

## EMPREGO SIMULTÂNEO DE ANTÍGENOS BOTULÍNICOS TIPOS A E B, EM UM MESMO ANIMAL, PARA OBTENÇÃO DE ANTITOXINA BIVALENTE \*

Edison Paulo Tavares de OLIVEIRA \*\*  
Hideyo IIZUKA \*\*  
Hisako Gondo HIGASHI \*\*  
Maria Antonieta da SILVA \*\*  
Raymundo ROLIM ROSA \*\*

**RESUMO:** Descreve-se método para a obtenção da antitoxina botulínica bivalente tipo AB, através de hiperimunização simultânea de cavalos com antígenos adsorvidos pelo alumínio de potássio. Empregando-se novo esquema de imunização, e utilizando antígeno botulínico bivalente AB, obtiveram a respectiva antitoxina cujos títulos específicos médios variavam entre os níveis de 140 a 200 UI/ml para o tipo A e de 70 a 130 UI/ml para o tipo B, tendo como referência o soro padrão internacional. Após a purificação e concentração pelo método de Pope, os títulos finais atingiram valores da ordem de 750 a 1000 UI/ml.

Através deste novo método, foi verificado que é possível obter soro antibotulínico bivalente tipo AB, num mesmo animal, com resultados superiores aos processos anteriormente utilizados, com menores dispêndios de antígenos, de animais soroprodutores, de tempo e de trabalho.

**PALAVRAS-CHAVE:** Botulismo; hiperimunização simultânea, de eqüinos, com antígenos tipos A e B; toxina e toxóide botulínicos tipos A e B.

### INTRODUÇÃO

Em 1972, pela primeira vez no Brasil, foi preparado o soro antibotulínico tipo A, por um de nós, e, posteriormente, o tipo B, pela hiperimunização de eqüídeos, através do antígeno adsorvido pelo sulfato duplo de alumínio e potássio (11,18). Utilizando novo esquema de imunização, foi possível obter soros antitóxicos que apresentavam teor médio de antitoxina botulínica ao redor de 750 a 1000 UI/ml, quando purificados e concentrados, pelo método de Pope (20).

\* Trabalho apresentado no VIII Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Viña del Mar, Chile.

\*\* Serviço de Imunologia — Instituto Butantan.

Verificaram, também, que as antitoxinas dos tipos A e B não apresentam reação cruzada com a toxina heteróloga, comportando-se, portanto, como soros monoespecíficos (11).

Contudo, em virtude da especificidade da antitoxina (13, 14) e da eficácia de seu emprego depender de um diagnóstico prévio, estabelecido através de prova de toxinotipia e do resultado do exame bacteriológico, os quais sempre demandam precioso tempo, o tratamento deve ser imediatamente iniciado com a soroterapia bivalente AB, tendo em vista que os casos de botulismo humano ocorreram com maior frequência com esses dois tipos (1, 4, 5, 6, 7, 12, 16, 27), com alto índice de mortalidade (7, 15, 16, 19).

Portanto, propusemo-nos verificar a possibilidade de obtenção da antitoxina botulínica bivalente tipo AB, num mesmo animal soroprodutor.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido utilizando, em linhas gerais, a mesma metodologia desenvolvida e descrita pelos autores em trabalhos anteriores (11, 18). Todavia, julgamos interessante destacar as seguintes considerações.

1. *Cepas utilizadas* — as cepas de *Clostridium botulinum* tipo A, n.º 306-IB e tipo B, n.º 204-IB, ambas dotadas de alto poder toxigênico, foram escolhidas do estoque da germoteca do Instituto Butantan, para a obtenção das respectivas toxinas.

2. *Obtenção de toxinas* — as toxinas botulínicas dos tipos A e B, foram obtidas no meio de cultura proposta por Wadsworth, modificado (11, 18, 23, 28). A toxicidade das culturas filtradas foram tituladas segundo Nigg e col. (17), em camundongos de 18 a 22 g de peso, através da inoculação pela via intraperitoneal de alíquotas de 0,5 ml de séries de diluições de toxina em solução tampão de gelatina fosfatada (11).

3. *Antígenos* — para a preparação dos antígenos dos tipos A e B, foram utilizadas toxinas filtradas que apresentavam cerca de  $8 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  DMM por mililitro, em camundongos, para cada tipo (Tabela 1). A anatoxina botulínica, resultante da destoxificação da toxina pelo for-

TABELA 1

Toxicidade da cultura de *Clostridium botulinum* tipos A e B e condições de desenvolvimento da toxina \*

| Tipo | Cepa   | Incubação        |              | DMM             |
|------|--------|------------------|--------------|-----------------|
|      |        | Temperatura (°C) | Tempo (dias) |                 |
| A    | 306-IB | 37               | 6            | $1 \times 10^6$ |
| B    | 204-IB | 37               | 9            | $8 \times 10^5$ |

\* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal, em camundongos de 18 a 22 g.

maldeído, na taxa final de 0,5%, era precipitada pelo alumínio na concentração final de 1,25% do adsorvente. Após a prova de inocuidade (11, 28), era submetida à prova de imunogenicidade em cobaias de 250 a 300 g de peso, de acordo com os estudos de Rice e col. (25). Os resultados desta prova permitiam revelar os toxóides que apresentavam melhor poder imunogênico, os quais passavam a ser utilizados como antígeno para hiperimunização de cavalos. O antígeno bivalente era constituído de mistura homogênea em proporções equivalentes das frações A e B.

4. *Animais soroprodutores* — para a obtenção do soro antitoxínico bivalente, foram selecionados 9 cavalos sadios, jamais empregados na produção de anti-soros, de cerca de 8 a 10 anos de idade, em condições físicas consideradas satisfatórias pelo exame prévio, clínico veterinário, e separados em dois lotes:

Lote 1 — 4 animais, os quais eram inoculados com antígeno mono-específico. Assim, os cavalos n.º 232 e 233 foram destinados à produção do soro antitoxínico do tipo A, enquanto que os de n.º 243 e 244 o foram para o tipo B, observando-se, em ambos os casos, o esquema de imunização já citado (11, 18).

Lote 2 — 5 cavalos, os quais receberam os n.ºs 234, 240, 248, 249 e 250, todos inoculados com o antígeno bivalente AB. Neste lote, também os soros antitóxicos eram obtidos pela hiperimunização de eqüinos, em duas fases, segundo o esquema de hiperimunização estabelecido em trabalhos anteriores (11, 18), sendo que a primeira fase correspondia à imunização de base. Devemos destacar que, em virtude de fórmula antigênica estar encerrada no mesmo volume proposto no esquema citado, cada animal soroprodutor recebia exatamente 50% de cada fração antigênica, em relação aos animais do lote 1.

Na fase de hiperimunização, ao invés de administrar a quantidade total de cada dose imunizante num único ponto, o volume de antígeno misto AB correspondente era subdividido em cinco frações iguais, cada qual sendo inoculada subcutaneamente em cinco pontos diferentes, na região do dorso do animal.

Na última semana, cada cavalo pertencente a cada lote, era submetido à sangria exploradora. As reimunizações eram repetidas após cada período de repouso de 45 dias (2) que sucedia imediatamente terminada a sangria final.

O sangue recebido de cada animal era recolhido em solução anticoagulante de citrato de sódio, sendo o plasma separado e a seguir tratado com preservativo antes de ser levado à câmara fria, a 4°C, onde era mantido até o momento de purificação e concentração. As misturas de plasmas eram tratadas pelo método preconizado por Pope (20, 21), e modificado posteriormente (9).

5. *Soro e toxina padrões utilizados* — os soros antitoxínicos, padrões internacionais, eram provenientes de Statens Serum Institute de Copenhagen, Organização Mundial de Saúde, de onde vêm acondicionados em ampolas sob forma liofilizada e cujas atividades específicas estão contidas em 0,1360 mg para o tipo A, e 0,1740 mg para o tipo B (4).

As toxinas botulínicas padrões utilizadas no experimento foram preparadas no laboratório do Setor de Anaeróbios do Instituto Butantan e padronizadas "in vivo", ao nível de 0,1 L+ (Limite morte), para o tipo A e de 1 L+, para o tipo B, respectivamente, pelos soros padrões antibotulínicos monoespecíficos, e conservadas sob forma de solução glicerinada (4).

O método de titulação dos soros era realizado pelo teste de neutralização "in vivo", em consonância com o preconizado pela Organization Mondiale de la Santé.

6. *Animais utilizados* — camundongos brancos (*Mus musculus* Linnaeus, 1758), sem distinção de sexo, de 18 a 22 g, e cobaias de 250 a 300 g de peso, fornecidos pelo Biotério Geral do Instituto Butantan.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudando os surtos de botulismo no mundo inteiro, verifica-se que a grande maioria dos casos humanos é provocada pela ingestão de alimentos contaminados pelas exotoxinas neuroparalíticas dos tipos A e B, e, com menor freqüência, pelo tipo E (1, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 26, 27).

A análise dos dados publicados na literatura nos permite concluir que os grandes surtos desta toxii infecção apresentam características cíclicas e ocorrem, de maneira estreitamente correlacionada com as épocas de recessão econômica, sendo, portanto, a expansão do botulismo, atribuível ao aumento de preparações de conservas caseiras (12).

Neste aspecto, entre outros, Legroux e col. (15) constataram na França, durante a época de ocupação de 1940 a 1944, cerca de 500 focos de botulismo, envolvendo mais de 1000 intoxicados. Mais recentemente, Horwitz e col. (12) em 1974, nos E.U.A., registraram 20 surtos, num único ano, sendo o maior verificado desde 1935.

No Brasil, felizmente, o botulismo ainda é uma doença rara, uma vez que se acha registrado apenas um surto ocorrido em 1958 (19). Entretanto, neste acidente, 9 pessoas se intoxicaram das quais 7 tiveram êxito letal.

Do que foi exposto, dada a inexistência do soro antibotulínico bivalente tipo AB no país, e considerando que não existe outra terapêutica comprovadamente melhor para o botulismo, resolvemos estabelecer, pelo presente trabalho, uma metodologia para a obtenção de antitoxina botulínica bivalente, tipo AB.

O primeiro soro antibotulínico foi preparado por Van Ermengen pela imunização de equinos, utilizando toxina como antígeno. Em vista deste método apresentar certos inconvenientes (22), optamos pelo emprego de produto atóxico, ou seja, o toxóide botulínico absorvido pelo alumínio, que apresenta inúmeras vantagens; entre outras a faculdade que o toxóide oferece de poder ser manipulado com absoluta segurança, conservando todas as propriedades imunogênicas que favorecem a biosíntese de imunoglobulinas específicas.

Adaptando o esquema de imunização idealizado e posto em prática pelo laboratório do Setor de Anaeróbios do Instituto Butantan (11,18), podemos observar o resultado apresentado pelos cavalos pertencentes ao Lote 1, que serviram como controle, com toxóides botulínicos monovalentes dos tipos A e B (Tabela 2). Pela mesma, os resultados revelam níveis médios de 166 UI/ml de antitoxina botulínica tipo A, e de 116 a 125 UI/ml de tipo B.

A Tabela 3 mostra níveis de antitoxina botulínica bivalente tipo AB, observados em cavalos pertencentes ao Lote 2, que receberam antígeno misto tipo AB, onde se nota que os títulos médios da fração A variam de 140 a 200 UI/ml, enquanto que na fração B, oscilam de 70 a 130 UI/ml, no soro circulante. Pela análise destes dados, pode-se notar que existe tendência marcante da superior resposta imunogênica da fração A. Parece-nos que este fenômeno é atribuível ao efeito adjuvante do antígeno tipo B sobre o do tipo A, que se evidenciou na forma combinada, pois foi verificado que durante todo período de imunização, o tipo A respondeu em níveis entre 100 a 200 UI/ml, nas sangrias de prova, ao passo que o tipo B oscilou entre os valores de 50 até o máximo de 150 UI/ml (Tabela 3).

Apesar de Rice (24) ter observado que o poder imunogênico da fração B aumenta consideravelmente, quando se emprega o antígeno bivalente AB na imunização de camundongos, em nossos experimentos verificamos que ocorre fenômeno inverso. Esta divergência de resultados correlaciona-se, possivelmente, com as diferentes espécies animais utilizadas.

Por outro lado, confrontando os resultados obtidos nas Tabelas 2 e 3, pode-se destacar um fato muito interessante: embora os cavalos pertencentes ao Lote 2 tivessem recebido apenas 50% da quantidade de cada fração antigênica em relação aos do Lote 1, a síntese de antitoxina botulínica alcançou praticamente os mesmos níveis séricos deste. Assim, na fração A foram encontrados títulos médios oscilando entre os valores de 140 a 200 UI/ml, contra a média de 166 UI/ml da imunização monovalente. O tipo B também comportou-se de maneira análoga, alcançando média de 70 a 130 UI/ml, contra 116 a 125 UI/ml, da imunização mono-específica.

TABELA 2

Níveis de antitoxina botulínica tipos A e B, observados em quatro cavalos do Lote 1, no decurso de seis hiperimunizações

| Cavalos<br>n.º | Tipo | Títulos em UI/ml |                 |                 |                 |                 |                 | Média<br>aritmética<br>UI/ml |
|----------------|------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------------|
|                |      | Hiperimunização  |                 |                 |                 |                 |                 |                              |
|                |      | 1. <sup>a</sup>  | 2. <sup>a</sup> | 3. <sup>a</sup> | 4. <sup>a</sup> | 5. <sup>a</sup> | 6. <sup>a</sup> |                              |
| 232            | A    | 100              | 200             | 200             | 100             | 200             | 200             | 166                          |
| 233            | A    | 100              | 200             | 200             | 100             | 200             | 200             | 166                          |
| 243            | B    | 50               | 100             | 150             | 100             | 150             | 150             | 116                          |
| 244            | B    | 50               | 150             | 150             | 100             | 150             | 150             | 125                          |

TABELA 3

Níveis de antitoxina botulínica bivalente tipo AB, observados em cinco cavalos do Lote 2, no decurso de cinco hiperimunizações, através do antígeno misto

| Cavalos<br>n.º | Tipo | Títulos em UI/ml |                 |                 |                 |                 | Média<br>aritmética<br>UI/ml |
|----------------|------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------------|
|                |      | Hiperimunização  |                 |                 |                 |                 |                              |
|                |      | 1. <sup>a</sup>  | 2. <sup>a</sup> | 3. <sup>a</sup> | 4. <sup>a</sup> | 5. <sup>a</sup> |                              |
| 234            | A    | 200              | 200             | 200             | 200             | 200             | 200                          |
|                | B    | —                | 150             | 150             | 150             | 50              | 100                          |
| 240            | A    | 200              | 200             | 200             | 200             | 200             | 200                          |
|                | B    | —                | 150             | 150             | 100             | 50              | 90                           |
| 248            | A    | —                | 200             | 200             | 200             | 200             | 160                          |
|                | B    | 150              | 150             | 150             | 150             | 50              | 130                          |
| 249            | A    | 100              | 200             | 100             | 100             | 200             | 140                          |
|                | B    | 50               | 50              | 150             | 150             | 150             | 110                          |
| 250            | A    | 200              | 200             | 100             | 200             | 200             | 180                          |
|                | B    | —                | 150             | 150             | —               | 50              | 70                           |

A Tabela 4 mostra o resultado do doseamento do soro antitoxínico bivalente AB purificado, onde os níveis antitóxicos atingiram os valores de cerca de 1000 UI/ml para fração A e de 750 UI/ml, para o tipo B. Finalmente, este soro purificado e concentrado era diluído convenientemente para apresentar 500 UI/ml de antitoxina de cada tipo, para compor o soro antitoxínico bivalente AB, de acordo com as recomendações estabelecidas na XV Seção de "Expert Committee on Biological Standardization" da OMS.

TABELA 4

Dosagem do soro antitoxínico bivalente tipo AB purificado \*

| Soro antitoxínico |       | Tempo de observação em horas |     |     |     |
|-------------------|-------|------------------------------|-----|-----|-----|
| Fração            | UI/ml | 24                           | 48  | 72  | 96  |
| A                 | 500   | 0/4                          | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
|                   | 750   | 0/4                          | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
|                   | 1000  | 0/4                          | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
|                   | 1250  | 0/4                          | 0/4 | 2/4 | 4/4 |
| B                 | 500   | 0/4                          | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
|                   | 750   | 0/4                          | 0/4 | 0/4 | 0/4 |
|                   | 1000  | 0/4                          | 2/4 | 3/4 | 3/4 |
|                   | 1250  | 4/4                          | —   | —   | —   |

\* Dose individual de 0,5 ml da mistura toxina-antitoxina, pela via intraperitoneal, em camundongos de 18 a 22 g, sendo a toxina ao nível de 0,1 L + para o tipo A, e L + para o tipo B, frente ao respectivo soro padrão internacional.

Também digno de registro foram as constatações de que o emprego de antígeno bivalente AB para a hiperimunização de eqüídeos oferece a conveniência de serem evitadas diluições recíprocas de soros monovalentes dos referidos tipos, visando a obtenção de soro anti-AB e, fato igualmente significativo, do processo não causar nos animais submetidos à produção da antitoxina bivalente, reações que o contraindiquem para a sua adoção definitiva (3).

### CONCLUSÕES

1. Utilizando-se *Clostridium botulinum* tipo A, estirpe 306-IB e tipo B, 204-IB, foram obtidas as respectivas toxinas dosando cerca de  $8 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  DMM para camundongos.

2. O antígeno bivalente AB, empregado na hiperimunização de cavalos, era constituído de mistura, em proporções equivalentes, de anatoxinas dos tipos A e B, precipitadas pelo alúmen.

3. As sangrias de prova apresentaram títulos médios de antitoxina botulínica bivalente variando entre os valores de 140 a 200 UI/ml para o tipo A e de 70 a 130 UI/ml, para o tipo B.

4. A mistura de plasma resultante de diversas imunizações, permitiu obter soro purificado e concentrado cujo título atingiu níveis da ordem de 750 a 1000 UI/ml de cada fração.

5. A hiperimunização simultânea de eqüinos soroprodutores, com o emprego de antígeno bivalente, apresenta a vantagem de evitar a diluição recíproca que resulta da mistura de soros monovalentes, bem como a de não causar, nos animais, reações indesejáveis em seu estado físico.

The usage of *Clostridium botulinum* Type AB antigen in the preparation of bivalente antitoxin.

**ABSTRACT:** The present paper describes the method employed in the preparation of bivalent *Clostridium botulinum* Type AB antitoxin by simultaneous hyperimmunization of horses with mixed alum potassium adsorbed antigen. By the use of a new immunization schema, and using a bivalent AB botulinic antigen, the AB antitoxin was obtained, whose mean specific titres varied between the 140-200 IU/ml serum levels for Type A, and 70-130 IU/ml, for Type B, respectively, when dosed against the international standard antitoxin. After purification and concentration by the method of Pope, their final titres reached values of 750 to 1000 IU/ml. Through this new method, it was verified that it is possible to obtain bivalent antibotulinic antitoxin Type AB in the same animal with results superior to those obtained by the processes formerly employed.

**KEYWORDS:** Botulism; bivalent hyperimmunization of horses; *Clostridium botulinum* Types A and B; food poisoning; *Clostridium botulinum* Types A and B toxin and toxoid.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARKER JR., W.H.; WEISSMANN, J.B.; DOWELL JR., V.R.; GUTMANN, L. & KAUTTER, D.A. Type B botulism outbreak caused by a commercial food product. *J. Amer. med. Ass.*, 237(5):456-9, 1977.

2. BARR, M. & GLENNY, A.T. Some practical applications of immunological principles. *J. Hyg. (Lond.)*, 44:135-42, 1945.
3. BITTNER, J.; OLARU, A.; POP, A.; POTORAC, E.; VOINESCO, V.; FICIU, S. & OPRISAN, R. Hyperimmunisation tétravalent des chevaux producteurs de sérum antigangréneux.
  1. Hyperimmunisation successive. *Arch. roum. Path. exp. Microbiol.*, 23:253-60, 1964.
4. BOWMER, E.J. Preparation and assay of the International Standards for *Clostridium botulinum* types A, B, C, D and E antitoxins. *Bull. Org. mond. Santé*, 29:701-9, 1963.
5. DOLMAN, C.E. Human botulism in Canada. *Canad. med. Ass. J.*, 110(2): 191-7, 1974.
6. DOLMAN, C.E.; TOMECH, M.; CAMPBELL, C.C.R. & LAING, W.B. Fish eggs as a cause of human botulism: two outbreaks in British Columbia due to types A and B botulism toxins. *J. infect. Dis.*, 106:5, 1960.
7. DUMAS, J. *Bacteriologie médicale*. Paris, Flammarion, 1951. p. 692-706.
8. FUKUDA, T.; KITAO, T.; TANIKAWA, H. & SAKAGUCHI, G. An outbreak of type B botulism occurring in Miyazaki Prefecture. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 23:243-8, 1970.
9. FURLANETTO, R.S. Purificação e concentração de soro antiloxoscélico. In: *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico*. São Paulo, 1961, p. 64-5 (Tese).
10. GONZÁLEZ, C. & GUTIÉRREZ, C. Intoxication botulinique humaine par *Clostridium botulinum* B. *Ann. Inst. Pasteur*, 123:799-803, 1972.
11. HIGASHI, H.G.; IIZUKA, H.; OLIVEIRA, E.P.T. & SILVA, M.A. Preparação do soro antibotulínico tipo B, pela hiperimunização de cavalos, no Instituto Butantan. *Mem. Inst. Butantan*, 42/43:77-85, 1978/79.
12. HORWITZ, M.A.; MARR, J.S.; MERSON, M.H.; DOWELL, V.R. & ELLIS, J.M. A continuing common source outbreak of botulism in a family. *Lancet*, II (7936):861-3, 1975.
13. JOHNSON, H.M.; SMITH, B.; HALL, H.E. & LEWIS, K.H. Serological specificity of types A and B botulinal toxins and antitoxins. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 126:856-61, 1967.
14. LAMANNA, C. The most poisonous poison. *Science*, 130(3378):763-72, 1959.
15. LEGROUX, R.; LEVADITI, J.C. & JÉRAMEC, C. Le botulisme en France pendant l'occupation (1940-1944). *Presse méd. (Paris)*, 10:139-40, 1947.
16. MEYER, K.F. The status of botulism as a world health problem. *Bull. Org. mond. Santé*, 15:281-98, 1956.
17. NIGG, G.; HOTTLE, G.A.; COREILL, L.L.; ROSENWALD, A.S. & BEVERIDGE, G.W. Studies on botulism toxoids types A and B. I. Production of alum precipitated toxoids. *J. Immunol. (Baltimore)*, 55:245-54, 1947.
18. OLIVEIRA, E.P.T. Estudos sobre a preparação de soro antibotulínico tipo A. *Mem. Inst. Butantan*, 36:1-40, 1972.
19. PEREIRA FILHO, M.J. Diagnóstico biológico do surto de botulismo humano do Pronto Socorro de Porto Alegre. *Med. Cirurg. (Porto Alegre)*, 19(2): 52-111, 1958.
20. POPE, C.G. Disaggregation of protein by enzymes. *Brit. J. exp. Path.*, 19: 245-51, 1938.
21. POPE, C.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. II. Heat denaturation after partial enzyme action. *Brit. J. exp. Path.*, 20:201-12, 1939.
22. PRÉVOT, A.R. *Biologies des maladies dues aux anaérobies*. Paris, Flammarion, 1955. p.159-221.



23. REAMES, H.R.; KADULL, P.J.; HAUSEWRIGTH, R.D. & WILSON, J.B. Studies on botulinus toxoids types A and B. III. Immunization of man. *J. Immunol.* (Baltimore), 55:309-24, 1957.
24. RICE, C.E. A preliminary study of the antigenic activity of mixtures of *Clostridium botulinum* toxoid types A and B. *Canad. J. Res. E.*, 25:181-7, 1947.
25. RICE, C.E.; PALLISTER, E.F.; SMITH, L.C. & REED, G.B. *Clostridium botulinum* type A toxoids. *Canad. J. Res., E.*, 25:167-74, 1947.
26. SÉBALD, M.; JOUGLARD, J. & GILLES, G. Botulisme humain de type B après ingestion de fromage. *Ann. Microbiol.* (Inst. Pasteur), 125:349-57, 1974.
27. TRIVALENT botulinus antitoxins. Botulism — United States 1899-1967. Surveillance summary. *Morb. Mort. Wkly. Rep.*, 17:444-6, 1968.
28. WADSWORTH, A.B. *Standard methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health*. 3rd. ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1947.

