615.37:616.243

PREPARACIÓN DEL SUERO ANTIGANGRENOSO

III. Preparación del suero antioedematiens

POR

ARIOSTO BÜLLER SOUTO y JUAN B. RIVAROLA

Jefe de la Sección de Anaerobios del Instituto Butantan (Brasil)

Jefe del Laboratorio de Seroterapia de la Sanidad Militar (Paraguay)

INTRODUCCIÓN

El *Clostridium oedematiens* fué descripto durante la guerra europea, de 1914 a 1919 por Weinberg y Seguin (13) que llegaron a demonstrar su capacidad de producir exotoxina específica termolabil, incubando de 1 a 6 días a 37° C. en caldo glucosado a 2/1000.

Estos autores, definieron con precisión, las propiedades de la toxina y pudieron preparar sueros altamente antitóxicos por inmunización en caballos.

Las toxinas obtenidas inicialmente fueron débiles, matando los cobayos en 12 a 17 en dilución a 1/40, inoculados en la vena. Estas toxinas, aun a dosis muy altas, jamás mataban los cobayos en forma fulminante, necessitando siempre un período de incubación para producir su acción tóxica.

Más tarde consiguieron toxinas más fuertes que mataba las lauchas blancas en dosis de 1/800 a 1/1600 en 48 horas por inoculación subcutánea (14).

El Medical Research Committe en 1919, (5) aconsejaba para la producción de toxina el mismo medio empleado para la preparación de toxina de Cl. welchii (B. perfringens). La toxina así obtenida mataba los animales de laboratorio por inoculación intravenosa, subcutánea o intramuscular. Esta toxina podía ser fácilmente titulada por la inyección intramuscular en lauchas, tomando en cuentas los resultados después de 48 horas.

En 1928, Sordelli, Ferrari y Mayer (8) usando un caldo básico con pH 8,4, adicionado de 5% de gelatina, conteniendo carne cocida en el fondo e incubado durante 6 a 8 días a 37° C, conseguieron una toxina con D M L de 0.1 a 0.005 para cobayos de 250 gramos inoculados por vía intramuscular, los que moríam 3 o 5 días despuées.

Celareck y Stetkiewicz (2) encontraron que en caldo hígado y el caldo común conteniendo carne cocida en el fondo con pH 7,6 y recubierto con parafina líquida constituía un excelente medio para la obtención de toxina de Cl. oedematiens.

I. — Preparación de la toxina

Cepas

La obtención de buenas muestras productoras de toxina oedematiens no es un problema simple. Una vez obtenida pueden peder bruscamente su capacidad toxigênica. Este hecho pudo ser verificado por nosotros con varias de nuestras cepas. Pasajes de las muestras destinadas a la producción de toxina, por una serie de lauchas blancas, exalta la virulencia. La siembra puede ser hecha directamente con pequeños fragmentos de músculo extraído de lauchas inoculadas. Es mejor repicarlas frecuentemente en tubos de Hall conteniendo fragmentos de hígado en el fondo del caldo, que ha de ser de igual composición que aquel que servirá para la producción de toxina.

Bengtson (1) notó que el Cl. oedematiens, bajo este aspecto, difere del Cl. oedematis-maligni (vibrion séptico) que se comporta muy uniformemente en la producción de toxina; todas las muestras producen toxina de valor aproximado. De 16 amuestras de Cl. oedematiens por ella estudiadas, 4 no producían toxina; 2 nuestras producían toxina fatal para la laucha en la dosis de 0.1 c.c.; 4 producían toxina con DM L de 0.01, y 2 con D M L de 0.001 c.c. o menos.

Medios de cultivo

A.) — Sordelli, Ferrari y Mayer (8) aconsejan el siguiente medio:

1.º — Carne 1 parte y agua 2 partes es dejada en maceración una noche a la temperatura ambiente. Al día siguiente calentar a ebullición durante 30 minutos.

2.º — Filtrar. — Adicionar 5|1000 de cloruro de sodio y 2% de peptona Bacteriológica Park-Davis.

3.º — Ajustar el pH a 8,4 — Precipitar.

4.º — Adicionar 5% de gelatina.

5.º — Esterilizar a 100º C durante 1 hora y a 110º C durante 15 minutos.

6.º — Alcalinizar nuevamente a 8,4 después de la esterilización.

B.) — Walbum y Reymann (10) aconsejan el siguiente medio:

1.º — Caldo común de ternera fermentado por el Coli durante 20 horas a 37º C.

2.º — Calentar al baño maría.

3.º — Filtrar en papel.

4.º — Adicionar 3% de peptona Riedel previamente disuelta.
5.º — Ajustar el pH a 8.0 Distribuir en frascos con 1000 c.c. en cada uno.
6.º — Recubrir con parafina líquida.
7.º — Esterilizar. Conservar en la heladera después de las pruebas de esterilidad.

Antes de sembrar calentar hasta ebullición durante 1 hora y adicionar 20 gramos de carbonato de calcio y calentar otra hora más hasta ebullición.

C.) — Bengtson (1) usa un medio, constituido por 1|4 de caldo básico y 3|4 de caldo común com pH 8,4 distribuido en balones de Erlemeyer de 2 a 4 litros esterilizados en autoclave a 121º C durante 30 minutos. Después de esterilizado la reacción cae a pH 7.0. Antes de usar, los balones son calentados durante 1|2 hora a vapor fluente y enfriados a 40º C adicionándole 5% de suero normal de caballo.

D.) — Nosotros obtenemos buenas toxinas empleando el medio descripto con motivo de la preparación del suero antiperfringens, haciendo la preparación por maceración con Coli a 37º C. durante 24 horas y aumentando la tasa de peptona hasta 2 y 3%.

Condiciones que favorecen la producción de toxina.

1.º — La adición de trozos de hígado produce toxinas con títulos más elevados, que la adición de trozos de músculos en el fondo del balón, tal vez, porque con hígado el *Cl. oedematiens* encuentra mayor facilidad en fabricar nidos de anaerobiosis que tanto auxilia la producción de toxinas fuertes.
2.º — La agitación suave que difunde en todo el medio de cultivo el peroxido formado, evitando que llegado a cierta concentración se destruya la toxina formada o que mueran los gérmenes en los nidos de anaerobiosis.
3.º — La adición de gelatina.
4.º — La adición de carbonato de sodio.
5.º — La adición de suero.
6.º — La adición de cloruro o de sulfato férrico.
7.º — La ausencia de glucosa.

Condiciones que atenuan la producción de toxina.

1.º — La falta de regeneración del medio; la regeneración deberá ser siempre en exceso.
2.º — La presencia de glucosa en los medios de cultivo.

3.º — La oxidación. La toxina líquida deberá ser conservada en frascos color ámbar y completamente llenos. En caso contrario será conservada protegida por una capa de toluol.

4.º — El envejecimiento atenúa la toxina con gran rapidez.

5.º — La acción de la luz solar sobre el medio de cultivo, aun antes de la siembra.

6.º — La caída del pH. La toxina a fin de ser conservada deberá tener el pH ajustado entre 6, 5 y 7.0.

Siembra.

El medio debe ser regenerado con exceso a fin de expulsar completamente el aire, pues el Cl. oedematiens es muy sensible a pequeños trazos de Oxígeno.

El calentamiento debe ser prolongado durante 1 hora en baño maría y por 1|2 hora a vapor fluente.

Oms (7) consigue una siembra buena enfriando la parte inferior del balón hasta una temperatura que sea tolerada por la mano; sembrando el germen en el fondo del balón las capas líquidas más altas conservan una temperatura más elevada que hacia abajo asegurando una anaerobiosis más perfecta.

Las muestras serán siempre conservadas en tubos de Hall, con medios de igual composición al que va a servir para preparar la toxina. Las siembras serán hechas con 20 c.c. de cultura de 24 horas. Se puede igualmente sembrar el medio, con un fragmento de músculo de laucha inoculada con *Cl. oedematiens* algunas horas antes.

Periodo de incubación.

Lo mejor es adoptar, para los fines de un buen crecimiento del Cl. oedematiens, todos los medios de anaerobiosis que tengamos a mano.

Después de la siembra, estando el medio aun caliente, será puesto dentro de grandes secadores Hempel, o en campánulas de vacio dentro de la estufa en comunicación directa con una bomba de vacio, retirando el aire muy lentamente a fin de evitar el burbujamiento del medio o la mojadura de los tapones que podría contaminar los balones. Diariamente será retirado el aire del desecador. Ademais de esto debe procurar hacerse una agitación suave durante todo el período de incubación. Hacemos la filtración del 5.º al 6.º días de incubación a 37º C.

Obtención de la toxina.

Puede obtenerse por filtrado y por centrifugación. La toxina del *Cl. oedematiens* cuando es obtenida de buenas muestras, es siempre una toxina fuerte. Para la inmunización y preparación de nuestros sueros antitóxicos-antimicrobianos, preferimos inicialmente en todos los casos, usar toxinas obtenidas por filtración, asociadas a cuerpos microbianos secos, muertos previamente por el Lugol, en vez de usar las toxinas obtenidas por centrifugación. Las toxinas centrifugadas son usadas sólo cuando son perfectamente límpidas.

Acción de la toxina.

La toxina de *Cl. oedematiens* necesita un período más o menos largo de latencia para producir su acción.

Sobre el aparato circulatorio su acción se manifesta por un aumento de la presión arterial y al comienzo, aumento del número de latidos cardíacos. En el período final disminuyen los latidos cardíacos. La toxina mata por detención del corazón.

Sobre la sangre. — Ciertas muestras de *Cl. oedematiens* secretan hemolisinas. La cultura total destruye *in-vitro* los hematies humanos, de carnero y de cobayo. Entre tanto esta acción, bien que constante, es mucho más débil que la acción hemotóxica de *Cl. perfringens* y de *Cl. oedematis-maligni*. Ciertas muestras ovinas tienen un poder hemolítico muy elevado. Según Walbum (10) la hemolisina del *Clostridum oedematiens* se conserva mejor con pH 6.0.

Sobre el aparato respiratorio. — Produce un aumento del número de excursiones respiratorias, con disminución de la amplitud de las mismas. En los períodos finales produce disnea.

Sintomatología

Según Humpreys (4) el animal inoculado con toxina de *Cl. oedematiens* presenta siempre un cierto período de latencia. Este período de incubación, varía de 6 a 18 horas, durante el cual no se notan ningún síntoma, no siendo un edema local. Después de este período de incubación, los pelos del animal se erizan, el ritmo respiratorio se acelera, los flancos se escaran y el animal se enfría gradualmente apareciendo convulsiones. Cuando se usan cobayos, además de estos síntomas, estos animales lanzan pequeños gritos. La muerte sobreviene rápidamente con síntomas de intoxicación grave. La disnea y sobre todo la hipotermia constituyen señales precursoras de muerte próxima.

Necropsia.

La toxina de *Cl. oedematiens* produce como carácter distintivo un edema gelatinoso incoloro que llega a tomar tanto el músculo como el tejido subcutáneo. Este edema no produce crepitación gaseosa y se diferencia fundamentalmente del edema producido por la toxina de *Cl. oedematis maligni* (v. séptico) que es intensamente rojo y da crepitación gaseosa.Si la infección evoluciona rápidamente, el edema toma a veces una coloración rosada.

La inoculación intramuscular de la toxina en el músculo de la pata de la laucha produce un aumento del volumen del miembro inoculado. La pata se torna fría, la piel pálida y azulada. Un edema poco depresible invade la pared abdominal y va hasta afuera. Por la incisión se constata la presencia de un edema gelatinoso franco incoloro o de coloración rosada.

No hay necrosis del tejido atacado y la lesión no tiene olor fétido.

Nótase zonas de necrosis en el hígado, bazo y riñón. Hiperemia de los intestinos y cápsulas suprarenales.

Determinación de D M L.

Esta determinación se hace en lauchas blancas por inoculación intramuscular. La D M L es en general 28 veces menos que *Test-dosis.*

Preparación de la toxina seca.

Se prepara usando la técnica descripta a propósito de la preparación de la toxina de *Cl. welchii.* Es necesario precipitar la toxina en una atmósfera con nitrógeno, debido a la combinación del sulfato de amonio con el oxígeno del aire. El medio gelatinoso de Sordelli no sirve para la preparación de la toxina seca.

Determinación de la D M L de la toxina seca.

Diluir la toxina en solución salina o caldo con pH 7.0 (el caldo peptonado ejerce acción protectora contra la oxidación de las toxinas y asi obtenemos valores más elevados), e inocular en lauchas por vía intramuscular. Solamente aprovechamos las toxinas secas muy fuertes para toxina Patrón. Las toxinas débiles son aprovechadas para inmunización.

II. — Preparación del suero antioedematiens.

Inmunización

El animal de elección para la preparación del suero antioedematiens es el caballo. La preparación del suero antioedematiens exige, más que ningún otro, excepcionales cuidados en lo que respecta a la vida de los animales empleados para la inmunización. El caballo es muy sensible a la acción de esta toxina. La inoculación de débiles dosis deter mina la aparición de edemas locales y edemas a distancia, que desaparecen a solamente después de varias semanas. El caballo presenta además de síntomas locales graves, fiebre, disnea y pérdida de apetito que muchas veces hace temer por su existencia.

La inmunización se inicia con el suero atigangrenoso polivalente y anatoxina, pasándose después a anatoxina pura, más cuerpos microbianos, inoculados con mixturas de anatoxina directamente en la vena. Alcanzado a 300 c.c. de anatoxina se practica la sangría de prueba; si el suero del animal presenta ya alguna antitoxina circulante se podrá pasar directamente a toxina pura o asociada a cuerpos microbianos. Las toxinas usadas podrán ser secas, como se usa actualmente en el Instituto Butantan o toxinas brutas recientemente preparadas conservadas con toluol y pH 6, 5 e, 7. A los antígenos específicos asociamos ciertos antígenos inespecíficos tales como la tapioca, el cloruro de calcio o lanolina. Algunos animales fueron inmunizados co n éxito por medio de anaculturas.

Preparación de los cuerpos microbianos.

1. — Centrifugar las culturas.
2. — Diluir el depósito de centrifugación en 10% de solución salina en relación al volumen centrifugado. Por ejemplo si se ha centrifugado 4 litros, se diluirá en 400 c.c. de salina.
3. — Agregar formol al 4 por mil en proporción a la cultura centrifugada.
4. — Agitar vigorosamente.
5. — Llevar a la estufa durante 4 dias a 37° C.
6. — Verificar esterilidad para anaerobios y aerobios.
7. — Lavar los cuerpos microbianos en agua fisiológica, dos veces seguida, centrifugando cada vez renovando la solución fisiológica.
8. — Recoger el depósito en placa de Petri con el mínimo posible de líquido.
9. — Desecar al vacuo sulfúrico.
10. — Triturar en mortero.
11. — Pesar la cantidad total obtenida a fin de hacer la proporción entre la toxina bruta y la cantidad de cuerpos microbianos.

Importante. — El grado de diución tiene mucha importancia. Emulsiones poco voluminosas y muy densas provocan abcesos. Diluciones muy voluminosas dan lugar a placas de induramiento en el punto de inoculación y a veces grandes abcesos que pueden perjudicar las inoculaciones siguientes. Es pues necesario usar volúmenes medios. Dosis de 50, 100, 150 c.c. que deberán ser inoculados conforme al peso del germen a inocular.

Preparación de la anacultura.

Es preparada de acuerdo a la técnica de Weinberg y Prevot (12). Las culturas de *Cl. oedematiens* exigen 7 dias de estufa a 37° C con formol al 3/1000 para transformarlas en anaculturas.

CONTROL. — Esta anacultura inoculada en la dosis de 10 a 20 c.c. a un cobayo, no debe producir sino tumefacción ligera.

Preparación de la anatoxina.

Se transforma la toxina de *Cl. oedematiens* en anatoxina adicionándole formol de 1.5 a 3 por mil y dejando 7 a 8 días en la estufa a 37° C.

Esta toxina puede ser purificada por el sulfato de amonio y dializada. Inoculada por vía intravenosa produce un voluminoso exudado seroso de la cavidad pericárdica; no produce sin emargo el edema gelatinoso subcutáneo que es característico de *Cl. oedematiens.*

Control. — Una dosis de 3 a 5 c.c. de anatoxina no debe producir reacción inflamatoria en el cobayo.

III. — Dosificación del suero antioedematiens.

En 1932 el Comité Permanente de Standardización Biológica de la Liga de las Naciones reunido en Copenhague decidió que el State Serum Institute de Copenhague estableciese una nueva unidad antigangrenosa (oedematiens) basado sobre los mismos principios seguidos para la antitoxina perfringens.

Naturaleza del Patrón.

La unidad antioedematiens internacional es definida como la actividad antitóxica específica ejercida por 0.2681 mgs. de la preparación seca y estable de suero antioedematiens. Por sugestión del Profesor Martins fue especificado

que 1 unidad neutraliza una cantidad correspondiente de cerca de 1.400 D M L para la laucha, de la toxina usada en las experiencias de determinación. Una unidad internacional corresponde a 10 unidades francesas y a 50 unidades alemanas. Una unidad francesa corresponde a 5 unidades alemanas y a 0.1 unidad internacional.

Preparación del Patrón.

El suero Patrón es preparado de suero de caballo inmunizado contra cuerpos microbianos y toxina de *Cl. oedematiens*. El suero antioedematiens para ser usado como Patrón debe tener un título elevado. El suero natural (sin adición de antisépticos) es distribuído rigurosamente por medio de pipetas aforadas o de aparatos apropriados, en ampollas en la cantidad de 5 c.c. Las ampollas son colocadas en desecadores con cloruro de calcio y ligado al vacuo, hasta que el contenido dé la apariencia de estar seco. Esto se consigue en 2 ó 3 días, siendo necesario durante estos días cambiar varias veces el cloruro de calcio contenido en el desecador. Colócase entonces las ampollas en otra serie de desecadores conteniendo anhídrido pentafosfórico. Se dejan allí estas ampollas durante 2 meses hasta conseguir que se torne completamente seca. Una que otra vez han de ser retiradas de estos desecadores y pesadas. Cuando se ha alcanzado un peso constante deben ser llenadas con nitrógeno, cerradas, y conservadas en la obscuridad, a 4° C.

Uso del Patrón.

El suero Patrón de acuerdo con Therapeutique Substances Act (1925) debe ser disuelto en solución glicerinada (glicerina neutra 2 partes, solución salina con pH 7.0 una parte).

El poder antitóxico de los sueros antioedematiens es determinado por inyección en animales sensibles de una mixtura de la antitoxina oedematiens en prueba con la toxina oedematiens Patrón que fue standardizada en relación al suero patrón antioedematiens.

Animales usados.

Se usan para estas determinaciones, por vía muscular, lauchas blancas de 17 a 20 gramos.

Toxina Patrón para los dosages.

Para el dosage del suero antioedematiens es necesario standardizar las toxinas oedematiens en relación al suero Patrón antioedematiens.

Determinación del test-dosis (L t) de toxina Patrón.

Definición. — Test-dosis de toxina oedematiens es la cantidad de toxina las que mixturada con 0.02 unidad antitóxica Patrón mata algunas, pero no todas las lauchas inoculadas (cerca de 50 %).

Para determinar el test-dosis de toxina oedematiens preparar las siguientes diluciones:

a). — 1 c.c. de antitoxina patrón es diluída de tal manera que 1 c.c. contenga 0.2 unidad antitóxica.

b). — Una cierta cantidad de toxina oedematiens es cuidadosamente pesada y disuelta en solución salina fisiológica con pH 7.0. El volumen final debe ser completado de tal manera que 1 c.c. de solución contenga 50 mgs de toxina.

c). — Las mixturas de cada una de las diluciones de antitoxina patrón son hechas en un volumen total de 0.2 c.c. (cantidad a ser inyectada en el músculo de la laucha) el cual deberá contener 0.1 c.c. de antitoxina diluída (0.02 unidades) más cantidades variables de solución de toxina.

Las mixturas son dejadas a la temperatura ambiente durante 1 hora, siendo inyectadas por vía muscular (0.2 c.c.) en grupos de 6 lauchas. Las lauchas deben pertenecer a un stock uniforme y tener un peso también uniforme de 17 a 20 gramos. Los animales inoculados serán observados durante tres dias, debiendo mantenérselos en un cuarto con temperatura constante.

Un **L t** contiene en general 28 D M L de toxina.

Dosage de antitoxina oedematiens de valor desconocido

(Dosages previos)

Preparar las diluciones siguientes:

a). — Dilución de suero en prueba.

b). — Preparar las diluciones de toxina Patrón. La toxina es rigurosamente pesada y disuelta en solución salina de manera que 1 test-dosis esté contenido en 0.1 c.c.

Las mixturas de las diluciones de suero a dosar con el test-dosis son hechas en un volumen total de 0.2 c.c. en tubos especiales. Estos contienen cantidades variables de suero a dosar líquido, más 0.1 c.c. de test-dosis y más la cantidad necesaria de toxina para completar el volumen total de 0.2 c.c.

Las diluciones son dejadas durante 1 hora a la temperatura ambiente. La dosis total de 0.2 c.c. es inoculada intramuscularmente en 4 lauchas blancas de 17 a 20 gramos mantenidos a temperatura constante.

Aconsejamos usar jeringas metálicas de 0.25 c.c. divididas en centécimos, debiendo emplearse una jeringa para cada serie de diluciones a fin de evitar que quede retenido mucho líquido de cada dilución en el pabellón de la jeringa o en la aguja.

Testigos. — Cada dosage será acompañado siempre de su testigo. Sin estos testigos el dosage no tendrá valor. Los testigos serán inoculados con 0.02 unidad de suero patrón antiodematiens, más 1 test-dosis y cantidades mínimas de toxina, superiores o inferiores a este test-dosis.

Los testigos indicarán si la cantidad de toxina empleada como test-dosis es exacta, o si fue usada una dosis demasiado grande o muy pequeña como test-dosis.

El porcentaje de animales sobrevivientes indicarán la protección aproximada conferida por el suero en prueba. Para obtener resultados más exactos, es necessario hacer dosages definitivos.

Dosages definitivos.

La técnica a usar es la misma empleada en los ensayos previos, sólo que en estos casos el número de animales de experiencia debe ser aumentado a 10 ó 12 para cada dosage.

Metodo intracutaneo.

El suero antiodematiens puede ser también dosado por vía intracutáneo.

BIBLIOGRAFIA

1. *Bengtson, I. A.* — "The official United States and International unit for standardizing Gas Gangrene Antitoxin (Oedematiens)". Public Health Reports **51** (11): 266. 1936.
2. *Celareck, J.* y *Stelkiewicz, S.* — "Contrbution a l'étude des hémotoxines de la gangrene gazeuse". C. R. Soc. Biol. **122** (16): 143. 1936.
3. *Glotova, H. V.* — "Étude comparée des sérums étalons anti-gangréneux internacionaux et soviétiques". Ann. Inst. Pasteur **59** (5): 526. 1937.
4. *Humphreys, F. B., Gay, F. P.* — "Agents of diseases and Host Resistance". E. & Thomas New York, 1935.
5. Medical Research Committee — Report on the anaerobic infections of wounds and the Bacteriological and serological problems arising therefrom — Special Report Series (39): 188. 1919.
6. *Meisner, H.* y *Schoop* — "Die islandische Bradapest im Vergleich mit der deutschen Bradsot". Acta. Patol. Microb. Scand. Sup. **18**: 165. 1934.
7. *Oms, F V.* — "Preparación del suero antigangrenoso". Morata, Editor. 1929.
8. *Sordellii, A.; Ferrari, J.* y *Mayer, E.* — "Medición del suero anti-oedematiens". Rev. Inst. Bact. **5** (5): 573. 1919.
9. *Walbum, L. E., Reymann, C.* — "A proposed international Standard for gas gangrene antitoxin (Oedematiens)" Quarterly Bull. Health Organization League Nations — Special Number — Biological Standardisation, Extract E., 1, 1935.
10. *Walbum, L. E. e Reymann, G. C.* — "The production of toxin by Clostridium oedematiens (B. novyi)". Jour. Pathol. Bact. **46** (2): 1937.
11. *Weinberg, M., Nativelle, R.* y *Prévot, A.* — "Les microbes anaerobies": 263. Masson & Cie. Paris. 1937.
12. *Weinberg, M.* y *Prévot, A.* — "Nouvelles recherches sur les anatoxines gangreneuses, leur emploi dans la vaccination du cobaye et la préparation des serums specifiques". C. R. Soc. Biologie **92**: 1484. 1925.
13. *Weinberg, M.* y *Seguin, P.* — "Du serum anti-oedematiens". C. R. Soc. Biologie **18** 552: 507. 1915.
14. *Weinberg, M.* y *Seguin, P.* — "La gangrene gazeuse": 144. Masson & Cia. Paris, 1917.
15. *Sordelli, A., Ferrari, J.* — "Comunidad antigénica entre las toxinas de B. hemolyticus B gigas, B. perfringens y B. oedematiens". Folia Biológica **74** y **75**: 320. 1937.