización de la toxina por precipitación*

Henry y Lacey (13) en 1920 para evitar la atenuación de la toxina líquida aconsejan la precipitación de los filtrados estériles de cultivo de *B. Welchii* por sulfato de amonio o por alcohol. El método que les diera mejor resultado fué el de una precipitación previa con sulfato de amonio a saturación, disolución del precipitado y precipitación con 4 volúmenes de alcohol. La toxina obtenida se conserva sin alteración por 11 meses.

Bengston (8) ha observado que la toxina precipitada por sulfato de amonio tiene una estabilidad muy grande, no sólo de la dosis test, sino de la toxicidad, siendo comparable a la toxina tetánica.

Dally, Glenn y Masson y O'Brien (17) en un trabajo reciente dicen que la toxina precipitada por sulfato de amonio es razonablemente estable para ser usada como toxina test en la medición del suero. Nuestros primeros ensayos no nos permitieron obtener toxinas estables, pues en el curso de 30 días la atenuación llegó a 40 % y 60 %. Esta disminución del valor tóxico fué causa suficiente para hacerla inutilizable como toxina test. Después de algunas tentativas hemos podido preparar toxinas de tal estabilidad que en el transcurso de dos meses no fué observada ninguna atenuación.

A continuación se indica la técnica seguida para preparar la toxina precipitada y se incluyen los protocolos que prueban su estabilidad.

En frascos de 6 litros se colocan 2 kilos de carne cocida, y molida y tres litros de caldo con 2 % de peptona P. D. y 0.5 % de Cl Na a pH 8.4. Se esteriliza una hora a vapor y 10' a 115°. Se enfría rápidamente y se agregan estérilmente 60 cm.³ de sol. de glucosa al 10 % y sol. de hidrato de sodio, hasta ligera coloración a la fenoftaleína, tomando en cuenta sólo el volumen del caldo agregado.

Se siembra con cultivo de *B. Welchii* de 24 horas en agar blando y se pone en estufa durante 12 horas, se coloca en heladera 6 horas y se filtra por papel y por bujía. El filtrado tiene un pH comprendido entre 6, 8 y 7.

Se añade hidrato de sodio al 5 % hasta pH 7.8. Se agregan a dos litros de filtrado 1500 grs. de sulfato de amonio puro y se revuelve hasta disolución de la sal. Se recoge el precipitado con una espátula y se lo pone en un cristizador, quitándole la mayor parte del sulfato de amonio por expresión.

El cristizador se coloca en un secador con ácido sulfúrico y se seca al vacío (\pm a 10 mm.) a temperatura ambiente.

A las 24 horas está completamente seco. Se muele en mortero y se tamiza por tamiz 60.

Se envasa en ampollas dobles conteniendo una anhídrido fosfórico y la otra la toxina. Se cierra el vacío (\pm 0.1 mm.) dejando en comunicación las dos ampollas y a los 15 días se separan soldando el tubo de unión. (14) (15).

Medición de la D. M. en cobayas por vía intraperitoneal y en palomas por vía intramuscular.

30 - III - 28

Dosis	Cobayas. Vía intraperitoneal		Palomas. Vía intramuscular	
0.002	889 - 240	vive	Cabeza	vive
0.004	886 - 240	vive	Lomo	vive
0.008	871 - 230	+ 31	Cola	+ 31
0.012	887 - 250	+ 31	Ala	+ 31
0.016	888 - 240	+ 31	Pecho	+ 31

31 - III - 28

Dosis	Cobayas. Vía intraperitoneal		Palomas. Vía intramuscular	
0.004	900 - 240	vive	Cabeza	vive
0.005	829 - 230	vive	Lomo	+ 1
0.006	844 - 250	vive	Cola	+ 1
0.007	851 - 240	+ 1	Pecho	+ 1

La medición de la misma toxina a los 50 días de preparada da los resultados siguientes:

21 - V - 28

Dosis	Cobayas. Vía intraperitoneal		Dosis	Palomas intramuscular	
0.005	312 - 250	vive	0.004	Pecho	vive
0.006	302 - 240	vive	0.005	Cabeza	+ 22
0.007	324 - 250	+ 22	0.006	Lomo	+ 22
0.008	338 - 250	+ 22	0.007	Cola	+ 22
0.010	343 - 230	+ 22	0.008	Ala	+ 22
0.012	336 - 230	+ 22	0.010	Pata	+ 22
			0.012	S. M.	+ 22

II. ELECCIÓN DEL MÉTODO PARA LA VALORIZACIÓN DE LOS SUEROS Y LAS TOXINAS

La determinación de la actividad del suero anti-*perfringens* se hizo en el Instituto Bacteriológico desde el comienzo de su preparación en el año 1921, por un método utilizado por Weinberg (16) que consiste en la determinación de la dosis mínima de suero que neutraliza a 0.25 cm.³ de cultivo de *B. Welchii* en caldo peptonado. Esa dosis es casi siempre superior a 2 D. L. M. e inferior a 4. La cantidad de suero que neutraliza totalmente la acción de esa dosis de cultivo es variable entre 1/100 y 1/300 de cm.³ Los resultados no se pueden reproducir con exactitud y el método, como es natural, sólo permite tener una idea aproximada del valor del suero.

Báll (9) (10) ha utilizado 1 D. M. M. de toxina filtrada y como animal de prueba la paloma por vía i. muscular.

Bengston (8) en el laboratorio de Mc Coy ha usado 10 D. L. M. de la toxina precipitada y estabilizada y como animal la paloma inyectada por vía muscular. La sensibilidad de la paloma y la relativa regularidad de su muerte con 1 D. M. M. de toxina, permiten suponer que el método aconsejado por Bengston debe dar resultados comparables. Debe considerarse este trabajo como la primer tentativa de fijar sobre una base exacta la unidad antitóxica y el método de medida del suero *perfringens*.

En 1918 (Dalling, Glenny, Mason y O'Brien (6) (Special Report Series del M. R. C. N° 39, pág. 120, año 1919), emplean el ratón blanco inoculado por vía intramuscular con la mezcla toxina filtrada y suero.

Los mismos autores en 1928 (17) aconsejan el ratón blanco y también la cobaya por vía intracutánea, que fué usado por Klose (1916) (18) y Glenny y Allen (12) (1921).

Weinberg en su libro sobre la gangrena gaseosa (La gangrène gazeuse, 1918) indica la posibilidad de determinar la actividad del suero anti-*perfringens*, mezclándolo con toxina filtrada e inoculando la mezcla por vía venosa a cobayas o por vía subcutánea a la laucha.

Henry y Weinberg han utilizado la neutralización *in vitro* de la hemotoxina del *B. Welchii* como método de medida de la actividad del suero específico.

En una memoria reciente Dalling, Glenney, Mason y O'Brien, (17) resultado de una investigación proseguida por varios años, dan un resumen que prueba que las mezclas de toxina de *B. Welchii* y su antitoxina, cuando neutras lo son tanto para el ratón blanco por vía venosa o muscular o para la cobaya por vía intracutánea o para los glóbulos rojos *in vitro*. Estos autores aconsejan para la determinación del valor del suero, 10 D. M. M. para ratón blanco por vía venosa, de una toxina precipitada por sulfato de amonio.

En nuestras investigaciones iniciadas y proseguidas sin interrupción por casi dos años hemos estudiado con un criterio parecido al usado por O'Brien y sus colaboradores, este asunto de la elección del método de medida del suero antiperfringens.

La determinación experimental del valor de un medicamento, (del suero antiperfringens en este caso) tiene un sentido práctico cuando el valor obtenido es una medida de su actividad terapéutica o preventiva para la enfermedad humana. En el caso de las enfermedades frecuentes y de marcha más o menos típica y regular es posible comparar los resultados de la medida experimental con los obtenidos en la clínica y deducir después de un estudio prolijo y con un número grande de casos, si el método de medida tiene la justificación que da la experiencia en el hombre.

En el caso que nos ocupa no hay probabilidad de recurrir a ese criterio por cuanto las gangrenas gaseosas son muy raras.

Por otra parte, como la gangrena gaseosa humana (por lo menos la que es consecuencia de un traumatismo) se puede imitar de una manera casi perfecta en los experimentos en animales, los resultados de la experiencia tienen en este caso gran probabilidad de ser aplicables al hombre.

El plan desarrollado ha sido el siguiente:

- a) Determinación de la dosis letal mínima para distintas especies.
 - b) Toxicidad de mezclas de toxina y antitoxina para distintas especies.
 - a) Elección de la especie y vía y de la dosis test de toxina.
- a) *Determinación de la dosis mortal mínima para distintas especies*

La toxina precipitada, secada en vacío con ácido fosfórico se disuelve en el momento de usar en solución fisiológica y se

inyecta. El volumen de líquido inyectado ha sido constante para cada vía en cada especie.

Cobaya. Se inocula: por vía venosa (utilizando la yugular), por vía peritoneal y por vía muscular, subcutánea, e intracutánea. La inyección venosa debe ser muy lenta, pues de lo contrario muchos animales sucumben inmediatamente.

Paloma. Se inocula: por vía venosa (vena axilar) y por vía muscular en los músculos pectorales.

Ratón blanco. Se inocula: por vía venosa, vía intraperitoneal e intramuscular. Las inyecciones endovenosas se hacen por las venas de la cola con la técnica de Dale.

El valor de la D. M. M. encontrado está consignado en este cuadro.

D. M. M. toxina <i>perfringens</i> IV		Peso del animal
Cobaya intrap.	g 0.006 (en 2 cm. ³)	(300 grs.)
„ venosa	g 0.004 (en 2 cm. ³)	(300 grs.)
Paloma intramuscular	g 0.004 (en 2 cm. ³)	(300 grs.)
„ intrav.	g 0.0008 (en 2 cm. ³)	(300 grs.)
Ratón blanco intrap.	g 0.0008 (en 1 cm. ³)	(20 grs.)
„ „ intrav.	g 0.0005 (en 1 cm. ³)	(20 grs.)
D. R. subc. cobayas (1)	g 0.0008 (en 1 cm. ³)	—
„ intracut. „	g 0.0001 (en 0.2 cm. ³)	—

La mayor regularidad ha sido observada en cobayas por vía peritoneal y en palomas por vía muscular.

El protocolo que sigue prueba la regularidad de la muerte de las cobayas inyectadas por vía intraperitoneal.

Dosis	RESULTADO	
	Viven	Mueren
4 mg.	5	0
5 mg.	6	1
6 mg.	0	6

(1) D. R. Dosis límite que produce reacción.

La muerte sobreviene a las pocas horas (siempre antes de las 24) lo que permite una observación rápida. Además las lesiones presentan caracteres suficientemente típicos para que se las pueda reconocer fácilmente.

Los protocolos siguientes del Dr. Jiménez de Asúa dan idea de la naturaleza y extensión de las lesiones.

Animales estudiados. Inyección intraperitoneal

Cobaya 739	Inyectada con 0.005	(1 D. M. M.)	muerta a las 11 horas de la iny.
" 729	" " 0.0075	(1 ½ ")	" " 8 " " "
" 740	" " 0.015	(3 ")	" " 5 " " "

Inyección intravenosa

Cobaya 741	Inyectada con 0.004	(1 D. M. M.)	muerta a las 4 horas de la iny.
" 743	" " 0.006	(1 ½ ")	" " 1 ½ " " "
" 742	" " 0.012	(3 ")	" " 1 ½ " " "

NECROPSIA. *Meninges y cerebro*, con vasos bien dibujados llenos de sangre.

Cavidad torácica: corazón grande en diástole. *Cavidad pleural* con pequeña cantidad de líquido sanguinolento. *Pulmones* rojo oscuro o negruzco, retraídos, muy poco aireados, especialmente en los animales inyectados por vía intraperitoneal (quizá debido a ser más tardía la muerte). *Cavidad abdominal* con pequeña cantidad de líquido sanguinolento. *Tubo digestivo* congestionado. *Hígado* de color rojo oscuro. *Bazo* algo aumentado de volumen y de color negruzco. *Riñones* muy congestionados. *Cápsula suprarrenal* muy amarilla en su porción cortical.

EXAMEN MICROSCÓPICO. *Cerebro*: no se observan otras alteraciones que la congestión. Es de notar, sin embargo, que no se realizó una investigación detenida ni se aplicaron otros métodos que los generales.

Corazón. Miocardio normal. Vasos dilatados y llenos de sangre. *Pulmones y bronquios.* Algunos bronquios presentan descamación del epitelio, hallándose su luz llena de detritus. Los pulmones poseen una textura casi compacta, pues debido a la enorme dilatación capilar los alvéolos se hallan estrechados.

Dentro de los vasos, repletos de hematíes se encuentran abundantes células con glóbulos rojos incluidos; los leucocitos polinucleares no son muy numerosos.

Hígado. Células hepáticas de ordinario bien conservadas, hallándose los cordones celulares algo separados debido a la di-

latación de los capilares intralobulillares que se encuentran llenos de sangre. En algunas células de Kupffer existen hematíes fagocitados. En los animales cuya muerte ha sido más tardía pueden encontrarse focos necrobióticos circunscriptos preferentemente localizados en la periferia de los lobulillos.

Bazo. Foliculos pequeños. Pulpa muy congestionada, rica en células grandes, vacuoladas cargadas de eritrocitos. Ausencia de pigmentos hemáticos.

Riñón. Epitelio de ordinario bien conservado, pues sólo en algunos tubos se observa una moderada descamación de las células. Vasos dilatados llenos de sangre. Asas glomerulares muy dilatadas estando por ello los glomérulos aumentados de volumen.

Suprarrenales. Aparte de la congestión debe mencionarse la gran riqueza de lipoides en la cortical.

Resumen. Congestión intensa de todas las vísceras. Eritrofagocitosis espleno-hepática en su fase inicial (ausencia de productos de desintegración de la hemoglobina). Notable esteatosis suprarrenal. En algunos casos lesiones necrobióticas circunscritas al hígado.

La toxicidad para cobaya por vía muscular ha sido muy pequeña y la muerte se ha producido en forma tan irregular que no ha sido posible establecer la D. M. M.

En el ratón blanco por vía muscular hemos observado una pequeña toxicidad descartando su uso desde las primeras experiencias.

La vía subcutánea en la cobaya ha revelado poca sensibilidad, pues la reacción local se ha observado con poca diferencia de intensidad a pesar de duplicar la dosis inyectada.

Igual puede decirse de la vía intracutánea, pues la reacción no crece en proporción de la dosis de toxina y se requiere para diferenciar una reacción dudosa de una positiva una dosis de toxina que varía de 1 a 2.

Los resultados más regulares fueron obtenidos sin duda alguna por inoculación intraperitoneal de la cobaya.

b) *Toxicidad de mezclas de toxina y antitoxina para distintas especies*

Con el fin de apreciar la sensibilidad y la regularidad del comportamiento de las distintas vías de las distintas especies, se prepararon mezclas de suero y toxina y de cada mezcla se

inyectaron animales con una cantidad proporcional a la D. M. M. para cada vía y cada especie.

Con esta precaución puede decirse que la probabilidad de intoxicación es proporcional a la cantidad de toxina que no ha sido neutralizada por el suero, y que las diferencias que puedan observarse deben ser imputables o a una distinta neutralización de los diferentes constituyentes tóxicos de la toxina, o a una diferencia de avidez o a un fenómeno semejante al que se observa con las mezclas de toxinas y antitoxina diftérica inyectadas por vía subcutánea o venosa.

Las experiencias fueron hechas con cobayas (vía venosa y peritoneal) ratones blancos (vía venosa y peritoneal) y palomas (vía muscular y venosa).

Con tres sueros anti-*perfringens* desecados en corto tiempo (en vacío sulfúrico, más o menos en media hora), pulverizados, tamizados y desecados sobre anhídrido fosfórico en vacío, se hacen soluciones con glicerina al 66 % y se preparan mezclas que contienen para una misma cantidad de toxina cantidades variables de suero.

Los intervalos se eligen de acuerdo con la sensibilidad que esperábamos del método.

Se adopta como cantidad de toxina la que corresponde a 5 dosis mortales mínimas para cada una de las especies. De acuerdo con el cuadro de pág. 17, las dosis de toxina inyectadas fueron:

CUADRO A

Cobaya i. peritoneal	0.006 × 5 = 30 mg.
„ i. venoso	0.004 × 5 = 20 mg.
Paloma i. muscular.....	0.004 × 5 = 20 mg.
„ i. venoso	0.0008 × 5 = 4 mg.
Ratón blanco i. peritoneal.....	0.0008 × 5 = 4 mg.
„ „ i. venoso	0.0005 × 5 = 2.5 mg.

Las mezclas usadas fueron para el suero 890

De 100 mg. de toxina + 25 mg. de suero
„ „ „ „ „ + 30 „ „ „
„ „ „ „ „ + 35 „ „ „

Para el suero 522

De 100 mg. de toxina	+	6 mg. de suero
" " " " "	+	7 " " "
" " " " "	+	8 " " "
" " " " "	+	9 " " "
" " " " "	+	10 " " "

Para el suero 359

De 100 mg. de toxina	+	7 mg. de suero
" " " " "	+	8 " " "
" " " " "	+	9 " " "
" " " " "	+	10 " " "

Todas estas mezclas se completan a un volumen de 10 cm.³ y de cada una se inyectan volúmenes que contienen las cantidades de toxina indicadas en el cuadro A para cada especie y cada vía. Los resultados están en los protocolos que siguen. Se han excluido los resultados de las pruebas por vía intra y subcutánea en las cobayas por no tener certeza de la exactitud de nuestras observaciones, que no están de acuerdo con las comunicadas por otros autores.

SUERO 809

		2.5 mg.	3 mg.	3.5 mg.
Cobaya (peritoneal)	{ mueren	4	4	—
	{ viven	—	3	7
Cobaya (venosa)	{ mueren	4	3	—
	{ viven	—	4	7
Ratón blanco (peritoneal)	{ mueren	1	5	—
	{ viven	1	2	7
Ratón blanco (venosa)	{ mueren	1	2	2
	{ viven	1	5	5
Paloma (muscular)	{ mueren	2	2	1
	{ viven	—	5	6
Paloma (venosa)	{ mueren	2	1	—
	{ viven	—	6	8

SUERO 522

		6 mg.	7 mg.	8 mg.	9 mg.	10 mg.
Cobaya (peritoneal).....	{mueren	4	4	1	—	—
	{viven	—	3	8	7	2
Cobaya (venosa).....	{mueren	4	7	6	1	—
	{viven	—	—	3	6	2
Ratón blanco (peritoneal)....	{mueren	—	—	1	5	—
	{viven	—	—	6	2	7
Ratón blanco (venosa).....	{mueren	—	—	2	3	2
	{viven	—	—	5	4	5
Paloma (muscular).....	{mueren	—	—	4	1	7
	{viven	—	—	3	6	7
Paloma (venosa).....	{mueren	—	—	5	3	—
	{viven	—	—	2	4	7

SUERO 359

		7 mg.	8 mg.	9 mg.	10 mg.
Cobaya (peritoneal).....	{mueren	2	4	5	1
	{viven	1	2	4	6
Cobaya (venosa).....	{mueren	3	3	7	7
	{viven	—	1	2	4

a) Elección de especie, vía y de dosis test de toxina

Salvo pequeñas diferencias, la misma mezcla ha sido igualmente tóxica para especies distintas, lo que parece indicar que la toxina actúa de una manera semejante en todos los casos y que la neutralización se realiza de una manera siempre igual. Esto equivale a decir que la toxina se comporta para esas especies como si fuera una toxina única y que el suero tiene una sola componente, específica para dicho tóxico.

Las diferencias observadas entre la sensibilidad de los animales de la misma especie inyectados por diferentes vías, también han sido pequeñas, y apoyan por lo tanto la suposición anterior.

Este comportamiento de la toxina de *B. Welchii* y de su antitoxina simplifica mucho el problema de su medición y lo reduce prácticamente a un caso semejante al de la toxina diftérica o tetánica y sus sueros antitóxicos. Además, permite suponer que la intoxicación humana será paralizada de manera semejante y en proporción de la cantidad de antitoxina que se inyecte. La objeción principal a esta manera de considerar el problema reside en la posible diferencia entre la toxina preparada *in vitro* y la que el *B. Welchii* engendra en los tejidos.

En los protocolos anteriores se ve que la mayor regularidad existe para las cobayas inyectadas por vía peritoneal. Habiendo decidido definitivamente el empleo de esa especie y de la vía peritoneal de inyección, tratamos de averiguar si las diferencias entre los resultados obtenidos por distintas dosis de suero podían hacerse más claros aumentando la dosis de toxina. La experiencia seguramente prueba que eso ha sucedido.

La variación observada en el porcentaje de los animales que sobreviven o que mueren, al variar la cantidad de suero, es mucho mayor para 10 que para 5 D. M. M. Este aumento de la sensibilidad del método es tan apreciable que a pesar de la mayor cantidad de toxina que se debe usar, hemos decidido emplear como dosis test la que corresponde a 10 D. M. M.

La repetición de experiencias semejantes a las protocolizadas en los cuadros anteriores, nos han dado la certeza de que con esa dosis y con un solo animal se puede apreciar una variación del 10 % de actividad del suero.

Cobayas inoculadas por		2.5 mg.			
		5		10	
		D	M	M	M
Vía peritoneal	Mueren	4	—		
	Viven	0	—		
Vía venosa	Mueren	4	—		
	Viven	0	—		

SUERO 809

Dosis de suero usada para cada 100 mg. de toxina IV.

3.0 mg.		3.5 mg.		4 mg.		5 mg.	
5 D M M	10 D M M	5 D M M	10 D M M	5 D M M	10 D M M	5 D M M	10 D M M
4	2	0	0	—	0	—	0
3	0	7	4	—	2	—	2
3	—	0	2	—	1	—	0
4	—	7	0	—	1	—	2

Cobayas inyectados por		6 mg			
		5		10	
		D	M	M	M
Vía intraperi- toneal	Mueren	4	—		
	Viven	0	—		
Vía venosa	Mueren	4	—		
	Viven	0	—		

Marzo 1929

A. SORDELLI, F. JIMÉNEZ DE ASÚA Y J. FERRARI

SUERO 522

Dosis de suero usada para cada 100 mg. de toxina IV.

7 mg.			8 mg.			9 mg.			10 mg.			12 mg.			
5	10		5	10		5	10		5	10		5	10		
D	M	M	D	M	M	D	M	M	D	M	M	D	M	M	
4	—		1	—		—			4			0	0	—	0
3	—		8	—		7			0	2	4	—		2	
7	—		6	—		1		2	0		2	—		0	
0	—		3	—		6		0	2		0	—		2	

Cobayas inyectadas por		7 mg.	
		5	10
		D M M	D M M
Vía intrape- ritoneal	Mueren	3	—
	Viven	1	—
Vía venosa	Mueren	3	—
	Viven	0	—

SUERO 359

Dosis de suero usada para cada 100 mg. de toxina IV.

8 mg.		9 mg.		10 mg.		12 mg.	
5	10	5	10	5	10	5	10
D M M	D M M	D M M	D M M	D M M	D M M	D M M	D M M
4	—	5	0	1	0	—	0
2	—	4	4	6	4	—	2
3	—	7	0	1	1	—	0
1	—	2	2	4	1	—	2

RESUMEN

El estudio de las condiciones en que se puede producir una toxina de *B. Welchii* activa, nos ha conducido a adoptar la técnica de De Kruif, Adams e Ireland y que ha utilizado Bengston con resultados favorables. El medio está constituido por un caldo común alcalino pH 8.4, al que se agrega carne molida cocida, ya usada para preparar agua de carne (medio conocido como de Tarozzi o de Kitt), en la proporción de 600 gramos, para un litro de caldo. Esta mezcla se esteriliza a 100° una hora y a 120° 15'. Después de la esterilización se alcaliniza a pH 7.6 y se agrega 2 % de glucosa estéril. Se siembre un cultivo en agar blando de *B. Welchii* de pocas horas (8 a 24 horas) y se incuba por un tiempo inferior a 24 horas. En nuestros ensayos el tiempo necesario para llegar a la toxicidad mayor está comprendido entre 12 y 24 horas. Después la toxicidad disminuye considerablemente y a los 3 días el caldo es atóxico.

La filtración por bujía Berkefeld permite obtener una toxina medianamente activa, pues la toxicidad se reduce a la mitad por filtración por la bujía.

La D. M. M. de estos filtrados es de 0.15 cm.³ para la paloma de 300 grs. por vía intramuscular.

La toxina líquida conservada en la heladera ($\pm 5^\circ$) se atenúa de manera considerable y a los 12 días sólo tiene una mitad de la actividad.

La estabilización de la toxina se consigue fácilmente por precipitación con sulfato de amonio (Henry, O'Brien, Bengston). La técnica adoptada por nosotros es la siguiente: el filtrado se alcaliniza hasta pH 7.8 y se agrega sulfato de amonio purísimo hasta saturación. El precipitado se recoge inmediatamente, se coloca en un cristizador, se exprime la mayor parte del sulfato de amonio y se seca en vacío sobre ácido sulfúrico a temperatura ambiente. Al día siguiente la toxina está seca. Se la pulveriza, tamiza y conserva en ampollas con anhídrido fosfórico en vacío, en la obscuridad y a baja temperatura. En dos meses no se observó ninguna alteración de la toxicidad.

La determinación de la dosis mortal mínima para distintas especies, por distintas vías dió los siguientes valores. Cobaya, vía peritoneal, 6 mgs.; vía venosa, 4 mgs.; paloma: vía mus-

cular, 4 mgs.; vía venosa, 0.8 mgs.; ratón blanco, vía peritoneal, 0.8 mgs.; vía venosa 0.5 mgs.

Las cobayas y palomas pesaban 280 - 300 grs. y los ratones blancos 20 grs. Las cobayas inyectadas por vía muscular dieron resultados muy irregulares.

En el estudio de la neutralización de la toxina por el suero específico se ha podido establecer que si se inyecta de una misma mezcla una cantidad tal que contenga 5 dosis mortales mínimas para cada especie, la toxicidad es prácticamente la misma para todos (cobayas, ratón blanco y paloma).

Igual conclusión se saca si se comparan vías distintas en la misma especie.

Las pequeñas diferencias observadas no tienen importancia para el problema que nos ocupa, aunque es en general evidente una mayor toxicidad de la misma mezcla por vía venosa que por vía peritoneal o muscular.

La especie que permitiera obtener resultados de mayor regularidad ha sido la cobaya inoculada por vía intraperitoneal.

Elegida la cobaya como animal de prueba y la vía peritoneal para la inyección, se investigó si una dosis de toxina igual a 10 dosis mínimas mortales permitía obtener resultados más netos. La experiencia probó que en efecto las 10 mínimas mortales dan resultado de mayor sensibilidad y precisión que 5.

Hemos elegido, en consecuencia, como base para la medición del suero *perfringens* una dosis test de toxina que contiene 10 dosis mortales para la cobaya inyectada por vía peritoneal. La muerte con mezclas tóxicas sobreviene siempre antes de las 24 horas. Raro es el animal que sucumbe después de este tiempo.

Las lesiones descritas someramente más abajo son bastante características para presumir que la intoxicación con toxina de *B. Welchii* es causa de la muerte.

Congestión intensa de todas las vísceras. Eritrofagocitosis esplenohepática en su fase inicial (ausencia de productos de desintegración de la hemoglobina). Notable esteatosis suprarrenal. En algunos casos lesiones necrobióticas circunscriptas al hígado.

Con estos antecedentes queda suficientemente fundado el método de determinación de la actividad antitóxica del suero anti-*perfringens* que puede resumirse así: *toxina*: precipitada por sulfato de amonio y conservada en vacío seco. *Animal de*

prueba: cobaya de 250 - 300 grs. *Vía*: intraperitoneal. *Dosis de toxina*: por lo menos deberá contener 5 D. M. M. *Suero test*: desecado al vacío, pulverizado y conservado en vacío seco. Disuelto en glicerina (66 partes) y solución fisiológica (33 partes).

Valoración del suero "test". La dosis "test" de toxina (en el primer caso 10 dosis mortales mínimas), se mezclan con dosis diferentes de suero "test." Se completa a un volumen de 2 cm.³ y se deja a temperatura ambiente por media hora. Inyección peritoneal a la cobaya. Observación a las 24 horas. La dosis de suero "test" que se elige es la mayor que no ha sido capaz de neutralizar la toxina. *Valoración de la toxina "test."* Con la dosis de suero así fijada, se determina la dosis "test" (de la misma o de una nueva toxina) de la misma manera que se hizo para el suero eligiendo la menor dosis de toxina que ha dado una mezcla tóxica. La determinación del valor de un suero se hace de acuerdo con la técnica corriente usada por los sueros tetánico y diftérico.

La elección de la unidad es una cuestión ajena como se comprende al método de medición, y debe estar determinada por la actividad de los sueros, que como se sabe no se puede variar a voluntad, y por la dosis que se juzgue necesaria para el tratamiento o la prevención de la gangrena producida por el *B. Welchii* en el hombre.

BIBLIOGRAFIA

1. — SORDELLI A. Sobre la flora anaerobia de Buenos Aires. Revista del Instituto Bacteriológico. t. 3, p. 37. Año 1923.
 - » » Flora anaerobia de Buenos Aires. *III Conferencia Sud Americana de Higiene. Microbiología y Patología.* Montevideo. t. I. p. 65. Año 1923.
 - » » Suero antigangrenoso polivalente. *III Conferencia Sud Americana de Higiene. Microbiología y Patología.* Montevideo. t. I. p. 86. Año 1923.
 - » » Suero antigangrenoso. *Semana Médica.* t. XXIX. p. 121. Año 1922.
2. — HALL I. C. A. cause of Malignant edema in man. *Bacillus Sordellii.* Journal of infectious diseases. Vol. 41, N° 5, pp. 329-335. Año 1927.
3. — MELENEY, HUMHREYS AND CARP. Pathogenic Anaerobic Bacillus Not Hitherto Described Cultured From Fatal Operative Wound Infection. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* Vol. XXIX. pp. 675-677. Año 1927.
4. — MELENEY, HUMHREYS AND CARP. An Unusual Fatal Operative Wound Infection Yielding a Pathogenic Anaerobe of the Gas Gangrene Group

- Not Hitherto Described. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*. p. 775, Año 1927.
5. — HUMPHREYS AND MELENEY. The Identity of *C. oedematoïdes* and *B. Sordellii*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Vol. 25, p. 611. Año 1928.
 6. — Medical Research Committee 1919. Report on the Anærobic Infections of Wound and the Bacteriological and Serological Problem. *Special Reports Series* 39.
 7. — DALLING AND MASON. Immunisation against *B. Welchii*: titration of toxin and antitoxin. *Journal of Pathology and Bacteriology*. t. 29, p. 129. Año 1926.
 8. — BENGSTON I. Standardisation of gas gangrene antitoxin. *Hygienic Laboratory Bulletin* N° 122, p. 13. Año 1920.
 9. — BULL AND PRITCHETT. Identity of the toxins of different strains of *B. welchii* and factors influencing their production *in vitro*. *Journal of Experimental Medicine*. Vol. 26, p. 867. Año 1917.
 10. — BULL AND PRITCHETT. Toxin and antitoxin of and protective inoculation against *B. Welchii*. *Idem*. Vol. 26, p. 119. Año 1917.
 11. — DE KRUIF ADAMS AND IRELAND. The toxin of *Bacillus Welchii*. The production by various strains. *Journal of Infectious Diseases*. Vol. 2, p. 587. Año 1917.
 12. — GLENNY AND ALLEN. *Journal of Pathology and Bacteriology*. Vol. 24, pág. 61. Año 1921.
 13. — HERBERT HENRY AND MARGARET LACEY. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. Vol. 23, p. 273. Año 1920.
 14. — *Hygienic Laboratory Bulletin*. N° 21. Año 1912.
 15. — OTTO UND HETSCH. Die Prüfung und Wertbemessung etc. *Arbeiten aus dem Institut für Experimentelle Therapie*. Heft 19. Año 1927.
 16. — WEINBERG ET SEGUIN. La gangrène gazeuse. Masson. Paris 1918.
 17. — DALLING GLENNY MASON O'BRIEN. The testing and Standardisation of *B. welchii*. (*Perfringens*) Antitoxin. *The British Journal of Experimental Pathology*. Vol. 9, p. 43. Año 1928.
 18. — KLOSE. Ueber Toxin und Antitoxinversuche mit dem Fränkelschen Gasbrandbacillus. Vol. 63. p. 723. Año 1916.