

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO DE LA TOS CONVULSIVA

GERMÁN BATTISTINI MOORE

Departamento de Bacteriología e Inmunología.

Instituto Nacional de Higiene y Salud Pública.

INTRODUCCIÓN

Desde los estudios iniciales de aislamiento y constatación bacteriológica del *Haemophilus pertussis* en enfermos con tos convulsiva, realizados por BORDET y GENGOU (1906), hasta hoy, las técnicas de aislamiento de este germen con fines de diagnóstico han sido sucesivamente modificadas de acuerdo a una mayor facilidad y rendimiento en los resultados finales.

El diagnóstico bacteriológico se hizo de modo práctico desde que CHIVIETZ y MEYER (1916) introdujeron la técnica original de la exposición de una placa Petri (Cough-plate) conteniendo medio de BORDET y GENGOU, a la tos del enfermo, técnica que ha sido empleada corrientemente en los laboratorios con fines de diagnóstico bacteriológico de la tos convulsiva. En nuestro medio la hemos empleado en cierto número de enfermos (60), con resultados satisfactorios en el aspecto bacteriológico, pero el procedimiento mismo presentaba ciertas dificultades tales como, la ausencia de un espasmo natural, el que aún con maniobras artificiales no llegaba a efectuarse o en su lugar se obtenía grandes emisiones de saliva y contenido gástrico que hacían perder corrientemente el material empleado.

Otras veces tratándose especialmente de niños pequeños, se apreciaba lo que también afirman A. MORRIS, BRADFORD y PACKER (1942) "frecuentemente es imposible estimular un paroxismo cuando se trata de emplear la "placa de tos" y, particularmente en niños pequeños (menores de 3 años) en quienes la tos es a menudo corta y débil, y no explosiva". Nosotros hemos encontrado que en determinados niños, de corta edad o de constitución débil y especialmente en el período catarral inicial, la ino-

culación de la placa era difícil de obtener a pesar de los métodos artificiales de estimular la tos; y si alguna placa era inoculada, el número de colonias desarrolladas a las 48 horas era sumamente escasa (una o dos).

SUGARE y MC LEOD (1929) obtienen éxito, sembrando flemas eliminadas por el enfermo, sobre placas conteniendo el medio apropiado. KRISTENSEN (1933) ensayó torundas de algodón estériles aplicadas sobre la pared faríngea posterior, pero sin resultados positivos; en cambio con la torunda laríngea sí fué fácil obtener colonias tan a menudo como con las "placas de tos". E. STRAKER (1937) ensaya métodos semejantes a los de KRISTENSEN con excelentes resultados, realiza un estudio comparativo con el método de la "placa de tos" y señala un mayor porcentaje de positividad con el empleo de la torunda. Posteriormente BRADFORD y SLAVIN (1940), A. MORRIS, BRADFORD y PACKER (1942) y T. M. SAITO, MILLER y LEACH (1942) emplean y recomiendan por sus ventajas, el método de cultivo del exudado naso-faríngeo, ejecutan estudios comparativos y estadísticos en relación con el método de la "placa de tos", concluyendo que esta técnica a la vez que sencilla es posible de ser efectuada en cualquier momento, sin causar mayores molestias al enfermo, además del fácil transporte de la muestra.

De otro lado, ALEXANDER FLEMING, (1929) y (1942), estudia detalladamente substancias químicas bacteriostáticas con fines de diagnóstico bacteriológico, entre ellas, señala el empleo del filtrado crudo de un cultivo de una variedad de *Penicillium* posteriormente identificado como *Penicillium notatum*, hallado de una manera casual como contaminante de un cultivo de estafilococo. Aisló esta interesante especie y efectuó, estudios de la substancia elaborada por él en un medio líquido nutritivo. Realizó una serie de pruebas "in vitro", oponiendo a diluciones de este filtrado crudo, distintas especies de gérmenes, de los cuales unos eran totalmente inhibidos aún a altas diluciones, mientras que otros no eran afectados, entre éstos señala el *Haemophilus influenza*, el cual frente a concentraciones de filtrado crudo que eran suficientes para inhibir el desarrollo, de *Stafilococos*, *Streptococos*, *Pneumococos*, *Corynebacterium*, etc. no sufría variación en su desarrollo, por lo cual establece un método para efectuar el aislamiento de este *Haemofilo*, con excelentes resultados.

A principios de agosto de 1942, con deseos a realizar las mismas experiencias de FLEMING, pero frente al *H. pertussis*, tuvimos la satisfacción de encontrar entre otros una variedad de *Penicillium* (cuya identificación aún no la hemos efectuado por carecer de datos adecuados), que elaboraba en el medio de cultivo en el cual se había sembrado, una substancia que también ejercía efecto inhibitor para el desarrollo "in vitro" de *Stafilococos*, *Streptococos*, *Pneumococos* y algunos *Corynebacterium* que po-

seemos, sin ejercer ninguna acción a determinadas concentraciones sobre el desarrollo del *H. pertussis*.

Teniendo pues como antecedentes las dificultades habidas en el método de la "placa de tos", y la contaminación muchas veces excesiva con el empleo de la torunda de algodón, resolvimos ensayar la aplicación del poder bacteriostático de la sustancia elaborada por nuestro *Penicillium* como ayuda para una mejor selección de las colonias de *H. pertussis*, en las placas Petri sembradas con el exudado faringeo contenido en torundas de algodón de acuerdo a la técnica señalada por los autores antes citados.

Los resultados obtenidos han sido completamente satisfactorios, por lo cual nos permitimos sugerir el empleo de este método para el diagnóstico bacteriológico de la tos convulsiva.

MATERIALES Y MÉTODOS PARA REALIZAR EL DIAGNÓSTICO

El medio de cultivo. Desde los trabajos iniciales de BORDET y GENGOU hasta hoy, el medio de cultivo para el *H. pertussis* ha sufrido algunas variaciones, pero conservando en el fondo los mismos caracteres que los indicados por estos autores.

Como es sabido el medio de BORDET-GENGOU es rico en extractos vegetales (patatas) y en sangre. Muchas modificaciones se han hecho en relación con la cantidad necesaria de este último componente. BORDET y GENGOU emplearon 50 % de sangre de caballo; entre otros LESLIE y GARDNER (1931) señalan 33 % de sangre de caballo. Reduciéndose posteriormente al 25 %, pero se observó el menor desarrollo del germen (en relación con la menor cantidad de sangre empleada). Aún KENDRICK y ELDERING (1934) usan menos del 15 % de sangre de carnero, y SAUER y HAMBRECHT (1930) emplearon el 17 % y más tarde el mismo SAUER (1933) aumentó la cantidad al 25 %. STRACKER y WESTWATER (1937) omiten el uso del ácido láctico (indicado por DANISH) y aumentan la proporción de sangre al 50 %. Este último medio es el que hemos empleado con excelentes resultados.

Medio de Bordet-Gengou (modificado). Se efectúa del modo siguiente :

1. Escoger papas sanas y grandes, lavar y pelarlas. Cortarlas en trozos delgados.

2. Agregar 250 grs. de estos trozos de papa a 500 c.c. de agua de caño y después 9 grs. de cloruro de sodio. Hervir hasta que los trozos

se deshagan. Reemplazar el agua perdida durante la ebullición y filtrar a través de un lienzo.

3. Ajustar la reacción del extracto a Ph. 7.

4. Agregar 500 c.c. de este extracto y 20 c.c. de glicerina a 60 grs. de agar disuelto en 1500 c.c. de agua de caño. Distribuir en frascos. Esterilizar por autoclave y conservar hasta que se necesite.

5. Al momento de usar, enfriar el agar licuado a 48°C. más o menos y agregar 1/3 del volumen de sangre (33 %) desfibrinada u oxalata de caballo. Mezclar bien y después de solidificado poner a control de esterilidad en estufa de 37°C. por 24 horas.

6. Es importante tener el medio frasco, y su empleo debe de ser durante un período no mayor de diez días. Debe de conservarse en la nevera. Debe presentar un color rojo cereza brillante. El medio rojo oscuro o marrón, debe descartarse.

Este medio es repartido en placas Petri y en tubos de prueba. En las primeras se efectuará el aislamiento y los segundos sirven para el aislamiento y conservación de las cepas.

Material para la recolección de la muestra. Esencialmente está constituido por una torunda de algodón dispuesta en un alambre, de preferencia de cobre o también de fierro galvanizado delgado y flexible (se prefiere el de cobre pues como se usa repetidas veces no sufre efectos de oxidación marcados como sucede con el de fierro galvanizado). La torunda ha de ser de poco volumen y debe cubrir completamente el extremo del alambre a fin de evitar lesiones erosivas en las mucosas del paciente durante la toma de la muestra. Este dispositivo es colocado en un tubo de prueba delgado y de longitud conveniente en relación con la del alambre, siendo esterilizado en estufa.

La penicilina. Esta sustancia es preparada por nosotros de acuerdo a técnicas que serán descritas en uno de los números de la revista de "Medicina Experimental".

La penicilina es titulada previamente a fin de usar la cantidad exacta que tenga poder suficiente para inhibir el desarrollo de la mayor parte de los gérmenes grampositivos presentes en la cavidad bucal, sin afectar a esa concentración el desarrollo de los H. pertusis. Es decir que teniendo un producto cuya acción, por titulación por el método de las diluciones, haya sido bacteriostático a gérmenes Gram positivos hasta 1/1000, se usará esta cantidad de penicilina en las pruebas correspon-

dientes, pues a mayores concentraciones parece que afectara también a los *Haemophilus pertussis*.

Para esta prueba usábamos al principio filtrado crudo de cultivo de *Penicillium*, el cual se titulaba por el método de las diluciones seriadas. Posteriormente purificamos el producto, obteniendo penicilina en solución, la que titulada por el mismo método de las diluciones era aplicada en idénticas condiciones en esta técnica de diagnóstico.

TÉCNICAS

1. *Técnica de la "placa de tos"*. Esta técnica es muy simple, pero es necesario que el enfermo tosa, pues el espasmo natural es esencial ya que el esfuerzo voluntario es generalmente inefectivo. Se recomienda que las placas deban ser expuestas durante 10 a 15 segundos y sostenidas más o menos a 6 pulgadas de distancia de la boca, de tal modo que el muco no alcance a la placa. En niños de mayor edad y especialmente si hay mucho catarro, debe ser efectuada esta operación a una mayor distancia, ya que se obtendría una mayor inoculación, especialmente por organismos secundarios. Así mismo en niños pequeños (menores de seis meses), la técnica descrita puede dar lugar a placas estériles.

Cuando no se presenta de manera espontánea accesos de tos, se ha sugerido diversas maniobras para provocarlos, tales como el toque a la pared faríngea posterior o de la laringe (SAUER y HAMBRECHT, 1930), o presión sobre la tráquea (SILVERTHORNE y FRASER, 1935), STRAKER y WESTWATER (1937) sugieren el uso de bebidas frías y estímulos directos de la epiglotis.

2. *Técnica de la "torunda de algodón"*. El niño es sostenido por la madre o una enfermera a fin de evitar los movimientos de los brazos y especialmente la acción defensiva de las manos. La cabeza debe ser cogida en el momento en que se dispone un bajalenguas delgado para ser introducida la torunda de algodón evitando choque con la lengua o paredes bucales, debe llegar hasta la pared faríngea posterior y allí efectuar un movimiento de rotación de la torunda para que se cubra enteramente con el contenido de esas zonas, retirarla cuidando de no tocar las regiones señaladas y guardarla en su tubo original. Esta maniobra debe ser realizada rápidamente para no ocasionar mayores molestias al enfermo. Algunas veces el niño llora, entonces la cavidad bucal es fácilmente expuesta, circunstancia que se aprovecha para introducir la torunda, muchas veces sin necesidad del bajalenguas.

Con esta técnica se evita la espera de espasmo natural y puede ser efectuada en cualquier momento.

Como se comprende cuando se trata de niños mayores (concientes) la maniobra se simplifica a voluntad del enfermo.

SIEMBRA DEL MATERIAL

El transporte de las muestras es pues sumamente sencillo, a diferencia con el de la "placa de tos", en la cual el transporte de las placas es aparatoso y limitado.

Técnica. Para la inoculación del medio contenido en las placas Petri, se agrega 1-2 c.c. de solución de cloruro de sodio al 8.5 grs. por mil, al tubo que contiene la torunda, se lava ésta y mediante una pipeta capilar se toma una cantidad de esta emulsión o mezcla y se vierte una gota sobre la superficie del medio de cultivo y se la extiende con ayuda de la misma pipeta capilar convertida en espátula. A continuación se agrega otra gota de una solución de penicilina (a dilución conveniente, tal como se indicó al tratar de esta substancia) y se la extiende igualmente. Las placas son puestas a incubar a 37°C. y observadas a partir de las 48 horas.

Otra técnica que también da los mismos resultados, pero con mayor consumo de solución de penicilina es la que sigue; en lugar de agregar al tubo conteniendo la torunda, la solución de cloruro de sodio, se agrega solución de penicilina. Se toma una gota de esta mezcla y se la extiende en la misma forma indicada anteriormente, sobre la superficie del medio.

LECTURA DE LA PLACA

A las 24 horas el número de colonias es relativamente pequeño (especialmente gérmenes sobre los cuales la penicilina no ejerce ninguna acción, algunas variedades de hongos, bacilos grampositivos, bacilos gramnegativos y ciertos cocos grampositivos de tipo tetrágeno) y de tamaño por encima del milímetro. A partir de las 48 horas, se comienza a observar entre los espacios aparentemente libres de las colonias citadas, otras muy pequeñas, cuya visión se hace mejor con la ayuda de una lupa o bajo un microscopio y a la luz del día, son salientes, circulares, casi hemisféricas, brillantes, de coloración ligeramente gris, con cierta uniformidad en cuanto al tamaño.

Ya a las 72 horas el volumen ha aumentado, llegando a tener algunas hasta un milímetro de diámetro, su aspecto es característico: brillan-

te, homogéneo; circular; bordes regulares, convexa, nacarada con un reflejo metálico por lo cual se las ha comparado con perlas partidas por la mitad o con gotas de mercurio.

La morfología de los gérmenes contenidos en estas colonias es típica : bacilos cortos, casi cocobacilos, pequeños, aislados, dispuestos sin agrupación característica y de un tamaño muy homogéneo. Pobremente teñidos por los colorantes usuales, gramnegativos, más intensamente coloreados en los extremos y bordes. La cápsula es manifiesta mediante la técnica de LAWSON y CHARLOTTESVILLE (1939).

Aislamiento en tubo. Se procede a aislarlos, sembrándolos en tubo conteniendo el mismo medio empleado para su aislamiento, de la muestra. A las 24 horas se aprecia un tenue desarrollo a todo lo largo de la estria. Desarrollo que se incrementa a las 48 horas, dando una estria de crecimiento algo gruesa, brillante, de color gris. El germen conserva las características antes señaladas en cuanto a morfología y tinción.

IDENTIFICACIÓN

Aparte de los caracteres morfológicos de la colonia, desarrollo, aspecto del germen desde el punto de vista tintorial, se procede a realizar las siguientes observaciones : Caldo simple : desarrollo negativo. Agar simple : desarrollo negativo. M. DE BORDET-GENGOU (con sangre al 10 %) : desarrollo pobre, con hemolisis.

°Indol : no hay producción. °Azúcares : acción negativa. °Nitratos : no hay reducción a nitritos. (°) STILLMANN y BOURN (1920).

Reacciones serológicas. El germen recientemente aislado y cultivado en el medio usual descrito, se presenta en fase de virulencia con un tipo antigénico único y homogéneo a otros gérmenes aislados y conservados en las mismas condiciones.

Tal como lo han señalado BORDET y SLEESWIK (1910), todas ellas aglutinan con un suero preparado contra una sola. Mas tarde LESLIE y GARDNER (1931) determinan cuatro grupos antigénicos distintos, de los cuales el grupo I corresponde a una fase de neta virulencia y capacidad inmunizante (forma lisa); el grupo IV estaría determinado por una forma áspera, de fácil cultivo en medios simples, sin ninguna virulencia; y, entre ambas los grupos II y III, que no son sino variantes intermediarias entre las faces lisa y áspera. Esta variación se realiza con el pasaje del germen a través de los medios de cultivo, especialmente aquellos que no le son favorables. SHIBLEY y HOELSCHER (1934) y TOOMEY y colabora-

dores (1935) han coincidido en líneas generales con los estudios de LESLIE y GARDNER.

Sueros preparados con cepas recientemente aisladas y caracteres netos de virulencia, aglutinan específicamente a altas concentraciones los gérmenes que han sido recientemente aislados y que reúnen los caracteres de colonia y morfología descritos.

Cuando se ha adquirido suficiente práctica en el conocimiento y diferenciación del tipo de colonia, y agregado los caracteres típicos morfológicos del germen constituyente de ellas, el diagnóstico está casi completamente resuelto, claro está que si además se verifican los cultivos y reacciones serológicas correspondientes, la identificación es más precisa.

RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO EN ENFERMOS CON TOS CONVULSIVA (*Clinicamente*)

Comparación entre el método de la "placa de tos" y el descrito en este trabajo.

Esta prueba ha sido realizada con enfermos que se asisten en el consultorio externo de enfermedades infecto-contagiosas del Hospital del Niño. Han sido tomados indistintamente niños de toda edad (menos de un año hasta los siete y más años). El dato del tiempo de evolución de la enfermedad ha sido suministrado generalmente por la madre del enfermo por lo cual como se comprende, éstos no pueden ser exactos, es por esto que los cuadros que a continuación se exponen (del 1 al 4) presentarían un gran margen de error; sin embargo como la finalidad de este trabajo no es la apreciación estadística del porcentaje de niños que presentan eliminación de bacilos de BORDET-GENGOU en las distintas etapas de la enfermedad, sino la descripción de una técnica para el diagnóstico bacteriológico, y su comparación con la "placa de tos", se hizo necesario la agrupación sistemática de los resultados a fin de observar la bondad de una y otra.

Sin embargo, de una manera no precisa se puede observar que el mayor porcentaje de positividad se presentó durante las tres primeras semanas para decrecer a la cuarta y ser negativa a partir de la quinta de evolución de la enfermedad, datos que guardan relación de semejanza con los manifestados por investigadores de otros países.

Este trabajo es susceptible de completarse y ampliarse en el sentido de la determinación en nuestro medio de porcentajes de positividad en relación con la edad, el sexo, las razas y el tiempo de evolución de la enfermedad, lo que será verificado posteriormente.

MÉTODO DE LA "PLACA DE TOS"

CUADRO N° 1

Aislamiento del H. pertussis de 60 casos

Tiempo de enfermedad	Positivo	Negativo	Total	%
1ª semana . . .	9	4	13	69.2
2ª " . . .	9	5	14	64.2
3ª " . . .	9	4	13	69.2
4ª " . . .	1	5	6	16.6
5ª " . . .	—	7	7	—
6ª " . . .	—	2	2	—
7ª " . . .	—	1	1	—
8ª " . . .	—	2	2	—
9ª " . . .	—	1	1	—
3 meses	—	2	2	—

CUADRO N° 2

Porcentaje correspondiente hasta la semana de positividad

Tiempo de enfermedad	Positivo	Negativo	Total	%
1 a 4 semanas .	28	18	46	60.8

MÉTODO DESCRITO EN ESTE TRABAJO

CUADRO N° 3

Aislamiento de H. pertussis de 65 casos

Tiempo de enfermedad	Positivo	Negativo	Total	%
1ª semana	4	1	5	80.0
2ª "	6	2	8	75.0
3ª "	5	3	8	62.5
4ª "	2	4	6	33.3
5ª "	—	6	6	—
6ª "	—	1	1	—
7ª "	—	5	5	—
8ª "	—	3	3	—
Más de 8 sem.	—	23	23	—

CUADRO N° 4

Porcentaje correspondiente hasta la semana de positividad

Tiempo de enfermedad	Positivo	Negativo	Total	%
1 a 4 semanas	17	10	27	62.9

SUMARIO

El diagnóstico bacteriológico de la tos convulsiva es una necesidad que debe ser efectuada en todo enfermo que presente manifestaciones clínicas incipientes de esta enfermedad. Las técnicas para su realización han sufrido sucesivas modificaciones a fin de obtener ventajas tanto en su simplicidad como en su rendimiento.

La técnica de CHIVIETZ y MEYER (1916) ha sido la más usualmente empleada, pero dificultades especialmente de parte del enfermo (espasmo natural, edad, estado físico, etc.), diversos investigadores (SUGARE, Mc. LEOD, KRISTENSEN, STRAKER, etc.) ensayaron otros métodos realizando siembras directas de secreción laríngea tomada con distintos dispositivos y maniobras, obteniendo más comodidad y mejor rendimiento que el uso de la "placa de tos" (CHIVIETZ y MEYER); posteriormente el método de la torunda de algodón se perfecciona más (BRADFORD, SLAVIN; MORRIS, BRADFORD y PACKER; SAITO, MILLER y LEACH) quedando establecido que la mayor efectividad para el diagnóstico bacteriológico de la tos convulsiva es la siembra del exudado naso-faríngeo tomado con una torunda de algodón.

Nosotros hemos ensayado estos distintos métodos encontrando las mismas dificultades, de ahí que guiados por los trabajos de A. FLEMING en el uso de una substancia bacteriostática para aislar mejor el germen, y teniendo la oportunidad de contar precisamente con la adecuada, la penicilina, hemos podido realizar ensayos a este fin, habiendo logrado resultados halagadores, como se puede apreciar en lo expuesto.

CONCLUSIONES

1. Para la realización de este trabajo se obtuvo por primera vez penicilina en el Perú. (Agosto, 1942).
2. El empleo de penicilina como agente bacteriostático en el método de la "torunda faríngea", facilita el diagnóstico bacteriológico de la tos convulsiva.
3. Sin pretender exactitud, el mayor porcentaje de eliminación de bacilo pertussis en enfermos con tos convulsiva de nuestro medio, es durante las tres a cuatro primeras semanas de la enfermedad.

CONCLUSIONS

1. To carry this work out penicillin was obtained for the first time in Perú. (August, 1942).

2. The use of penicillin as a bacteriostatic agent in the "torunda faringea" method, facilitates the bacteriological diagnostic of the whooping cough.

3. Without pretending accuracy, the greatest percentage of elimination of bacillus pertussis, in whooping cough patients in our environment, was found to be during the first three to four weeks of the disease.

BIBLIOGRAFÍA

- J. BORDET & O. GENGOU : *Ann. Inst. Pasteur*, t. 20, p. 731, 1906. *Ibid.* t. 21, p. 720, 1907. *Ibid.*, t. 23, p. 415, 1909.
- J. BORDET & SLEESWYK : *Ann. Inst. Pasteur*, t. 24, p. 476, 1910.
- W. L. BRADFORD & B. SLAVIN : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, t. 43, p. 590, 1940.
- Y. CHIVIETZ & A. H. MEYER : *Ann. Inst. Pasteur*, t. 30, p. 503, 1916.
- A. FLEMING : *Brit. J. Exp. Pat.*, t. 10, p. 226, 1929.
- A. FLEMING : *Brit. Med. Jour.*, t. 4243, p. 547, 1942.
- P. KRENDRICK & G. ELDERING : *J. Bact.*, t. 27, p. 97, 1934.
- G. M. LAWSON & P. H. CHARLOTTESVILLE : *J. Lab. Clin. Med.*, t. 25, p. 435, 1939.
- B. KRISTENSEN : *J. Am. Med. Ass.*, t. 101, p. 204, 1933.
- P. H. LESLIE & A. D. GARDNER : *J. Hyg. Camb.*, t. 31, p. 423, 1931.
- A. MORRIS BROOKS, W. L. BRADFORD & G. PACKER BERRY : *J. Am. Med. Ass.*, t. 120, p. 883, 1942.
- T. M. SAITO, J. J. MILLER & Ch. W. LEACH : *J. Pub. Health*, t. 32, p. 471, 1942.
- L. W. SAUER & I. HAMBRECHT : *J. Am. Med. Ass.*, t. 95, p. 263, 1930.
- L. W. SAUER : *J. Pediat.*, t. 2, p. 740, 1933.
- G. E. SHIBLEY & H. HOELSCHER : *J. Exp. Med.*, t. 60, p. 403, 1934.
- N. SILVERTHORNE & D. T. FRASER : *Canada Med. Ass.*, t. 32, p. 367, 1935.
- E. G. STILLMANN & J. M. BOURN : *J. Exp. Med.*, t. 32, p. 665, 1920.
- E. A. STRAKER & J. S. WETSWATER : *Lancet*, t. 173, p. 565, 1929.
- H. SUGARE & J. W. MC. LEOD : *Lancet*, t. 2, p. 165, 1929.
- TOOMEY y colaboradores : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, t. 31, p. 34 y 403, 1933.