

## PREPARACIÓN DEL SUERO ANTIGANGRENOSO

### IV. Preparación del suero antihistolyticum

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

La propiedad del *Cl. histolyticum* de producir toxina específica se debe a los estudios de Weinberg y Seguin (20).

La toxina obtenida era termolábil, no hemotóxica llegando al máximo de su concentración con 18 a 24 horas de incubación a 37° C, en un caldo de carne con o sin glucosa y con trozos de carne en el fondo, recubierto con parafina líquida para asegurar las condiciones de anaerobiosis.

El Medical Research Committee (8) demostró que la toxina de *Cl. histolyticum* podía ser producida en culturas de caldo de carne después de incubación durante 14 a 16 horas. Después de 18 horas la toxina sería destruida.

Mac Intosh y Bulloch (7) acentuaron las graves reacciones locales producidas en el sitio de la inoculación.

Mita (9) empleando caldo de hígado con pH 7.2 a 7,8 pudo obtener excelente toxina después de 24 horas de incubación.

Stewart (13) estudió la influencia de la reacción del medio, el periodo de incubación, el efecto de la adición de glucosa, y los resultados obtenidos con dos diferentes tipos de peptona, en la producción de toxina histolytica. Con infusión de carne conteniendo 1 % de peptona, 2 % de glucosa y con pH 7,6 pudo obtener buenas toxinas (D M L para la laucha de 0.002 a 0.005 c.c.). Las variaciones de pH podían ir de 6,8 a 7,8 sin que la producción de toxina se alterase sensiblemente, siempre que las demás condiciones del medio fuesen óptimas, así como las condiciones de anaerobiosis satisfactorias.



Con infusión de carne, más 1 ó 2 % de peptona, Stewart pudo obtener toxinas más potentes con una D M L para la laucha de 0.002 c.c. a 0,005 c.c. obteniendo también fuerte hemolisis (0.1 c.c. de cultura da completa hemolisis de 0.5 c.c. de suspensión al 5 % de glóbulos rojos de conejo lavados). La prueba de nitroprusiato de sodio para la verificación de la presencia del grupo sulfídrico era fuertemente positiva.

## I. — Preparación de la toxina

### *Cepa*

Para obtener buenas toxinas es menester usar muestras toxigénicas frecuentemente repicadas. Las muestras usadas para la preparación de toxina no deben tener nunca más de 18 horas. Cuando se usan culturas más viejas se constata una acentuada disminución de la D M L de la toxina.

Pasajes intermedios en cobayos exaltan el poder toxígeno de las muestras.

El poder toxígeno no se altera cuando se conservan las muestras toxigénicas en la heladera y son repicadas en caldo clara de huevo.

Smith (11) ha observado alteraciones en la estructura antigénica de *Cl. histolyticum* en relación a las variaciones S—R. Este autor llama la atención en el sentido de que las variaciones en la estructura antigénica de los anaerobios esporulados no han sido suficientemente estudiadas.

Existiendo por otra parte estrecha correlación morfológica y bioquímica (5) entre el *Cl. histolyticum* y el *Cl. sporogenes* es necesario especiales precauciones a este respecto.

En el Instituto Butantan poseemos 16 cepas para la preparación de suero anti-histolyticum.

### *Medios de cultivo*

A).	Hígado .....	500 gramos
	Peptona Chapoteaut .....	10 gramos
	Agua .....	1000. c.c.

Operar así:

1. — Lavar el hígado.
2. — Pasar por la máquina.
4. — Macerar durante 12 horas a la temperatura ambiente.
5. — Hervir a fuego lento, 15 minutos.
6. — Colar en paño.
7. — Filtrar por papel N. 50.



8. — Agregar la peptona. Ajustar a pH 8.0.
9. — Llevar al autoclave a 120° C durante 20 minutos.
10. — Filtrar nuevamente por papel de filtro.
11. — Distribuir en balones agregando trozos de hígado y vaselina líquida.
12. — Esterilizar a 115° C durante 30 minutos.
13. — Ajustar el pH a 7.8.
14. — En el momento de usar calentar a 70° en baño maría y enfriar brusca-mente a 37° C. Hacer las siembras con cultivos preparados de antema-no de *Cl. histolyticum*.

B). — En comunicación personal el Doctor Reymann nos indicó el siguiente medio:

“Aus unseren Aufsätzen werden Sie ersehen, dass wir für die Versuche einen Apparat mit Umrühren verwenden; in der taglichen Toxindarstellung tun wir dies nicht, sondern verwenden 1 ½ Literkolben, die dann und wann geschwenkt werden, weil dies bei der immer launischen Toxinbildung es erlaubt, jeden einzelnen Kolben auszutitrieren”.

“Für die Toxindarstellung mit *B. histolyticus* un *B. Sordelli* verwenden wir dasselbe Nährmedium wie bei den anderen Anaeroben und zwar bei *Histo-lyticus* mit 0.5 % Glucose aber mit einer Bebrütungszeit auf 48 Stunden. In beiden Fällen bei pH 7,5. Bei sammtlichen toxigenen Anaeroben wirkt ein Zusatz von 5—10 % normalen Pferdeserum auf die Toxinbildung fordernd ein.

En trabajos posteriores con Walbum, aconseja Reymann (16) adicionar al medio arriba descrito, 1 % de peptona Riedel. Ajustar el pH a 8.0 antes de autoclavar, el cual después de autoclavado cae a pH 7,9.

Los medios de cultivos estériles, en balones de 1 litro, son conservados en la heladera. Inmediatamente antes de uso adicionar al medio, 20 a 30 gramos de carbonato de calcio por litro y la cantidad necesaria de glucosa (de una so-lución al 50 %). El caldo es entonces hervido y su superficie recubierta con una capa de parafina líquida estéril.

Stewart (13) usa caldo-infusión de carne con 1 % de peptona Witte y pH 7,6, distribuido en frascos de 2 litros. En el momento de sembrar caliente durante dos horas a vapor fluente y enfría a 40° C.

#### *Condiciones que favorecen la producción de toxina.*

1. — La agitación suave.
2. — La adición de cloruro de calcio que impide que el pH caiga por debajo de 6. La toxina se conserva mejor a pH 6 ó pH 6,5.
3. — La adición de hígado, músculo fresco, carne cocida o suero de caballo.



4. — La adición de peptona, rica en grupos sulfidrilo.

*Condiciones que atenuan la toxina.*

1. — La filtración.
2. — El tiempo de permanencia en la estufa (más de 18 horas).
3. — La falta del calentamiento previo del medio.
4. — La acción directa de la luz solar sobre el medio, aun antes de sembrado.
5. — La permanencia prolongada del medio de cultivo a la temperatura ambiente. Después de haber hecho la prueba de esterilidad debe ser conservada en el frigore.
6. — La acidez del medio o de la toxina. El pH debe estar a 6, ó 6,5.

*Condiciones que no influyen.*

La adición de Permutito para retirar cualquier trazo de histamina proveniente del caldo hígado. La adición de cisteína.

El pH inicial del medio que puede estar entre 6,8 a 7,8.

*Obtención de la toxina.*

La toxina del *Cl. histolyticum* pasa difícilmente a través de la vela filtrante; esta la retiene en su mayor parte. Las velas Chamberland retienen más toxinas que las velas Berkefeld.

El poder tóxico de los filtrados es igual a un tercio o a una mitad del poder tóxico de la toxina original. La centrifugación a alta velocidad por medio de centrifugadoras refrigeradas proporcionan toxina con elevada D M L y muy pocos gérmenes, óptimas para inmunización.

*Acción de toxina.*

Inoculada por vía venosa la toxina histolítica produce acción letal aguda.

Por vía muscular produce acción necrótica muy activa, disolución del tejido muscular, lisis de los núcleos y vaciamiento completo de las fibras quedando sólo el sarcolema. La fibra muscular se llena de sangre coagulada. La acción de la toxina no es específica solamente para el músculo, degenerando también profundamente los órganos.



Sobre el *aparato circulatorio* se manifiesta por una aceleración de los movimientos cardíacos y aumento de la presión arterial. El músculo cardíaco sufre intensa acción degenerativa cuando la toxina es inoculada por vía venosa.

Las paredes vasculares se rompen debido a la acción histolizante de la toxina y se produce hemorragias difusas, la sangre se mezcla al tejido muscular licuefacto.

*Sobre la sangre.* — El *Cl. histolyticum* no secreta hemosilina para los hematies del hombre, carnero y cobayo.

*Sobre el aparato respiratorio.* — Produce taquipnea al comienzo e intensa disnea en el periodo preagónico.

### *Sintomatología.*

Conforme ya había sido verificado por el Medical Research Committee (8) la acción de la toxina histolítica se asemeja a la acción del V. séptico en lo que se refiere al período de incubación. En ambos el período de incubación no existe. Las lauchas inoculadas con dosis altas de toxina caen como fulminadas muriendo instantáneamente. Después de la inyección intramuscular, las lauchas tórnanse intensamente disneicas, ejecutan movimientos desordenados, las patas anteriores quedan paralizadas, los músculos del cuello presentan contracturas violentas y espasmódicas, agitan la cabeza en todo sentido, procuran arrastrarse con auxilio de las patas posteriores sobreviniendo una fase de violentas convulsiones. El animal cae sobre un lado, ejecuta rapidísimos movimientos con los miembros posteriores. La respiración se torna difícil y muy lenta. La laucha cae en coma y muere después de un tiempo más o menos corto.

### *Necropsia.*

La toxina histolítica reproduce *in vitro* como *in vivo* todos los fenómenos observados con el cultivo. Si el animal es sacrificado poco tiempo después de inoculada la toxina en el músculo de la pata, se constata la existencia de un edema blando, depresible que invade una parte del abdomen. Al comienzo muestra la existencia de una masa hemorrágica en el tejido conjuntivo subcutáneo encontrándose coágulos enrojecidos. El tejido subcutáneo y perimuscular es fuertemente alterado o en vías de digestión intensa. La lesión se prolonga por un edema suero-hemorrágico que invade el tejido conjuntivo del abdomen. Si el animal muere al fin de un período más o menos largo se constatan un edema disecante y una alteración completa de la arquitectura de los elementos del tejido muscular. Las células todavía aisladas degeneran, las fibras mus-



culares están vacuolizadas y presentan al corte un aspecto fenestrado. Los músculos están disociados y licuefactos, lo que se puede verificar externamente por la palpación del miembro. Esta histolisis llega a todos los tejidos, desde la piel hasta el hueso. La epidermis es roja violásea. La lesión se abre espontáneamente al fin de 12 a 16 horas dejando ver una papilla hemorrágica constituida por tejidos degenerados. El femur, la tibia y el peroné quedan completamente desnudos.

Los ligamentos articulares son a veces alcanzados y el miembro se destaca espontáneamente existiendo una auto-amputación inflamatoria. Esta histolisis no es pútrida ni gaseosa. Si la histolisis llega a la pared abdominal y peritoneal encontraremos en la autopsia las asas intestinales haciendo hernia, exteriormente.

El bazo se presenta hipertrofiado, friable y de un color rojo negruzco.

Las cápsulas suprarenales hemorrágicas. El hígado congestionado y aumentado de volume. Los pulmones pueden estar normales o presentar signos de edema y congestión. El músculo cardíaco tal como acentúa Robertson (10) presenta profundas alteraciones degenerativas.

#### *Determinación de D M L.*

Esta determinación se hace en lauchas blancas de 17 a 20 gramos por vía venosa.

#### *Preparación de la toxina seca.*

Se prepara de acuerdo a la técnica empleada para la preparación de la toxina seca del *Cl. perfringens*.

#### *Determinación de la D M L de la toxina seca.*

Diluir la la toxina en solución salina o caldo con pH 7.0 (con caldo titulados obtenidos son mayores debido a la acción protectora de la peptona) e inocular lauchas de 17 a 20 gramos por vía venosa. Aprovechamos las toxinas secas muy fuertes para toxina patrón; las toxinas más débiles son aprovechadas para inmunización.

### **II. — Preparación del suero antihistolyticum.**

El animal de elección es el caballo. El caballo es muy sensible a la acción de la toxina. La inoculación de esta toxina provoca en los tres primeros



meses de inmunización, edema y formación de colecciones líquidas que llegan a tomar un gran volumen. La piel que recubre esta colección se adelgaza considerablemente y clínicamente podría concluir por la existencia de un absceso purulento con inminencia de romperse. Entre tanto esta colección no se rompe, el líquido se reabsorbe poco a poco acabando por desaparecer completamente al fin de 8 a 10 días.

Weinberg, Nativelle, y Prevot, (18) afirman que esta colección es una colección hemorrágica provocada por la destrucción de algunos vasos y del tejido subcutáneo producida por el fermento fibrinolítico. Durante la inmunización los animales pueden presentar reacciones generales intensas. Las reacciones locales se caracterizan en el punto de inoculación por grandes abscesos que se funden produciendo extensa ulceración o cicatrización consecutiva. El pus es amarillo rojizo, gomoso, encontrándose allí el *Cl. histolyticum* en abundancia.

### *Inmunización.*

La inmunización se inicia con suero antigangrenoso (sólo en la primera dosis) y anatoxina centrifugada, pasándose a anatoxina sola. Después de la inoculación de 300 c.c. de Anatoxina sola, se practica una sangría de prueba. Si el suero posee anatoxina en cantidad suficiente se pasa a toxina. Las toxinas para inmunización podrán ser secas o frescas conservadas sob toluol.

A los antígenos específicos asociamos ciertas substancias estimulantes tales como tapioca o cloruro de calcio o lanolina. A fin de producir un estímulo mayor asociamos a estos antígenos inespecíficos cuerpos microbianos homólogos tal como hicimos con los demás sueros. Algunos animales fueron inmunizados con anaculturas.

### *Preparación de los cuerpos microbianos.*

Operar así:

1. — Centrifugar las culturas.
2. — Diluir el depósito de centrifugación en 10 % de solución salina fisiológica y en relación al volumen centrifugado.
3. — Agregar formol al 4 por mil en proporción a la cultura centrifugada.
4. — Agitar vigorosamente.
5. — Dejar en la estufa por 4 días a 37.º C.
6. — Verificar esterilidad para aerobios y anaerobios.
7. — Lavar los cuerpos microbianos en agua fisiológica dos veces seguida, centrifugando cada vez y renovando el agua fisiológica.



8. — Recoger el depósito en Placa de Petri con mínimo posible de líquido.
9. — Desecar al Vacío sulfúrico.
10. — Pesar la cantidad total obtenida a fin de hacer las proporciones entre la Toxina bruta y la cantidad de cuerpos microbianos obtenidos.

*Importante.* — El grado de dilución tiene mucha importancia. Emulsiones poco voluminosas y muy densas provocan abscesos. Diluciones muy voluminosas prvocan largas placas de induración en el punto de inoculación y a veces grandes abscesos que pueden interrumpir las inoculaciones siguientes. Es necesario pues usar volúmenes medios, dosis de 50—100—150 c.c. que deben ser inoculados conforme al peso de los microbios a inyectar.

Esquema :

#### *Preparación de anaculturas.*

Adicionar a la toxina bruta formol al 5 por mil y dejar en la estufa a la temperatura de 37. C durante 15 días. Puede dejarse 8 días adicionando formol al 10 por mil (Weinberg y Prevot).

#### *Preparación de la anatoxina.*

Se prepara de acuerdo con la técnica de Weinberg y Prevot (19). Se adiciona formol al 1,5 a 3 por mil y se deja en la estufa a 37.º C durante 7 a 8 días.

*Control.* — La dosis de 3 a 5 c.c. de esta Anatoxina así preparada no debe provocar reacción inflamatoria en el cobayo (por vía subcutánea).

### **III. — Dosificación del suero antihistolyticum.**

La Comisión Permanente de Standardización Biológica reunida en Copenhague en Noviembre de 1932 decidió que la Antitoxina de la Gangrena Gaseosa (histolyticum) debía ser preparada en líneas generales, de acuerdo con la técnica aconsejada para la preparación de antitoxina de la gangrena gaseosa (perfringens). Fue propuesta y aceptada por el Comité Permanente de Patronización Biológica de la Liga de Naciones y por el National Institute of Health de Washington (1) un nuevo Patrón internacional para la antitoxina de Gangrena gaseosa (histolyticum) determinado por Walbun y Reymann (6), (14) y (15).



### *Naturaleza del Patrón.*

La unidad antihistolítica internacional es definida como la actividad antitóxica específica ejercida por 0.3575 mgs. de la preparación seca y estable de suero antihistolítico.

Una unidad internacional corresponde a 1 unidad francesa y equivale a 3 unidades alemanas.

### *Preparación del Patrón.*

Es preparado de suero natural separado de un caballo inmunizado contra toxina de Gangrena Gaseosa (*histolyticum*) y conservado sin adición de antisépticos.

El suero para ser usado como Patrón debe tener título elevado. Es distribuido por medio de aparatos especiales o de pipetas aforadas en ampollas en la cantidad de 5 c.c. Las ampollas son colocadas en desecadores conteniendo cloruro de calcio y ligado al vacuo hasta que el contenido de las ampollas den la apariencia de estar seco. Esto se observa al fin de 2 ó 3 días, siendo necesario durante este tiempo cambiar el cloruro de calcio contenido en el desecador.

Colócase las ampollas en otra serie de desecadores conteniendo anhídrido pentafosfórico conservándolas aquí por 2 ó 3 meses hasta completa desecación. Una que otra vez son retiradas y pesadas. Cuando alcanzaren un peso constante son llenadas con nitrógeno y cerradas, conservándose en la obscuridad y a la temperatura de 4.º C.

### *Uso del Patrón.*

De acuerdo con Therapeutique Substances Act (1925) el suero Patrón debe ser disuelto en solución glicerizada (glicerina neutra 2 partes, solución salina fisiológica con pH 7.0 una parte).

El poder antitóxico en unidades de antitoxina de gangrena gaseosa (*histolyticum*) es determinado por inyecciones en animales (lauchas) de una mezcla de la antitoxina en prueba con la toxina de la gangrena gaseosa (*histolyticum*) que fue standardizada en relación de la Antitoxina patrón de gangrena gaseosa (*histolyticum*).

### *Animales usados.*

Para la standardización de la Antitoxina de la Gangrena gaseosa (*histolyticum*) puede usarse cobayos y lauchas blancas, siendo preferibles las lauchas



blancas, tal como recomienda el Comité Permanente de Standardización Biológica de la Liga de las Naciones, por ser más simples, rápido, económico y preciso. Son necesarias lauchas de la misma generación y con peso uniforme de 17 a 20 gramos.

#### *Toxina Patrón para los dosages.*

Para la dosificación de la Antitoxina de la Gangrena gaseosa (*histolyticum*) es esencial tener una Toxina Patrón de la gangrena gaseosa (*histolyticum*) seca, estable y exactamente standardizada.

#### *Determinación de test-dosis de toxina Patrón.*

*Definición.* — Test-dosis (L t) de toxina antihistolyticum es la cantidad de toxina que mixturada con 1 unidad de antitoxina Patrón mata un cierto número de lauchas inoculadas, pero no todas (más o menos el 50%).

Para la determinación del test-dosis preparar las siguientes diluciones:

- 1.º — 1 c.c. de solución de antitoxina Patrón (*histolyticum*) es diluido de manera que 1 c.c. de la dilución contenga 5 unidades patrón.
- 2.º — Una cierta cantidad de toxina seca es rápida y rigurosamente pesada y disuelta en solución salina con pH 7.0. El volume debe ser ajustado de tal manera que 10 miligramos de toxina estén contenidos en 1 c.c. de la dilución.

Una vez determinada el test-dosis, las ampollas que contienen la toxina seca deben permanecer rigurosamente cerradas y al abrigo de la luz.

Las mixturas de la dilución de la Antitoxina Patrón y de la dilución de toxina son echas en un volume total de 0.5 c.c. (cantidad a ser inyectada en cada laucha), la cual deberá contener 0.2 c.c. de Antitoxina diluida (1 Unidad), más cantidades variables de la dilución de Toxina.

Las mixturas son dejadas a la temperatura ambiente durante 2 horas, formándose un ligero precipitado que debe ser removido por la centrifugación. La solución bien límpida es inyectada en la vena de las lauchas (0.5 c.c.).

Los animales serán observados durante 3 días.

El test-dosis contiene en general 30 D M L.



*Dosaje de antitoxina histolyticum de valor desconocido*

(Ensayos previos).

Preparar las siguientes diluciones:

- a) — Dilución del suero en prueba.
- b) — Preparar la dilución de toxina Patrón.

La toxina es rigurosamente pesada y disuelta en solución salina, de manera que 1 L t esté contenido en 0.2 c.c.

Las mixturas de las diluciones del suero a dosar con el L t son hechas en volume total de 0.5 c.c. en tubos especiales, los cuales deberán contener cantidades variables del suero a dosar diluido más 0.2 c.c. de test-dosis y más la cantidad necesaria de solución salina para completar el volumen total de 0.5 c.c.

La cantidad de solución salina sobrante servirá para lavar el tubo, después de haber retirado la mixtura suero-toxina.

Las diluciones antes de inoculadas son dejadas a la temperatura ambiente durante 1 hora.

La dosis total de 0.5 c.c. es inoculada intravenosamente en cuatro lauchas blancas de 17 a 20 gramos mantenidas a temperatura constante. Aconsejamos el uso de pipetas certificadas para hacer las diluciones. Para las inoculaciones serán usadas jeringas metálicas de 1 c.c. divididas en centésimos, empleándose una jeringa para cada serie de diluciones.

Las lauchas inoculadas serán observadas durante 72 horas.

*Testigos.* — Cada dosage será siempre acompañado de su testigo. Sin este requisito los dosages no tendrán valor. Estos testigos serán inoculados con una mixtura de 1 unidad de suero antihistolyticum más test-dosis (L t) y cantidades mínimas de toxina superiores e inferiores a este test-dosis.

Los testigos sirven para indicar si la cantidad de toxina empleada como L t ha sido exacto o si hubo variación en más o en menos.

El porcentaje de animales sobrevivientes indica la protección aproximada conferida por el suero en prueba.

*Dosajes definitivos.*

A fin de obtener dosages más exactos serán hechos los dosages definitivos.

En estos casos, a técnica 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 dosis de diluciones mas aproximadas.



## BIBLIOGRAFIA

1. *Bengtson, I. A.* — "The official United States and international unit for standardising gas gangrene antitoxin (Histolyticus)". *Public Health Reports* 51 (37): 1263. 1936.
2. *Celareck, J.; Stelkiewicz, S.* — "Contribution a l'étude des hémotoxines de a gangre-gazeuse". *C. R. Soc. Biol.* 122 (16): 143. 1936.
3. *Glotova, H. V.* — "Etude comparé des sérums étalons anti-gangréneux internationaux et soviétiques". *Ann. Inst. Pasteur* 59 (5): 526. 1937.
4. *Hall, I. C. y Peterson, E.* — "A note on the mechanism of the peculiar lesions produced by *B. histolyticus*". *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 20: 502. 1932.
5. *Hoogerheide, J. C.* — "Variability in morphological and biochemical properties of *Clostridium histolyticum* (Weinberg e Seguin)". *Jor. Bact.* 34 (4): 387. 1937.
6. *Jensen, Cl.* — "Étalon international proposé pour le sérum anti-histolytique". *Bull. Trim. Org. Hyg. Soc. Nations* 5: 720. 1936.
7. *Mac Intosh, H. y Bulloch* — "The classification and study of war wounds". *Med. Res. Committee. Special Report Series* 12: 44. 1917.
8. *Med. Res. Committee* — "Reports of the Committee upon anaerobic infections of wounds and bacteriological and serological problems arising therefrom". *Special Report Series* 39: 26. 1919.
9. *Mita, T. M.* — "Untersuchungen ueber den *Bacillus histolyticus*". *Japan Jour. Exper. Med.* 12: 285. 1934.
10. *Robertson, M.* — "System of Bact. 3: 272".; His Majesty's Stationery Office London, 1929 .
11. *Smith, L.* — "Some serological aspects of the S-R change in *Clostridium histolyticum*". *Jour. Bact.* 34 (4): 409. 1937.
12. *Ssilanova, J. W.* — "Zur intrakutanen Werbstimung der-Gasodematoxine und Gasodemsera (Anti-perfringens anti-histolytikis und anti-vibrion-septique) und Kannichen". *Centralblath für Bakt.* 133: 149. 1935.
13. *Stewart, S. E.* — "Studies on the production of toxin by *Clostridium histolyticum*". *Public Health Reports* 51 (37): 1272. 1936.
14. *Walbum, L. E. y Reymann, G. C.* — "Memorandum concernign a proposed International Standard for gas gangrene antitoxin (histolyticus)". *Extrat from the Depart. of Biol. Standards H. I. M. I.* 35: 1. Copenhagen, 1935.
15. *Walbum, L. E. y Reymann, G. C.* — "Mémorandum sur un étalon international pour le sérum anti-histolytique". *Bull. Trim. Org. Hyg. Soc. Nations* 5: 752. 1936.
16. *Walbum, L. E. y Reymann, G. C.* — "The production of toxin by *Bacillus histolyticus* (*Clostridium histolyticum*)". *Jour. Pathol. Bact.* 46 (2): 315. 1938.
17. *Weinberg, M. y Guillaumie, M.* — "Titration des sérums anti-gangréneux (anti-perfringens C, anti-perfringens D, anti-histolytique et anti-vibrion septique)". *C. R. Soc. Biol.* 127 (12): 1085. 1938.
18. *Weinberg, M.; Nativelle, R. y Prevot, A.* — "Les microbes anaerobies", pg. 380. Masson & Cie., Paris, 1937
19. *Weinberg, M. y Prevot, A.* — "Nouvelles recherches sur les anatoxines gangreneuses. leur emploi dans la vaccination du cobaye et la préparation des sérums spécifiques". *C. R. Soc. Biol.* 92: 1484. 1925.
20. *Weinberg, M. y Seguin, P.* — "Démonstration des lésions provoquées chez la cobaye par le *B. histolyticus*. Toxine de ce microbe." *C. R. Soc. Biol.* 80: 157. 1917.