

## La participación de las toxinas $\alpha$ y $\theta$ en la patogenicidad y la inmunidad de la infección por *B. perfringens* A

Por A. SORDELLI, A. MANZULLO, R. NAVARRO VIOLA,  
J. P. FERRARI y C. DESIMONE

---

### INDICE

- Introducción.
  - Obtención de toxinas  $\alpha$  y  $\theta$ .
  - Las toxinas  $\alpha$  y  $\theta$  como factores de agresión.
  - Preparación y titulación de los sueros anti  $\alpha$  y anti  $\theta$ . Elección de la unidad  $\theta$ .
  - La protección pasiva por los sueros anti  $\alpha$  y anti  $\theta$  y su acción combinada.
  - La protección pasiva por inmunización con toxina  $\alpha$  y toxina  $\theta$ .
- 

La especie *B. perfringens* está constituida por varios tipos que se diferencian principalmente por la naturaleza de sus toxinas, por las enfermedades que producen y por su epidemiología. De ellas sólo una tiene importancia como agente de enfermedad humana, pues produce la gangrena gaseosa y es supuesto como factor etiológico de la toxemia de la obstrucción intestinal aguda. Se la designa como *B. perfringens* A (*Cl. perfringens*, A, *Cl. welchii* A).

La toxina engendrada por esta bacteria es compleja y está constituida por lo menos por dos factores principales que son producidos por todas las cepas, además de un tercer componente encontrado hasta ahora en una sola.

La designación de esas toxinas ha conducido a alguna confusión y desacuerdo, del que ha sido, entre otros, autor involuntario uno de los que escriben este artículo (8). Por el momento se puede considerar resuelta satisfactoriamente esta cuestión.

En el cuadro siguiente puede verse expuesto en forma esquemática lo mencionado más arriba.

NOMENCLATURA, AUTOR Y AÑO

Factor tóxico	Wilsdon F. (1) (2) W (1931-1933)	Glenny et al (3) Llewellyn Smith (4) Mc. Farlane (5)	Prigge (6, 7)	Ipsen (8) et al (9)	Dalling Stephens (10) Oakley (11)
1	— W (1931-33)	α (1933)	ζ (1936)	ζ (1939)	α (1942)
2	—	θ (1941)	α (1936)	α (1939)	θ (1942)
3	—	—	—	η (1939)	η (1943)

La nomenclatura que usaremos en este trabajo es la que figura en la última columna.

Las propiedades más destacadas de esas tres toxinas, que son antigénicamente diferentes, se pueden resumir de la siguiente manera:

Toxina	Acción hemolítica	Acción sobre piel	Acción letal	Acción sobre lecitina	Actividad aumentada por Ca <sup>++</sup>	Destrucción por O <sub>2</sub>	Destrucción por calor
α	+	Necrosis +++	++	+	+	+*	±
θ	+++	Necrosis +	++	0	0	+++ reversible	+
η	0	0	+	0	—	—	—

(\*) Surface denaturación, probablemente irreversible.

La complejidad de la toxina producida por *B. perfringens* A está documentada en muchos trabajos [ver el resumen crítico de Oakley (11)], 1943 (\*), pudiéndose considerar a Schnayerson y Samuels (12) (1930), como los primeros que demostraron la existencia de dos toxinas. Wuth (13) en 1923 descubrió ciertas propiedades de la toxina θ producida por *B. perfringens* A y Neill (14) (1926) extendió el estudio de esa toxina. Prigge en 1936 (6, 7) pudo sepa-

(\*) Al citar a Sordelli Ferrari, y Jiménez de Asúa, p. 787, Oakley dice que estos autores trabajaban con toxinas de poco valor e inestables. Se trata de una interpretación equivocada de nuestro trabajo (Rev. Inst. Bact.) (15). Las toxinas preparadas hace 16 años aún conservan bien su actividad y son bastante potentes.

En cuanto a la complejidad de las toxinas, Sordelli y Ferrari (16) encontraron que no había paralelismo entre acción antitóxica (letal) y antihemolítica; además Sordelli [citado por Weinberg, ver Oakley, p. 791, «Folia Biol.» (17)] ha demostrado la heterofilia entre *B. hemolyticus* y *B. perfringens* aduciendo argumentos fundados en la complejidad de los factores de agresión de *B. perfringens*.

rar del mismo filtrado dos antígenos tóxicos diferentes  $\zeta$  y  $\alpha$  e Ipsen, Llewellyn Smith y Sordelli <sup>(8)</sup> (1939) confirmaron la existencia de tales toxinas usando la nomenclatura de Prigge. Ipsen y Davoli <sup>(9)</sup> (1939) encuentran que la cepa Lechien de Weinberg produce un factor tóxico distinto de  $\zeta$  y  $\alpha$  ( $\alpha$  y  $\theta$ ) según la nomenclatura usada en este trabajo que designa toxina  $\eta$ .

La complejidad de la toxina del *B. perfringens* A plantea inmediatamente problemas importantes de orden práctico, tales como la necesidad de conocer la constitución de las toxinas de prueba y la de saber la importancia de las diferentes toxinas en la patogenia e inmunidad de las enfermedades producidas por el *B. perfringens* y como consecuencia cuál debe ser la naturaleza del suero antiperfringens y de la vacuna de uso humano.

El programa de estudio para la solución de estos problemas aparece claramente indicado y fué cumplido de la siguiente manera:

- 1) a) Obtención de toxina  $\alpha$  muy activa libre de  $\theta$ .  
b) Obtención de toxina  $\theta$  muy activa libre de  $\alpha$ .
- 2) Estudio comparativo de la acción de agresina de las toxinas  $\alpha$  y  $\theta$ .
- 3) Preparación y titulación de sueros  $\alpha$  y  $\theta$ . Elección de la unidad  $\theta$  y del método de titulación.
- 4) Los sueros  $\alpha$  y  $\theta$  en la protección pasiva de la infección experimental.
- 5) La inmunización activa  $\alpha$  y  $\theta$  en la infección experimental.

#### 1) OBTENCIÓN DE TOXINA $\alpha$ MUY ACTIVA LIBRE DE TOXINA $\theta$

La literatura contiene un número apreciable de trabajos que tratan de la producción de toxina Perfringens pero recién en los últimos tiempos se han orientado decididamente a la obtención de toxinas puras.

La prueba de la existencia de dos toxinas en los filtrados de Perfringens dada por Prigge <sup>(6, 7)</sup> (1936) le indujo a obtenerlas por separado. Fracasó en su intento de conseguirlo por el uso de cepas o de colonias seleccionadas y también por el empleo de medios de constitución diferente [Prigge <sup>(7)</sup>, 1937, pág. 458]. Stewart y Clampit <sup>(18)</sup> en 1938 comunican que los filtrados de cultivos en caldo peptonado con 10 % de carne molida no contienen hemolisina para glóbulos de oveja (toxina  $\theta$ ) mientras el cultivo en el caldo sin carne molida la contiene. La toxina hemolítica ( $\theta$ ) es retenida por membranas de colodio de 50  $\mu$  y los filtrados contienen sólo toxina  $\alpha$ . Stewart <sup>(19)</sup> ha demostrado que la carne agregada al cal-

do peptonado, por acción de los lípidos que contiene permite obtener toxinas  $\alpha$  libres de  $\theta$  [ver también Seal (<sup>20</sup>)]. Turner, Ealey y Prodwell (<sup>21</sup>) por cultivo de *B. perfringens* en medios de cerebro han observado que esa bacteria pierde la propiedad de producir toxina  $\theta$  conservando inalterada la de dar toxina  $\alpha$ .

V. Heyningen (<sup>22</sup>) ha comunicado que los glóbulos rojos en frío absorben la toxina  $\theta$  solamente y Hewitt y Todd (<sup>23</sup>) que el colesterol absorbe completamente la toxina  $\theta$  del estreptococo. Mason y Glennly parecen haber usado una toxina  $\alpha$  sin  $\theta$  y según Oakley y Warrack (<sup>25</sup>) (1941), las toxinas de Glennly no contenían más que el factor  $\alpha$  y por ello la titulación de la actividad del suero anti-perfringens por la neutralización in vitro coincidía (para esos autores) con la titulación in vivo. Sordelli y Ferrari (<sup>17</sup>) no encuentran tal coincidencia y debieron usar toxinas mixtas  $\alpha$  y  $\theta$ . Estas toxinas eran preparadas con medios análogos a los usados por Stewart y conteniendo mucha carne molida. En los ensayos hechos para obtener una toxina  $\alpha$  activa y prácticamente libre de  $\theta$  hemos seguido en líneas generales las indicaciones de De Kruif, Bengston, Sordelli, Jiménez de Asúa, Ferrari y las de Stewart y de Seal. La cepa usada en todo este trabajo fué la 107 (conocida en general como 107 S) pasada repetidas veces por cobayo en inyección intramuscular.

*La técnica de preparación es la siguiente:* A una parte de carne desgrasada y molida se le agrega dos partes de agua corriente y se hierve durante 30'; se filtra por papel mojado. Al agua de carne se agrega 2 ‰ de  $\text{POH}_4\text{Na}_2$ , 4 ‰ de  $\text{ClNa}$  y 2 ‰ de Peptona Parke Davis. Se alcaliniza con  $\text{NaOH}$  hasta pH 8.4 (\*) y se vierte sin filtrar en frascos Erlenmeyer de dos litros que contienen 180 gramos de carne molida previamente extraída por ebullición con agua, secada rápidamente.

El medio de cultivo se esteriliza a 115° durante 20' y se enfría hasta 40° rápidamente en agua, sin agitarlo. Se agrega 120  $\text{cm}^3$  de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  al 10 ‰ esterilizado por filtración por bujía y 60  $\text{cm}^3$  de glucosa estéril al 50 ‰. Es decir que el medio contiene 1 ‰ de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  y 1 ‰ de glucosa.

*Cultivo de siembra:* Se usa de preferencia la cepa conservada en vacío o en medio de Tarozzi y se la siembra la noche anterior en tubos de Hall con 50  $\text{cm}^3$  de medio constituido por el «caldo básico», también sin filtrar, y esterilizado a 115° durante 20'. No lleva adición de bicarbonato de sodio ni de glucosa.

(\*) Este caldo es designado «caldo básico».

*Preparación de la toxina:* Se siembra el medio de cultivo descrito con 25 a 50 cm<sup>3</sup> del cultivo de siembra y se incuba a 37°; el desarrollo comienza a la hora y la incubación se prolonga hasta que cese de producir gas, lo cual ocurre a la 5ª hora más o menos. El medio se agita repetidas veces desde el momento en que comienza el desarrollo. Al término de 5 ó 6 horas la toxina tiene su máxima toxicidad; se filtra por bujía.

La filtración por bujía es una operación larga y difícil que conviene facilitar por centrifugación y luego por filtración por papilla y supercel.

PROPIEDADES DE LA TOXINA. — a) *Hemolisinas.* — Los filtrados carecen por lo general de acción hemolítica pues ni en la dosis de 0,05 cm<sup>3</sup> son capaces de producir hemólisis de 0,5 cm<sup>3</sup> de glóbulos de oveja al 5% por incubación de 30' a 37°; la hemólisis aparece recién por enfriamiento y en general es completa hasta con la dosis de 0,001 cm<sup>3</sup> cuando se coloca los tubos incubados a 37° durante 30', en agua a 0° durante 1 hora, agitando varias veces. Este fenómeno de la hemólisis por enfriamiento es bien conocido para la toxina  $\alpha$  y fué ya observado sin duda por Glenny al dejar los tubos en el laboratorio por una noche una vez que hubieron sido incubados a 37°. Se lo conoce para la  $\beta$  hemolisina del estafilococo y para la hemolisina de *B. hemolyticus* como fué descrita por Sordelli, Suárez y Ferrari (26) (1930).

Oakley y Warrack (25) han demostrado que el Ca es indispensable para que se produzca la hemólisis por la toxina  $\alpha$  y en consecuencia todos los aniones que precipitan el Ca o disminuyen su ionización inhiben la hemólisis por la toxina  $\alpha$ . Nuestros resultados aparentemente contradicen las afirmaciones de estos autores pero un examen más cuidadoso de las condiciones en que realizamos nuestras experiencias nos permitió demostrar que el Ca tiene influencia aunque no podemos decir que ella sea del orden expuesto por Oakley y Warrack.

En el trabajo de Ipsen, Llewellyn Smith y Sordelli (8) la misma toxina  $\alpha$  da en los tres laboratorios valores hemolíticos distintos y Oakley y Warrack se preguntan qué soluciones ha empleado Sordelli para que el valor hemolítico sea mucho más alto que en los otros laboratorios. Inducidos por esta observación y por la contradicción de nuestros resultados con las afirmaciones de Oakley y Warrack investigamos la composición de los diluyentes usados por nosotros. La solución fisiológica fué siempre preparada con ClNa «puro» de una fábrica del país y se reveló impurificada por una pequeña proporción de Ca (más o menos 0.3 ‰). La solución fisiológica

preparada con esta sal contiene 0.0003 gr. de Ca por 100 cm<sup>3</sup>, cantidad que es muy inferior a la necesaria para saturar el PO<sub>4</sub><sup>+++</sup> que contiene la toxina. Después de un número relativamente grande de ensayos se pudo comprobar lo siguiente:

1) La toxina no tiene acción hemolítica sobre glóbulos rojos de oveja lavados con solución fisiológica de ClNa purísimo y usando la misma solución para diluir la toxina; 0.5 ‰ de Cl<sub>2</sub>Ca activa considerablemente la acción hemolítica.

2) Los glóbulos rojos lavados con solución de Buffer BBS se comportan de igual manera que los anteriores cuando se usa el mismo Buffer para diluir la toxina. El Cl<sub>2</sub>Ca activa la acción hemolítica aunque mucho menos que con la solución fisiológica de ClNa puro.

3) Los glóbulos rojos lavados con solución fisiológica preparada con el ClNa corrientemente y que contiene 0.0003 % de Ca son hemolizados de manera apreciable, aunque el Cl<sub>2</sub>Ca agregado en la dosis de 0.5 ‰ aumenta la capacidad hemolítica de la toxina.

4) Cuando se lavan los glóbulos rojos con solución fisiológica pura y se usa como diluyente de la toxina la solución preparada con el ClNa impuro mencionado más arriba no se observa ninguna hemólisis.

En conclusión la aparente falta de importancia del Ca en la acción hemolítica de la toxina  $\alpha$  en nuestros experimentos debe ser explicada por la sensibilidad especial de los glóbulos rojos que han sido lavados y suspendidos con una solución fisiológica que contiene una pequeñísima cantidad de Ca.

Los resultados expuestos en este trabajo han sido obtenidos por el empleo de esos glóbulos rojos y de la toxina diluida en la solución fisiológica que contiene 0.0003 de Ca por 100 cm<sup>3</sup>. Entendemos que la duplicación de los experimentos expuestos será muy difícil de obtener por la definición imprecisa de las soluciones empleadas y creemos que convendrá usar una solución fisiológica adicionada con Cl<sub>2</sub>Ca al 0.5 ‰ tanto para lavar los glóbulos cuanto para diluir la toxina.

b) *Lecitinasa*. — Steiffert (<sup>27</sup>) y Nagler (<sup>28</sup>) describieron la opacificación del suero humano por los filtrados por *B. perfringens* y Macfarlane, Oakley y Anderson la de suspensiones de yema de huevo filtrados por filtro Seitz. Esta acción es debida a la toxina  $\alpha$ , que ha sido identificada como una lecitinasa, que se activa por sales de Ca [Oakley y Warrack (<sup>25</sup>) 1941, Van Heyningen (<sup>22</sup>, <sup>29</sup>) 1941, Macfarlane y Knight (<sup>30</sup>) 1941, Macfarlane, Oakley y Anderson (<sup>5</sup>) 1941, Crook (<sup>31</sup>) 1942].

Como reactivo hemos empleado una suspensión de yema preparada de la siguiente forma: Una yema es emulsionada en 500 cm<sup>3</sup> de fisiológica al 9 ‰ y 0.5 ‰ de CaCl<sub>2</sub>. Se filtra por papilla con supercel y el líquido ya bastante clarificado se filtra por Seitz. Para la determinación del límite de actividad puede servir por varios días.

Se usa 0.5 cm<sup>3</sup> de diferentes diluciones en solución fisiológica de la toxina (0.25, 0.125, 0.062, 0.030, 0.015, 0.0075, 0.0037, 0.0019, 0.00095 en cantidades absolutas) agregando 1 cm<sup>3</sup> de solución de yema. La lectura se hace después de 30' de incubación a 37°. La actividad de la toxina fué medida por el tubo límite; en este tubo la opacificación es ligera pero evidente aún sin comparar con los tubos testigos.

Los valores más frecuentes son de 0.0037 y le sigue 0.0019.

c) *Acción letal.* — Fué determinada por inyección intravenosa de ratones; lectura al día siguiente. Los valores varían entre 0.01 y 0.0040.

d) *La acción necrótica.* — No fué determinada como rutina. Los valores de la D. N. M. son aproximadamente de 1/5 a 1/10 de D. L. M.

*Se describe un medio de preparación de toxina  $\alpha$  libre de toxina  $\theta$  que da filtrados bien tóxicos utilizables para la inmunización de caballos productores de suero.*

Su actividad puede ser definida de la siguiente manera:

D. L. M. i. venosa ratón 15 grs	D. hemolítica 0,5 glóbulos ovejas 5 % 30' 37° 60' 0°	Lecitinasa 1 yema en 500 cm <sup>3</sup> 1 cm <sup>3</sup> 30' 37°	D. necrótica mínima
0,01-0,004 *	0,0025-0,0006 hemolisis total o casi total	0,004-0,002 (Opacificación lí- mite)	0,002-0,0004

(\*) D<sup>1</sup>/50 llega bien a 0,003. Relación  $\frac{\text{D. L. M.}}{\text{hemol.}}$  es más o menos 4.

## 2) OBTENCIÓN DE TOXINA $\theta$ MUY ACTIVA LIBRE DE $\alpha$

*Preparación de la toxina  $\theta$ .* — Es conocida por los trabajos de Wuth, Neill, Schnayerson y Samuels, pero la preocupación de obtenerla pura: es decir libre de  $\alpha$ , comienza con la publicación de Frigge. Tanto este autor como los que después de él intentaron la

preparación no han dado una solución satisfactoria y práctica. En cambio casi todos los investigadores han encontrado cómo preparar toxinas  $\alpha$  activas y libres de  $\theta$ .

Nuestras investigaciones (enero 1942) se orientaron primeramente a la obtención de toxinas muy activas sin discriminación y luego de demostrar la actividad tóxica intensa de la toxina  $\theta$  a la preparación de toxinas puras para resolver los problemas que planteaba la producción por el *B. perfringens* de las toxinas  $\alpha$  y  $\theta$ .

La técnica de obtención de toxina  $\theta$  que ha sido alcanzada después de muchos ensayos es relativamente simple y permite preparar toxinas puras y de mucha actividad. Está demás decir que los antecedentes de la literatura nos han sido de gran valor y especialmente los trabajos de Stewart.

La técnica de preparación es la siguiente:

*Medio de cultivo:* El mismo descrito para la toxina  $\alpha$  designado «caldo básico» (ver pág. 393 hasta donde dice pH 8.4.). Se vierte sin filtrar una cantidad apropiada en frascos grandes cuidando que haya un buen volumen libre pues a veces la toxina produce gran cantidad de espuma (p. ej. 2500 cm<sup>3</sup> en frascos de 9 litros). Los frascos llevan un tapón de goma con un dispositivo para hacer circular hidrógeno y dos tubos que llegan al líquido, uno para la alcalinización y otro para la toma de muestras necesarias para regular el pH. Se esteriliza el medio a 115° durante 20' y se saca del autoclave aún hirviendo. Se conecta con un aparato productor de hidrógeno lavado por MnO<sub>4</sub>K y NaOH, de modo que el aire no llegue a estar en contacto con el medio y se agrega una solución de glucosa al 50 % estéril en cantidad suficiente para que el medio contenga 1 % de glucosa. Se utiliza para ello el tubo que está menos hundido en el líquido.

*Cultivo de siembra:* Las cepas conservadas en agar o en Tazozzi pierden la capacidad de producir toxinas  $\theta$  muy activas (ver Turner, Ealey y Prodwell); en cambio la conservan si se las guarda desecadas en vacío. Utilizamos para ello el método corrientemente aplicado en el Instituto para la conservación de cepas; puede emplearse verosímilmente cualquier método de liofilización. Cuando la bacteria ha disminuído su poder toxígeno  $\theta$  se lo recupera por pasajes por cobayo. En general hemos recurrido a tres y hasta seis pasajes. Parecería que alguno de los cultivos obtenidos fuera más toxígeno que otros.

El cultivo para la siembra se prepara en tubos de Hall con 50 cm<sup>3</sup> del mismo medio básico para producir la toxina, esterili-

zada de igual manera y sin glucosa; se utiliza cultivos frescos de 12 a 16 horas de incubación.

*Preparación de la toxina:* Se siembra el frasco de toxina una vez enfriado convenientemente, con el contenido de un tubo de Hall (50 cm<sup>3</sup>), por el mismo tubo que se agregó la glucosa y se incuba a 37°. Durante todo el tiempo del cultivo se hace pasar hidrógeno.

El desarrollo es muy rápido y muy intenso produciéndose una cantidad considerable de gas. A medida que desarrolla, la alcalinidad se reduce y debe ser mantenida por adición de NaOH estéril (se usa una solución al 20 %). En general se agrega de 2 a 5 cm<sup>3</sup> de NaOH por vez, los intervalos son de 10' a 15' y el pH oscila de 7.4 a 7.8.

La determinación del pH se hace sobre muestras que se toman con pipeta por el tubo que está más introducido en el líquido, por el método colorimétrico (fenol red) usando tubos estériles y con las precauciones de asepsia necesarias para evitar la contaminación del medio.

En general entre las 5 y 6 horas la operación está terminada. Se hace pasar hidrógeno por unos 15' más (30 a 60 burbujas por minuto), se cierra el tubo de escape con una pinza, se tapa los dos tubos de vidrio y se deja el frasco bajo la presión de hidrógeno del aparato de Kipp que permanece comunicado por el tubo de admisión. Así queda por uno a tres días a la temperatura del laboratorio (aproximadamente 20°), en cualquier momento se puede tomar muestras teniendo la precaución de disminuir la presión de hidrógeno pues de otra manera escaparía líquido por el tubo de toma de muestra.

La toxina formada al terminar la incubación a 37° está constituida por una mezcla de  $\alpha$  y  $\theta$  y sólo al cabo de uno a tres días desaparece la toxina  $\alpha$  mientras la  $\theta$  disminuye poco o nada. En este momento se filtra por papilla y por filtro Seitz y se obtiene un filtrado bien tóxico de toxina  $\theta$  prácticamente libre de  $\alpha$ . No se puede usar bujía para filtrado pues adsorbe la toxina  $\theta$ .

Un protocolo de preparación de la toxina da mejor idea de la marcha del proceso.

Caldo básico 1200 cm<sup>3</sup>; glucosa 50 % 24 cm<sup>3</sup>. Cultivo cepa 107, 6 pasajes conservada en vacío. Siembra con 50 cm<sup>3</sup> tubo Hall de 18 horas.

Tiempo	pH	Gas	NaOH 20% cm <sup>3</sup>	pH
16,20	8	+	—	—
16,35	7,8	++	—	—
16,45	7,8	++	—	—
17,00	7,6-7,8	++	—	—
17,10	7,6	++	—	—
17,25	7,6	+ +	—	—
17,35	7,4	+ +	2	7,6
17,50	7,4	+++	2	7,6
18,10	7,4	+++	2,5	7,6
18,20	7,4	+++	2,5	7,6
18,30	7,4	++	2	7,6
18,45	7,4	++	3,5	7,8
18,55	7,6	++	—	—
19,30	7,4	++	2	—
19,40	7,4	+	3	7,6
19,50	7,4	+	3	7,6
20,30	7,4	±	3	7,8

Se suspende la adición de NaOH y después de 15' se cierra el tubo de escape y los tubos de adición de reactivos y de toma de muestra y se deja bajo presión de hidrógeno.

La evolución de los valores de  $\theta$  y de  $\alpha$  desde las 20,30 h en que termina el cultivo hasta 4 días después es la siguiente:

Tiempos	Valor $\alpha$ lecitinasas	Valor $\theta$ hemólisis por 0,5 glob. oveja 5 % 30' a 37°
1er. día	0,007	(1/12.800) 0,00008
2°	0,06	(1/12.800) 0,00008
3er. »	0,5	(1/12.800) 0,00008

Este comportamiento ha sido observado un número muy grande de veces el método da resultados muy regulares. Algunas veces el título  $\theta$  es algo menor y otras se reduce un poco durante la permanencia bajo hidrógeno aunque esto sucedió solo ocasionalmente.

PROPIEDADES DE LA TOXINA. — a) *Hemolisinas*. — La hemólisis de los glóbulos rojos de oveja al 5 % tiene lugar a 37° con gran rapidez y llega a títulos diez veces mayores que los de la toxina  $\alpha$  más activa. Debido a esta gran diferencia de actividades el enfriamiento no produce aumento apreciable del título cuando se estudia

la toxina  $\theta$  recién producida y que contiene suficiente toxina  $\alpha$  para dar por sí solo hemólisis con 0.002 (30' a 37°, 1 h. a 0°).

b) *Lecitinasa*. — Carece de acción sobre la lecitovitelina del huevo.

*Toxicidad*. — Es tóxica para el ratón por vía venosa y produce la muerte con gran rapidez. La mayor actividad observada corresponde a una D. L. M. de 0.005; el valor más frecuente es de 0.01. Es muy raro observar la muerte de los ratones después de las tres horas de inoculados.

d) La acción por vía intradérmica es poca intensa; se observa necrosis con 2 D. L. M. ratón aproximadamente.

*Se describe un método para producir toxina  $\theta$  muy activa y libre de toxina  $\alpha$  (\*) que puede servir para estudiar sus propiedades tóxicas y antiigénicas.*

Su actividad puede ser definida de la siguiente manera:

Toxicidad	D. hemolítica	Lecitinasa	Acción necrótica
D. L. M. ratón 15 gr. i. venosa. 0,02-0,005	0,5 glóbulos 5 % 30' a 37° 0,00016-0,00008	> 0,5	0,04-0,01

$$\text{Relación } \frac{\text{D. L. M.}}{\text{D. hemolítica}} = \pm 100$$

La toxina precipita por sulfato de amonio a saturación después de haber agregado 5 0/00 de bicarbonato de sodio; el precipitado recogido y secado inmediatamente en vacío conserva toda la actividad hemolítica del líquido original.

La dosis hemolítica mínima es de 0.5  $\gamma$  y la D. L. M. es de 20-30  $\gamma$ . La relación  $\frac{\text{D. L. M.}}{\text{D. hemolítica}}$  es aproximadamente 50. La toxina seca se conserva perfectamente en vacío por varios meses (\*).

(\*) Nada se puede decir todavía de la ausencia de toxoide  $\alpha$ .

(\*) La coexistencia de las toxinas  $\alpha$  y  $\theta$  es posible en ciertos medios de cultivos, basta por ejemplo usar un caldo sin adición de carne o mejor aún un medio constituido por el caldo básico al que se agrega extracto de hígado, bicarbonato de sodio y glucosa. Se obtiene así toxinas de altos valores  $\alpha$  y  $\theta$ . Si su uso en la inmunización de los caballos conduce a la producción de buenos valores de las dos antitoxinas su preparación estaría justificada.

3) ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACCIÓN DE AGRESIÓN DE LAS  
TOXINAS  $\alpha$  Y  $\theta$

Es un hecho bien conocido el de la exaltación de la virulencia de un cultivo sin toxina o de esporas de *B. perfringens* por acción de su toxina [De Kruif, Bollman (<sup>32</sup>) (1917)]. Aunque estos experimentos no permitan asegurar que esa acción se debía a la toxina  $\alpha$  es muy verosímil que así fuera y se la puede considerar como demostrativa del aumento de la acción agresiva de la bacteria, por esa toxina. Por haber obtenido las toxinas  $\alpha$  y  $\theta$  separadas y relativamente puros consideramos del mayor interés reproducir experimentos semejantes a los de De Kruif y Bollman para determinar comparativamente la acción agresiva de las toxinas  $\alpha$  y  $\theta$  sobre la virulencia, poder de invasión de *B. perfringens*.

Los experimentos resultaron más numerosos por haber observado que los cultivos  $\alpha$  y  $\theta$  no sólo difieren por la naturaleza de la toxina producida sino también por la forma y tinción de las bacterias de los dos cultivos, tal como se describe a continuación:

*Bacterias de los cultivos  $\alpha$* : Bastones cortos y gruesos, frecuentemente asociados de a pares rodeados de un halo refringente y de superficie uniforme. Teñidos por Gram lo toman fuertemente y aparecen ovoides; se tiñen uniformemente con azul de metileno.

*Bacterias de cultivo  $\theta$* : Bastones finos alargados, en general solos, de superficie rugosa; polimorfismo, teñidos por Gram lo toman irregularmente, con azul de metileno se revelan granulosos y muy finos.

Los experimentos de activación de la agresividad de *B. perfringens* fueron realizados con las bacterias provenientes de un cultivo  $\alpha$  privadas de su toxina y con las bacterias de un cultivo  $\theta$  también privadas de su toxina y ambas fueron mezclados con toxina  $\alpha$  y  $\theta$  y las mezclas inyectadas al cobayo por la vía muscular tal como está expuesto en los experimentos que siguen:

*Cultivo  $\alpha$* .—Preparado como está descrito en este trabajo, se lo centrifuga y se lava las bacterias dos veces con solución fisiológica. El sedimento se suspende en fisiológica y se conserva a  $-78^{\circ}$ . La toxina de este cultivo tiene un valor lecitinasa de 0.0038 y una toxicidad para el ratón de 0.005 que equivale a 1 D. L. M. No contiene toxina  $\theta$ . La toxina se filtra por Seitz y se conserva congelada a  $-78^{\circ}$ .

*Cultivo  $\theta$ .* — Preparado como está descrito en este trabajo; después de una incubación de dos días se lo centrifuga y se lava las bacterias dos veces con solución fisiológica. El sedimento se suspende en solución fisiológica y se conserva a  $-78^{\circ}$ . La toxina  $\theta$  de este cultivo tiene un valor hemolítico de 0.00016 y una toxicidad para el ratón de  $0.01 = 1$  D. L. M. No contiene prácticamente toxina  $\alpha$  (lecitinasa =  $0.5 \text{ cm}^3$ ).

ACCIÓN ACTIVANTE DE LA VIRULENCIA DE LA BACTERIA  $\alpha$  POR TOXINA  $\alpha$  Y POR TOXINA  $\theta$

Nº bacterias en millones	Bacterias + 1 DLM ratón toxina $\alpha = 0,005$	Bacterias + 1 DLM ratón toxina $\theta = 0,01$	Bacterias solas
1.000	+ en 24 horas	+ 48 horas	+ 96 horas
100	+ en 24 horas	+ 48 horas	0 0
10	ed. g. ed.	+ 96 horas	0 0
1	+ en 48 horas	0 0	0 0
0,1	p. ed. 0	0 0	0 0
0,01	$\theta$ $\theta$	0 0	0 0

Acción activante de la virulencia de la bacteria  $\theta$  por toxina  $\alpha$  y por toxina  $\theta$ .

Nº bacterias en millones	Bacterias + 1 DLM ratón toxina $\alpha = 0,005$	Bacterias + 1 DLM ratón toxina $\theta = 0,01$	Bacterias solas
1.000	+ 120 horas	+ 48 horas	0 0
100	+ 72 horas	+ 72 horas	0 0
10	p. ed. 0	0 0	0 0
1	+ 72 horas	0 0	0 0
0,1	ed ed	0 0	0 0
0,01	0 0	0 0	0 0

La acción local y general producida por las toxinas sola es muy pequeña y sobre todo para la toxina  $\theta$  que no produce la más ligera reacción local.

Aunque la activación de la virulencia por la toxina  $\theta$  es evidente, hemos repetido los experimentos después de un largo tiempo por considerar que la comprobación del hecho acuerda a la toxina  $\theta$  una particular importancia en la patogenia de la gangrena gaseosa producida por *B. perfringens*. Se usa gérmenes  $\alpha$  lavados y dos toxinas  $\theta$  de valor mediano (título hemolítico aproximada-

mente 1/3200); se mezcla distintas cantidades de bacterias con 0.1 y 0.2 de toxina y 0.2 de toxina calentada a 100°.

N° bacterias* en millones	Bacterias +				0,2 toxina calentada a 100°		Bacterias solas	
	0,1 toxina		0,2 toxina		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2				
3	—	+ 48 h	—	+ 24 h	—	—	—	0
10	+ 24 h	+ 48 h	+ 24 h	+ 48 h	0	»	0	0
30	+ 24 h	+ 48 h	+ 24 h	+ 48 h	»	»	0	0
100	+ 24 h	+ 24 h	+ 24 h	+ 24 h	+ 24 h	0	+ 120 h	0
300	+ 24 h	+ 24 h	+ 24 h	+ 24 h	+ 48 h	ed. ed.	+ 24 h	0
1000	—	—	—	—	—	—	+ 24 h	+ 48 h

ACCIÓN DE LA TOXINA SOLA

Toxina	Exp. 1		Exp. 2	
0,05	0	0	0	0
0,10	0	0	0	0
0,20	0	0	0	0

Estos experimentos son tan concluyentes como los anteriores y por tanto podemos afirmar que la toxina  $\theta$  es un factor de agresión importante en la patogenia de la gangrena gaseosa experimental del cobayo por el *B. perfringens*. Al significado de los hechos recién expuestos debemos agregar también el mencionado en páginas anteriores cuando dijimos que la capacidad de producir toxina  $\theta$  es exaltada por pasaje por el cobayo, observación que parecería indicar que en la producción de la gangrena gaseosa el *B. perfringens* está inducido a engendrar toxina  $\theta$ .

Como se comprende la participación de la toxina  $\theta$  en la agresión por *B. perfringens* (\*) plantea inmediatamente el problema de la importancia de la inmunidad  $\theta$  y de los anticuerpos  $\theta$  en la profilaxis y tratamiento de la gangrena de Perfringens.

(\*) Bacterias  $\alpha$

(\*) Siendo una toxina común a muchas bacterias es natural pensar que algo semejante puede ocurrir para otros casos. La investigación experimental está grandemente facilitada por la producción de una toxina  $\theta$  activa, tanto para este caso cuanto para el de la acción de activación de la virulencia de otras bacterias por obra de esta toxina  $\theta$ .

4) PREPARACIÓN Y TITULACIÓN DE LOS SUEROS  $\alpha$  Y  $\theta$ . ELECCIÓN DE LA UNIDAD  $\theta$  Y DEL MÉTODO DE TITULACIÓN

La fácil obtención de toxinas  $\alpha$  y  $\theta$  permite abordar el problema de la preparación de los dos sueros por separado y el estudio de la cuestión planteada más arriba.

Fueron hechos dos ensayos, uno preliminar y otro definitivo, éste con el objeto de encontrar un procedimiento de producción de suero en gran escala y con mayor actividad antitóxica.

*Primer experimento:* Se inmunizan dos caballos con toxina  $\theta$  (8234 y 8643) y dos caballos con toxina  $\alpha$  (8245 y 8628) por vía subcutánea y al cabo de cinco semanas de inmunización se hace una prueba de la actividad de los sueros, la cual fué practicada como lo dice el protocolo que se expone más abajo.

Se ha empleado para esta determinación toxinas filtradas, obtenidas por los procedimientos descritos anteriormente, aplicando para determinar el límite de neutralización por lo menos dos pruebas, una de ellas in vivo.

No se ha pretendido obtener el conocimiento preciso de los valores ni saber si el grado de coincidencia de los distintos métodos es muy alto, sino tan solo conocer la relativa actividad  $\alpha$  de los sueros  $\theta$  y  $\alpha$  y la  $\theta$  de los sueros  $\alpha$  y  $\theta$ .

*Primera determinación de los valores*

Se ha utilizado 6 sueros:

8234 - 8643 sueros anti  $\theta$

8245 - 8628 sueros anti  $\alpha$

Suero 4125. Suero antiperfringens de rutina concentrado por  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  con 425 U. A. por  $\text{cm}^3$ .

Suero antiescarlatinoso concentrado por  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ .

*Toxina  $\theta$ .*—D. Hemolítica  $\theta$ . = 1/3200 D. L. M. ratón = 0.02 Lecitinasa = > 0.5  $\text{cm}^3$ .

Se prepara mezclas con 1.2  $\text{cm}^3$  de toxina, cantidades variables de suero y se completa a 2  $\text{cm}^3$ . Al cabo de 10' se inyecta ratones por vía venosa con 0.5  $\text{cm}^3$  de la mezcla y se prueba la existencia de hemolisinas con 0.1  $\text{cm}^3$ . Es decir que la prueba de la neutralidad in vivo se hace con 0.3  $\text{cm}^3$  de toxina, equivalente a 15 D. L. M.

ratón, e in vitro con 0.06 de toxina (contenidos en 0.1 cm<sup>3</sup> de la mezcla) que equivalen a 200 D. hemolíticas. La observación de los ratones se hace durante un día. La lectura de la hemólisis después de 30' de incubación a 37°. Se usa como siempre 0.5 de glóbulos de oveja al 5 %.

SUEROS ANTI  $\theta$

Cantidades de suero para 0.3 de toxina = 15 D. L. M.	Suero 8234		Suero 8643		Suero antiescarlatinoso	
	Acción sobre glób.	Acción sobre ratón	Acción sobre glób.	Acción sobre ratón	Acción sobre glób.	Acción sobre ratón
0,003	0	0	0	0	0	0
0,0012	H	+	CH	0	0	0
0,0006	H	+	H	+	0	0
0,0003	H	+	H	+	H	+

H = hemolisis; CH = hemolisis casi completa; + = muerte.

SUEROS ANTI  $\alpha$

Cantidades de suero para 0.3 de toxina = 15 D. L. M.	Suero 8628		Suero 8245		Suero antiperfrín.	
	Acción sobre glób.	Acción sobre ratón	Acción sobre glób.	Acción sobre ratón	Acción sobre glób.	Acción sobre ratón
3,05	0	0	0	0	0	0
0,025	0	0	0	0	0	0
0,0125	H	+	H	0	CH	0
0,0060	H	+	H	+	H	+
0,0030	H	+	H	+	H	+

Toxina  $\alpha$ . — Dosis hemolítica  $\alpha$  = 0.0012, lecitinasa = 0.0038; D. L. M. ratón = 0.01. Dosis hemolítica  $\theta$  mayor de 0.01.

Se prepara mezclas con 1.2 cm<sup>3</sup> de toxina y cantidades variables de suero y se completa a 2 cm<sup>3</sup>. Al cabo de 30' se prueba la toxicidad para ratón con 0.5 cm<sup>3</sup> (equivalentes a 0.3 de toxina con 30 D. L. M.), la acción hemolítica se prueba a 37° y luego a 0° y la acción sobre emulsión de yema de huevo por incubación 30' a 37°, con 0.2 cm<sup>3</sup> de la mezcla (equivalentes a 0,12 cm<sup>3</sup> de toxina con 31 dosis lecitinasa y 100 dosis hemolíticas). Como diluyente se usa solución fisiológica. La suspensión de yema de huevo es de una yema en 500 cc. de sol. fisiológica con 0.5 % de CaCl<sub>2</sub>.

SUEROS ANTI  $\alpha$ 

Cantidades de suero para 0,3 de toxina = 30 D. L. M.	Suero 8628 Acción sobre			Suero 8245 Acción sobre			Suero antiperfring. 4125 de 425 U. A.		
	yema glób.	ratón		yema glób.	ratón		yema glób.	ratón	
0,0075	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,0038	±	CH	+	0	0	0	0	0	0
0,0019	3	H	+	1	CH	+	1	H	+
0,00095	4	H	+	3	CH	+	4	H	+
0,00048	4	H	+	4	CH	+	4	H	+

± = límite de reacción.

3 = gran turbiedad.

4 = separación de capa de lípidos.

SUEROS ANTI  $\theta$ 

Cantidades de suero para 0,3 de toxina = 30 D. L. M.	Suero 8231 Acción sobre			Suero 8643 Acción sobre			Suero antiescarlatinoso Acción sobre		
	yema glób.	ratón		yema glób.	ratón		yema glób.	ratón	
0,30	0	0	0	0	0	0	4	H	+
0,15	0	0	0	3	3/4 H	+	4	H	+
0,075	1	1/2 H	+	4	CH	+	4	H	+
0,038	3	CH	+	4	H	+	—	—	—
0,019	4	H	+	4	H	+	—	—	—
0,0095	4	H	+	4	H	+	—	—	—

De la observación de las cifras de los cuadros de la medición del valor anti  $\theta$  aparece una relativa coincidencia entre la presencia de hemolisina  $\theta$  libre y la acción letal sobre el ratón, aunque en general se observa mezclas tóxicas para glóbulos rojos que no producen la muerte del ratón. Probablemente se deba esta discrepancia a una mayor afinidad de éstos por las pequeñas cantidades de toxina libre. Para juzgar mejor el comportamiento de ambos indicadores sería necesario reducir los intervalos entre las cantidades de suero que han sido usados e inyectar un número más grande de animales. Tomando como indicación la hemólisis completa o la muerte de un ratón.

Las dosis de suero que contienen la misma cantidad de antitoxina son :

VALOR ANTI  $\theta$

Suero	Dosis de suero de actividad equivalente		Nº de dosis indicadoras por cm <sup>3</sup> de suero	
	para glób.	para ratón	para glób.	para ratón
8234 (anti $\theta$ ) .....	0,0012	0,0012	800	800
8643 (anti $\theta$ ) .....	0,0006	0,0006	1600	1600
8628 (anti $\alpha$ ) .....	0,0125	0,0125	80	80
8245 (anti $\alpha$ ) .....	0,0125	0,0060	80	160
Antiperf. 4125 (*) rutina (anti $\alpha$ ) ...	0,0060	0,0060	160	160
Antiescarlat. (*) .....	0,0060	0,0060	160	160

Con los valores anti  $\alpha$  existe una muy buena coincidencia entre las cifras correspondientes a glóbulos, yema y acción letal. Este hecho tiene excepciones que han sido estudiadas por Oakley y Warrack (25) de manera muy extensa al tratar de las relaciones entre la actividad de combinación de la toxina  $\alpha$ , la concentración de Ca<sup>++</sup> y la naturaleza particular de cada antitoxina. Es muy difícil observar esa propiedad con intervalos tan grandes entre las dosis de sueros usadas por nosotros.

En el cuadro siguiente figuran las cifras equivalentes de los distintos sueros. Se ha tomado las correspondientes a la dosis que deja toxina en libertad.

VALOR ANTI  $\alpha$

Suero	Dosis de suero de actividad equivalente			Nº de dosis indicadoras por cm <sup>3</sup> de suero		
	para yema	para ratón	para glób.	para yema	para glób.	para ratón
8628 (anti $\alpha$ ) .....	0,0038	0,0038	0,0038	260	260	260
8245 (anti $\alpha$ ) .....	0,0019	0,0019	0,0019	520	520	520
Antiperf. 4125 (*) .....	0,0019	0,0019	0,0019	520	520	520
8234 (anti $\theta$ ) .....	0,075	0,075	0,075	13	13	13
8643 (anti $\theta$ ) .....	0,15	0,15	0,15	6	6	6
Antiescarlat. ....	>0,30	>0,30	>0,30	<3	<3	<3

(\*) Sueros concentrados alrededor de tres veces por medio de sulfato de sodio. Es decir que los sueros anti  $\theta$  contienen de 5 a 20 veces más antitoxina  $\theta$  que los sueros anti  $\alpha$  o que el suero anti  $\theta$  producido por la toxina del *Strep. scarlatinae*.

(\*) Este suero concentrado tres veces por sulfato de sodio tiene 425 U. A. por cm<sup>3</sup>.

Los sueros anti  $\alpha$  tienen de 20 a 80 veces más antitoxina  $\alpha$  que los sueros anti  $\theta$ . Una segunda serie de ensayos de inmunización fué planeada después de establecer la importancia de la antitoxina  $\theta$  en la protección contra la infección experimental, con el objeto de precisar mejor ciertos asuntos de importancia práctica y precisamente a saber:

- 1) La obtención regular de sueros muy activos  $\alpha$  y  $\theta$ .
- 2) La posibilidad de obtener un suero mixto  $\alpha$  y  $\theta$  muy activo en el mismo animal.
- 3) La aplicabilidad de los métodos de medida in vitro.

El ensayo fué realizado con 30 caballos, 10 inyectados con toxina  $\alpha$ , 10 con  $\theta$  y 10 con ambas. Se utilizó las toxinas preparadas de la manera descrita y el siguiente método de inmunización:

Días	Cantidades	Valores de toxina (toxicidad)	
		$\alpha$ Lecitinasa	$\theta$ Hemolisis
1	10	0,007	0,00016
8	17	0,007	0,00016
13	50	0,0038	0,00016
16	15	0,0038	0,00008
20	30	0,0038	0,0003
23	60	0,007	0,00016
27	90	0,006	0,00016
30	120	0,0019	0,00008
34	250	0,0019	0,00016
35	250	0,0019	0,00016
41 (*)	Sangría de prueba		

Los caballos del grupo  $\alpha + \theta$  recibieron las toxinas sin mezcla en dos lugares distintos y todas las inyecciones fueron subcutáneas y bien soportadas por los caballos.

Las actividades de los sueros fueron medidas por los métodos in vitro y luego en algunos casos por la neutralización in vivo en el ratón blanco.

(\*) Por una dificultad ocurrida en el curso de la inmunización de los grupos  $\theta$  y  $\alpha + \theta$  se prosiguió la inyección de estos animales los días 52-58-61-65 y 66 con las cantidades de 60-90-120-250 y 250 de las toxinas  $\theta$  y  $\alpha$  cuyos valores eran aproximadamente los mismos de las anteriormente usadas.

*Valores antitóxicos α.* — Medición preliminar.

Se utiliza una toxina líquida que se mide con un suero test por el método de la acción sobre la lecitovitelina, y con la dosis test  $L_+/7.5$ .

Los resultados, expresados en unidades internacionales, están expuestos en el cuadro que sigue. Fueron obtenidos por la prueba de la acción sobre la lecitovitelina.

INMUNIZADOS CON:

Caballo N°	Toxina α	Caballo N°	Toxina α + Toxina θ	
	Valores α de la sangría a los 41 días		Valores α de la sangría a los 41 días	Valores α de la sangría a los 72 días
1 5812	66	1 8878	500	550
2 5813	130	2 8881	66	130
3 8677	130	3 8883	66	320
4 8731	600	4 8884	130	400
5 8732	600	5 8887	550	600
6 8733	600	6 8890	400	550
8 8734	400	7 8896	66	600
8 8735	300	8 8897	200	400
9 8737	400	9 8899	400	400
10 8738	350	10 8900	130	320
Valor medio.	350		250	425

Con el objeto de comparar los métodos de medida y conocer los valores con más exactitud se utilizaron dos toxinas, una precipitada por sulfato de amonio desde muchos años y otra líquida conservada por congelación a  $-78^{\circ}\text{C}$ , usando para la primera el valor  $L_+/5$  y para la segunda el valor  $L /7.5$ ; este valor coincide con el de  $L/\text{reacción huevo}/7.5$ . En lugar de los sueros individuales se midieron las siguientes mezclas: 5812 y 8677; 8731-8732 y 8733; y la mezcla de los diez sueros α y la mezcla de los diez α + θ de la sangría de los 72 días.

Los intervalos entre los valores medidos son muy amplios para poder apreciar la coincidencia de los diferentes indicadores de la neutralización pero permiten por lo menos juzgar a éstos desde el punto de vista de la rutina de la fabricación.

- Mezcla A — 5812 y 8677 (sueros α de poco valor) . Valor medio calculado de la medición previa 100 U.A.
- » B — 8731-8732 y 8733 (sueros α de buen valor) ..... Valor medio calculado de la medición previa 600 U.A.

Mezcla C — (Todos los sueros  $\alpha$ ) ..... Valor medio calculado de la medición previa 350 U. A.

» D — (Todos los sueros  $\alpha + \theta$  de la sangría de 72 días) ..... Valor medio calculado de la medición previa 425 U. A.

Mezcla	Toxina líquida $L_{+} / 7,5$ (3/3)				Toxina seca $L_{+} / 7,5$ (3/5)		
	Valor medido	Lecitinasa	Hemolisis	Ratón	Valor medido	Lecitinasa	Ratón
A	66	0	0	0/3	75	0	1/5
	130	2	H	0/3	100	3	1/5
	200	4	H	3/3	200	4	5/5
	270	4	H	3/3			
B	200	0	0	0/3	400	0	1/5
	270	0	0	0/3	600	3	5/5
	400	0	0	1/3	800	4	5/5
	550	4	H	0/3	1000	4	5/5
	660	4	H	3/3			
C	130	0	0	0/3		0	0/5
	200	0	0	0/3	200	0	2/5
	270	0	0	0/3	300	1	5/5
	400	4	H	3/3	400	3	5/5
	550	4	H	3/3	500		
D	130	0	0	0/3	200	0	0/5
	200	0	0	0/3	300	0	1/5
	270	0	0	0/3	400	1	4/5
	400	4	H	3/3	500	2	5/5
	550	4	H	3/3			

De estas cifras resultan los valores que figuran en la tabla siguiente:

Mezcla	Valores obtenidos con toxina líquida			Toxina seca		Valores calculados de la medición previa
	Lecitinasa	Hemolisis	Ratón	Lecitinasa	Ratón	
A ( $\alpha$ )	130	130	200	100	150	100
B ( $\alpha$ )	550	550	660	600	500	600
C ( $\alpha$ )	400	400	400	400	350	350
D ( $\alpha$ )	400	400	400	400	400	425

El examen de las cifras nos demuestra que la aplicación de los métodos de medida usados da resultados compatibles con un empleo tanto en la rutina de la medición de los valores  $\alpha$  de los sueros antitóxicos  $\alpha$  como en la de los sueros ( $\alpha + \theta$ ).

*Valores antitóxicos  $\theta$ .* — Las mediciones fueron hechas sólo por el método in vitro, de la neutralización de la hemotoxina para glóbulos de oveja, aceptando que existe una equivalencia entre el indicador in vitro (hemólisis) y el de la intoxicación y muerte del ratón.

*Además y para facilitar la comparación de resultados con el correr del tiempo se resolvió establecer una unidad de antitoxina  $\theta$  constituida por la actividad contenida en 0.0006 gr. del suero 8643 desecado y conservado en vacío.*

Como dosis de prueba in vitro se resolvió usar 1/15 de la unidad antitóxica y como signo de combinación, la hemólisis total en 30 minutos a 37°C de 0.5 cm<sup>3</sup> de glóbulos de oveja al 5 %.

La toxina fué preparada por precipitación de un filtrado  $\theta$  libre de toxina  $\alpha$ , y el precipitado desecado, molido y conservado en vacío.

La medición de la toxina dió los siguientes resultados:

Dosis hemolítica = 0.5  $\gamma$ , D. L. M. = 20  $\gamma$ .

Dosis de combinación = ( $L$ /hemólisis/15 = 40 equivale a 2 D. L. M.).

Suero test	Toxina en	Resultado		
1/15 de U. A.	$\gamma$			
0,0006/15	30	10' contacto	0,5 glóbulos 5 %	0
0,0006/15	35		$\frac{1}{2}$ hora 37°	$\frac{1}{2}$ H
0,0006/15	40			H
0,0006/15	45			H
0,0006/15	60			H

Se elige como dosis  $L$ /hemólisis/15 la de 40  $\gamma$ ; las determinaciones hechas en varias otras ocasiones dieron el mismo valor de 40  $\gamma$ .

Los valores medidos fueron de 133, 200, 280, 360 y 460 unidades. Se obtienen los siguientes valores:

Sueros $\theta$			Sueros $\alpha + \theta$		
Caballo N°	Sangría a los 41 días	Sangría a los 72 días	Caballo N°	Sangría a los 41 días	Sangría a los 72 días
8742	280	200	8878	200	133
8820	280	133	8881	360	+ 460
8826	360	280	8883	280	133
8847	280	280	8884	280	200
8848	280	200	8887	200	280
8850	280	200	8890	460	280
8860	+ 460	+ 460	8896	360	360
8861	+ 460	360	8897	360	280
8873	460	+ 460	8899	360	280
8877	360	280	8900	+ 460	460
Mezcla de todos los sueros	360	280	Mezcla de todos los sueros	280	280
Mezcla de 8742-8860-8873	—	460	Mezcla de 8881-8887-8896-8897-8899-8900	—	360

Se encuentra algunos animales que producen suero más activo que otros, aunque las diferencias no son muy marcadas. Además parecería que la prosecución de la inmunización por más tiempo no produce aumento sino más bien una reducción del valor. Tanto los animales inmunizados con toxina  $\theta$  como con toxina  $\alpha$  y toxina  $\theta$  dan los mismos valores antitóxicos.

Por razones circunstanciales no hemos determinado los valores por el método in vivo, pero con las experiencias expuestas en páginas anteriores se puede admitir que ambos métodos, el de la hemólisis y el de la toxicidad para el ratón, dan iguales resultados, con lo cual se puede calcular que el número de D. L. M. que neutraliza una unidad antitóxica es de 30, lo que equivale a decir que aproximadamente cada centímetro cúbico de suero (considerando la mezcla) neutraliza 10.000 D. L. M. de una toxina  $\theta$  precipitada.

Queda aún por conocer la actividad  $\alpha$  de los sueros  $\theta$  y la  $\theta$  de los sueros  $\alpha$ .

Determinados los valores por los métodos utilizados anteriormente se obtienen las cifras que figuran en el cuadro siguiente y que ilustran de manera comprensiva sobre la constitución de los sueros  $\alpha$ ,  $\theta$  y  $\alpha\theta$  en sus actividades relativas  $\alpha$  y  $\theta$ .

Sueros $\alpha$	Valores $\alpha$ en U. A.	Valores $\theta$ en U. A.
5812	60	5
5813	130	10
8677	130	20
8731	600	10
8732	600	20
8733	600	5
8734	400	50
8735	300	20
8737	400	20
8738	350	20

Sueros $\theta$	Valores $\alpha$ en U. A.		Valores $\theta$ en U. A.	
	41 días	72 días	41 días	72 días
8742	7	20	280	200
8820	7	15	280	133
8826	3	15	360	280
8847	5	15	280	280
8848	3	15	280	200
8850	7	35	280	200
8860	10	50	+ 460	+ 460
8861	7	35	+ 460	360
8873	7	15	460	+ 460
8877	10	20	360	280

Sueros $\alpha\theta$	Valores $\alpha$ en U. A.		Valores $\theta$ en U. A.	
	41 días	72 días	41 días	72 días
8878	500	550	200	133
8881	60	130	360	+ 360
8883	66	320	280	133
8884	130	400	280	200
8887	550	600	200	280
8890	400	550	460	280
8896	66	600	360	360
8897	200	400	360	280
8899	400	400	360	280
8900	130	320	+ 460	460

Es fácil ver que en los sueros  $\alpha$  la relación  $\alpha/\theta$  varía de 6 a 120 y el término medio es de 18, es decir que la actividad  $\theta$  de un suero  $\alpha$  es sólo 1/18 de la específica, es decir anti  $\alpha$ .

En cuanto a los sueros  $\theta$  la relación  $\theta/\alpha$  varía de 40 a 70 en la sangría de los 41 días y de 9 a 30 en la sangría de los 72 días; los valores medios son de 50 a los 41 días y de 12 a los 72 días, es decir que la actividad  $\alpha$  de un suero  $\theta$  es sólo de 1/50 a 1/12 de la específica, es decir anti  $\theta$ .

En los sueros  $\alpha\theta$  la relación  $\alpha/\theta$  a los 41 días es de 1 y a los 72 días de 1.5.

En cuanto a los valores medios de las mezclas de cada uno de los tres tipos de sueros son los del siguiente cuadro:

Sueros	Valores $\alpha$		Valores $\theta$	
	41 días	72 días	41 días	72 días
$\alpha$	350	—	19	—
$\theta$	7,5	23	352	285
$\alpha\theta$	250	425	280	280

Estas cifras indican claramente que la actividad  $\alpha$  de los sueros  $\alpha$  es comparable a la de los sueros  $\alpha\theta$  y lo mismo puede decirse de la actividad  $\theta$  de los sueros  $\theta$  y de los  $\alpha\theta$ . Lo que equivale a decir que la inmunización simultánea con toxinas  $\alpha$  y  $\theta$  no interfiere en la producción de ambas antitoxinas y por tanto la preparación de los sueros mixtos más activos debe hacerse por inmunización del mismo caballo con toxina  $\alpha$  y con toxina  $\theta$  inyectadas en el mismo momento en lugares distintos. Queda por establecer sin embargo si la prosecución de la inyección de toxina  $\alpha$  en los caballos  $\alpha$  hasta 72 días como en el grupo  $\alpha\theta$  no permite la obtención de un suero más activo. De todas maneras los valores  $\alpha$  y  $\theta$  deben ser considerados excelentes.

##### 5) LOS SUEROS $\alpha$ Y $\theta$ EN LA PROTECCIÓN PASIVA DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Apenas fué conocida la existencia de la producción independiente de dos toxinas por el *B. perfringens*, quedó planteado el problema de la importancia relativa de las dos inmunidades en la protección activa y pasiva de la gangrena producida por *B. perfringens*.

En la literatura de tiempos pasados existe la prueba de que el suero antiperfringens (anti  $\alpha$ ) es activo contra la infección expe-

rimental por cultivos en caldo, hecho poco sorprendente, pues como la agresión del cultivo es debida en buena parte a la toxina  $\alpha$ , la neutralización de ésta por el suero bastaba para que quedara paralizada la acción patógena del cultivo.

Recientemente Stewart ha probado que los cobayos inmunizados con toxoide  $\alpha$  resisten perfectamente la infección por un cultivo de *B. perfringens* activado por la adición de tierra estéril. La cantidad de cultivo es muy pequeña y por tanto la de toxina, a pesar de inocular un número muy grande de dosis mortales. La acción parece desarrollarse de esta manera: las bacterias se reproducen gracias a la reacción local producida por la tierra y al mismo tiempo engendran toxina que inhibe la acción fagocitaria. En cambio cuando los humores contienen antitoxina  $\alpha$  las bacterias pueden iniciar su reproducción pero la toxina segregada es neutralizada y los fagocitos pueden englobar y destruir las bacterias [Stewart, 1943 (<sup>33</sup>)].

G. Evans (1943) (<sup>34</sup>) por el método de Armstrong y Rae que consiste en la exaltación del poder patógeno de *B. perfringens* por la inyección previa a cobayos de 0.2 cm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub> al 15 % seguida tres horas después de 0.2 cm<sup>3</sup> de una suspensión de *B. perfringens* lavados que se inyecta en el mismo lugar, prueba con cuatro cepas: 1º) que el suero anti  $\alpha$  con muy poca antitoxina  $\theta$  protegía muy efectivamente contra la infección; 2º) que el suero anti  $\theta$  con solo una pequeña cantidad de antitoxina  $\alpha$  no protegía; 3º) la antitoxina usada que fué el patrón internacional, protege lo mismo que un suero que no contiene antitoxina  $\theta$ ; 4º) la antitoxina  $\theta$  reduce la acción de la antitoxina  $\alpha$  cuando se la inyecta conjuntamente, en lugar de aumentarla. Esta acción paradójal es debida probablemente a la de las proteínas contenidas en el suero  $\theta$  que reducen la velocidad de absorción de la antitoxina.

En los experimentos de este autor hay que considerar, antes de aceptar su significación práctica general: a) que el valor de la unidad  $\theta$  está fijado muy arbitrariamente al aceptar que está contenido en la misma cantidad de suero patrón  $\alpha$  que contiene una unidad antitóxica  $\alpha$  (pág. 83) y es seguramente muy pequeño; b) que la acción del suero no se puede manifestar de manera « esencial » pues es inyectado por vía subcutánea muy corto tiempo antes de la infección, lo cual está probado por el mismo autor cuando inyecta suero anti  $\alpha$  mezclado con suero normal y la acción resulta menor; c) que el método de infección no corresponde muy aproximadamente con lo que sucede en la infección natural.

De todos modos el hecho evidente y seguramente válido es la falta de protección por el suero anti  $\theta$  solo.

Nuestros primeros experimentos fueron realizados antes de conocer las publicaciones de Stewart y de Evans, habiendo empleado como técnica la de neutralización del poder patógeno de un cultivo lavado sin adición de activador: ( $\text{CaCl}_2$  o tierra) mezclado con los sueros  $\alpha\theta$  y  $\alpha + \theta$ . Los resultados indicaron de manera evidente que la protección por la mezcla de los sueros  $\alpha$  y  $\theta$  era muy evidente mientras lo era mucho menos por el suero  $\alpha$  y prácticamente nula por el suero  $\theta$ . Por la técnica aconsejada por Evans los resultados no fueron muy demostrativos aunque indicaban de una manera bastante clara que el suero  $\alpha\theta$  protegía mejor que el suero  $\alpha$  solo. En términos generales puede decirse que el suero  $\alpha$  tiene actividad protectora mientras el suero  $\theta$  carece prácticamente de ella, de modo que el problema quedaría reducido a mostrar que la infección por *B. perfringens* puede ser paralizada más efectivamente por la acción conjunta de las antitoxinas  $\alpha$  y  $\theta$  que por la antitoxina  $\alpha$ . Naturalmente ésta es la idea que nos ha guiado a repetir experimentos hasta obtener una respuesta clara, pues la lógica apoyaba el modo de ver expuesto más arriba. Como técnica resolvimos recurrir: 1º) a la acción directa de las bacterias desprovistas de toxina y sin activador, pues probablemente la invasión se hace desde un lugar del músculo lesionado sin que se haya producido una necrosis por el  $\text{CaCl}_2$  ni haya una apreciable cantidad de cuerpos extraños (tierra). En verdad es tan artificial el empleo de un gran número de bacterias lavadas cuanto la facilitación del poder de invasión de pocas bacterias por la acción de  $\text{CaCl}_2$  o de tierra estéril, de modo que cualquiera de los tres procedimientos tendría igual justificación; 2º) al uso de suero inyectado en el torrente sanguíneo y no mezclado con las bacterias, pues cada suero puede tener una acción facilitante de la invasión en distinto grado y los experimentos no serían comparables. Los resultados de un experimento de esta naturaleza se encuentran protocolizados a continuación y prueban de manera muy demostrativa que el suero  $\alpha$  solo, tiene una acción menor y más irregular que las mismas cantidades de antitoxina  $\alpha$  usadas conjuntamente con antitoxina  $\theta$ ; así por ejemplo mientras 200 U. A.  $\alpha$  no protegen, 50 U. A. de antitoxina  $\alpha$  con 50 U. A. de antitoxina  $\theta$  protegen completamente.

Para este experimento se utilizaron un suero anti  $\alpha$  (8731), un suero  $\alpha\theta$  (8890) y un suero anti  $\theta$  (8861). Estos sueros medidos con mayor aproximación y exactitud y se obtuvieron los siguientes valores:

	Valor $\alpha$	Valor $\theta$
8731 $\alpha$	500	5
8890 $\alpha\theta$	400	250
8861 $\theta$	6	300

Se preparan diluciones de los sueros de manera que en 1 cm<sup>3</sup> esté contenida la dosis que se requiere en cada experimento y esta cantidad se inyecta a tres lotes de cobayos: el primero con suero 8731 (antitoxina  $\alpha$ ), el segundo con suero 8890 (antitoxina  $\alpha$  y  $\theta$ ) y el tercero con la mezcla de los sueros 8731 y suero 8861 (antitoxina  $\alpha$  y  $\theta$ ), por vía intracardiaca y a las tres horas se infectan todos con 10.000 millones de bacterias  $\alpha$  lavadas y suspendidas en 1 cm<sup>3</sup> de fisiológica que corresponden a algo más de 20 D. L. M.

COBAYOS PROTEGIDOS CON SUERO ANTITÓXICO  $\alpha$  8731

Con 50 U. A. $\alpha$ y 0,5 $\theta$	Con 100 U. A. $\alpha$ y 1 U. A. $\theta$	Con 200 U. A. $\alpha$ y 2 U. A. $\theta$
354 ed-ed-ped-ped	866 med- +	891 ed-ped-ped-ped
807 ed- +	892 ped- +	893 ped-ped-ped-ped
386 med-med- +	870 med-med-med- +	805 med- +
815 med-med-med-med	809 med- +	849 med- +

COBAYOS PROTEGIDOS CON SUERO ANTITÓXICO  $\alpha\theta$  8890

Con 50 U. A. $\alpha$ y 31 U. A. $\theta$	Con 100 U. A. $\alpha$ y 62 U. A. $\theta$	Con 200 U. A. $\alpha$ y 125 U. A. $\theta$
876 med-med- +	817 ped-0-0-0	884 0-0-0-0
836 0-0-0-0	881 ped-0-0-0	890 0-0-0-0
841 0-0-0-0	820 0-0-0-0	821 0-0-0-0
— — — — —	830 0-0-0-0	853 0-0-0-0

COBAYOS PROTEGIDOS CON SUERO ANTITÓXICO  $\alpha$  8731 Y SUERO ANTITÓXICO  $\theta$  8861

Con 50 U. A. $\alpha$ y 50 U. A. $\theta$	Con 100 U. A. $\alpha$ y 100 U. A. $\theta$	Con 200 U. A. $\alpha$ y 200 U. A. $\theta$
880 0-0-0-0	896 0-0-0-0	831 0-0-0-0
845 0-0-0-0	875 0-0-0-0	847 0-0-0-0
826 0-0-0-0	860 0-0-0-0	872 0-0-0-0
878 0-0-0-0	885 0-0-0-0	867 0-0-0-0

ed = edema; ped = poco edema; med = mucho edema.

6) LA INMUNIZACIÓN ACTIVA  $\alpha$  Y  $\theta$  EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL

La inmunidad activa anti  $\alpha$  de los cobayos se puede conseguir con relativa facilidad por el uso de toxoides  $\alpha$  preparados por desintoxicación con formalina. Sin embargo, el problema de la inmunización activa del hombre no está aún resuelto. Antes de entrar a considerar la solución práctica de ese problema creemos conveniente tener en cuenta la probable participación de la inmunidad anti  $\theta$  en la protección activa contra la infección por *B. perfringens*.

Sólo hemos realizado algunos experimentos preliminares que pueden servir de indicación y prueban que los animales con la doble inmunidad  $\alpha$  y  $\theta$  están mejor protegidos que los que tienen sólo inmunidad  $\alpha$ .

Como antígenos se ha usado: a) un toxoide  $\alpha$  obtenido por desintoxicación por el solo calentamiento a 37°C de la toxina filtrada y en presencia de aire; b) un toxoide  $\alpha$  obtenido por la acción de 6‰ de formalina; c) toxoide  $\theta$  obtenido por oxigenación de la toxina. Cada uno de estos toxoides fué inyectado cuatro veces a un grupo de 10 cobayos en dosis de 0.2 cm<sup>3</sup> con intervalos de 13 días, 7 días y 5 días. Su inmunidad fué probada 6 días después de la última inyección; d) además se inmunizó un cuarto grupo de cobayos con 0.2 de toxoide  $\alpha$ , 6‰ de formol y 0.2 de toxoide  $\theta$  inyectados en lugares distintos, con los mismos intervalos que los otros 3 grupos. La inmunidad fué probada a los 6 días de la última inyección.

La prueba fué practicada de tres maneras diferentes, a saber: 1º) 3 cobayos de cada grupo fueron inyectados con 10 D. L. M. de gérmenes  $\alpha$  lavados; 2º) 3 cobayos de cada grupo con 10 D. L. M. de cultivo  $\theta$ , con toxina  $\theta$  y sin toxina  $\alpha$ , y 3º) 3 cobayos de cada grupo con 10 D. L. M. de un cultivo  $\alpha\theta$  conteniendo toxinas  $\alpha$  y  $\theta$ .

Cobayos inmunizados con:	10 D. L. M. gérmenes $\alpha$ lavados (10.000 millones)	10 D. L. M. cultivo $\theta$ (con toxina $\theta$ ) 0,2 c.c.	10 D. L. M. cultivo $\alpha\theta$ con toxinas $\alpha$ y $\theta$ 0,2 c.c.
Toxoide $\alpha$ (5 días 37°) . . .	827 ped-med-ped-ped	763 ed-ed-ped-ped	725 0-0-0-0
	869 0 0 0 0	774 ed-med-ed-ped	806 ped-ped-0-0
	792 ed-med-ped-ped	782 ped-ped-0-0	823 0-ped-0-0
Toxoide $\alpha$ 6 ‰ formol.	737 ed-ed-0-0	793 0-ped-0-0	768 ed-med-ed-ped
	789 0-med-ped-0	709 ed-med-med-med	701 ped-ped-0-0
	749 ed +	746 ed-med-ped-0	716 ed-med-med-ed
Toxoide $\theta$ por oxigenación	767 ed- +	880 ed-med-ed-ped	735 med- +
	791 ed- +	769 ed- +	794 ed- +
	773 ed- +	778 ed-med-ed-0	758 ed- +
{ Toxoide $\alpha$ 6 ‰ formol Toxoide $\theta$	763 ped-0-0-0	765 ed-ed-ped-0	874 0-0-0-0
	775 0-ped-0-0	745 0-0-0-0	761 0-0-0-0
	868 ed-ped-0-0	755 ed-0-0-0	788 ped-0-0-0
Controles: 500 millones	med-med-med	0,2 ed-med- +	0,2 med-med- +
1000 millones	ed- +	0,2 ed-med-ed- no muere	0,2 ed- +

Los resultados son bastante demostrativos y prueban que la inmunidad anti  $\theta$  (\*) no protege contra los gérmenes lavados ni contra un cultivo  $\alpha\theta$ . Además indican que: 1º) La inmunidad anti  $\alpha$  es suficiente para proteger o aumentar la resistencia de los cobayos contra bacterias lavadas, o cultivo  $\theta$  o cultivo  $\alpha\theta$ ; la inmunidad parece mayor con el toxoide obtenido por calentamiento que por acción de la formalina. 2º) La inmunidad anti  $\theta$  no parece proteger bien contra un cultivo  $\theta$  (con toxina  $\theta$ ). 3º) Los cobayos inmunizados con toxoide  $\alpha$  y con toxoide  $\theta$  están mejor protegidos que los vacunados con toxoide  $\alpha$  sólo tanto en la infección con bacterias lavadas cuanto en la producida por cultivos  $\theta$  y por cultivos  $\alpha\theta$ .

RESUMEN

1.— Se describe: un método de producción de toxina  $\alpha$  de *B. parfringens* A muy activa y libre de toxina  $\theta$ .

(\*) En verdad no se puede decir que existe una inmunidad anti  $\theta$  en los animales de la experiencia, pues no fué ensayado el contenido de anti-toxina del suero y no hay suficiente experiencia para presumir que los cobayos inyectados con toxoide  $\theta$  como lo han sido los del protocolo tienen inmunidad antitóxica  $\theta$  comparable a la que se obtiene con el toxoide  $\alpha$ .

Un método de producción de toxina  $\theta$  de *B. perfringens* A muy activo y libre de toxina  $\alpha$ .

2.—La toxina  $\alpha$  aumenta considerablemente el poder de agresión del *B. perfringens* A; la toxina  $\theta$  tiene una acción semejante.

3.—Se describe un método de obtención de sueros muy activos  $\alpha$  y  $\theta$ .

4.—Por inmunización simultánea de un mismo caballo se obtiene sueros mixtos muy activos tanto para la toxina  $\alpha$  como para la toxina  $\theta$ .

5.—Se ha fijado una unidad antitóxica  $\theta$ , conservada en el Instituto Bacteriológico, que es la actividad de la antitoxina contenida en 0.0006 gr del suero test, seco, que neutraliza por lo menos 30 D. L. M. ratón.

6.—Los métodos de medición in vitro de antitoxina  $\alpha$  usando como indicador la acción de lecitinasa (reacción de Nagler) o la hemólisis de glóbulos, constituyen excelentes procedimientos de medida preliminar.

7.—La medición de la antitoxina  $\theta$  puede ser practicada usando como indicador la hemólisis; es preferible emplear una toxina test seca. Se puede practicar también por la inyección de ratones por vía venosa.

8.—El suero  $\theta$  no protege contra la infección de *B. perfringens* lavado, el suero  $\alpha$  protege de manera evidente aunque su acción es irregular.

9.—Por la acción conjunta de las antitoxinas  $\alpha$  y  $\theta$ , con igual número de unidades antitóxicas de ambas, se obtiene una protección excelente de los animales contra la infección producida por *B. perfringens* lavado y mucho mayor que con antitoxina  $\alpha$  sola.

10.—La inmunidad activa doble, anti  $\alpha$  y anti  $\theta$ , parece más efectiva que la simple inmunidad anti  $\alpha$  tanto para la infección producida por *B. perfringens* lavado cuanto para la producida por cultivos con toxinas  $\theta$  o con toxinas  $\alpha + \theta$

#### BIBLIOGRAFÍA

1. WILSDON, I. J. (1931). — *Univ. Cambridge Inst. Animal Path. 2nd report*, pag. 53 (cit. Oakley).
2. WILSDON, A. J. (1932-33). — *Univ. Cambridge Inst. Animal Path.*, 3rd report, ag. 46 (cit. Oakley).
3. GLENNY, A. T.; LLEWELLYN JONES, M.; DALLING, T., y ROSS, H. E. (1933). — *J. of Path. and Bact.*, 37, 53.
4. LLEWELLYN SMITH, M. (1941). — *Nature* 147, N° 3716.
5. MC. FARLANE, R. G.; OARLEY, C. L., y ANDERSON, C. G. (1941). — *J. Path. Bact.* 52, 99.

6. PRIGGE, R. (1936). — *Zeitschrift J. Immunitätsfors* (89), 477.
7. PRIGGE, R. (1937). — *Zeitschrift J. Immunitätsfors* 91, 557.
8. IPSSEN, J.; LLEWELLYN SMITH, N.; SORDELLI, A. (1939). — *Bull. League Nat. Health Organ* 8, 797.
9. IPSSEN, J., y DAVOLI, R. (1939). — *Bull. League Nat. Health Organ* 8, 833.
10. DALLING, T., y STEPHENSON, M. (1942). — *Nature* 149, N° 3767.
11. OAKLEY, C. L. (1943). — *Bull. of Hyg.* 18, 781.
12. SCHNAYERSON, A. F., y SAMUELS, S. L. (1930). — *J. Immunology* 18, 141.
13. MUTH, O. (1923). — *Biochem Ztschr.* 142, 19.
14. NEILL, J. (1926). — *The J. of Exp. Med.* 44, 215.
15. SORDELLI, A.; JIMÉNEZ de ASÚA, F., y FERRARI, J. (1929). — *Rev. Inst. Bact.*, 5, 527.
16. SORDELLI, A., y FERRARI, J. (1929). — *Rev. Inst. Bact.* 5, 555.
17. SORDELLI, A., y FERRARI, J. (1937). — *Folia Biológica*, N° 74-75, 320.
18. BENGSTON, IDA (STEWART CLAMPIT, M. S.) (1938). — *Bull. League Nat. Health Organ* 7, 802.
19. STEWART, S. (1940). — *Public Health Report* 55, 753.
20. SEAL, S. C. (1942). — *Ind. J. Med. Res.*, 30, 229.
21. TURNER, A. W.; EALEY, C., y PRODWELL, A. W. (1942). — *Nature* 150, 549.
22. V. HEYNINGEN, W. E. (1941). — *Biochemical J.*, 35, 1257.
23. HEWITT, L. F., y TODD, E. W. (1939). — *J. of Path. and Bact.*, 49, 45.
24. MASON, J. H., y GLENNY, A. T. (1928). — *J. Path. and Bact.*, 31, 629.
25. OAKLEY, C. L., y WARRACK, G. H. (1941). — *J. Path. and Bact.*, 53, 335.
26. SORDELLI, A.; SUAREZ, E., y FERRARI, J. (1930). — *Rev. Inst. Bact.*, 5, 836.
27. SEIFFERT, G. (1939). — *Zeitschrift J. Immunitätsfors*, 96, 515.
28. NAGLER, F. P. O. (1939). — *Brit. J. Path.*, 20, 473.
29. V. HEYNINGEN, W. E. (1941). — *Biochemical J.*, 35, 1246.
30. MACFARLANE, G. M., y KNIGHT, B. C. (1941). — *Biochemical J.*, 35, 884.
31. CROOK, E. M. (1942). — *Brit. J. Exper. Path.*, 23, 37.
32. DE KRUIF, P. H., y BOLLMAN, J. L. (1927). — *J. Infet. Dis.*, 21, 588.
33. STEWART, S. (1943). — *Publ. Health Report*, 58, 1277.
34. EVANS, D. G. (1943). — *Brit. J. of Exp. Path.*, 24, 81.

---

Se terminó de imprimir el 1 de Noviembre de 1944, en los  
Talleres Gráficos "TOMAS PALUMBO" - La Madrid 321-325 - Buenos Aires

---