

Ежи Межеевски

До сих пор единственным надежным методом обнаруживания ботулинического токсина является биологическая проба. Отрицательной стороной этого метода - это очень продолжительное время необходимое для получения результатов /до 10 дней/.

После войны были предприняты попытки обнаруживания и идентификации ботулинического токсина при использовании определенных модификаций биологических и иммунологических реакций, а также измерение некоторых физико-химических свойств токсина. Целью всех этих проб была разработка методов обнаруживания ботулинического токсина, возможно быстрых, а при этом чувствительных, более специфичных чем применяемые до сих пор.

И так Минервини и сотр. /25,26/ разработали метод обнаруживания ботулинического токсина основанный на явлении торможения фагоцитоза. Эти результаты до сих пор подтверждены немногими авторами /9,16/. Констатировано, что торможение фагоцитоза токсином подвергается усилению или замедлению под влиянием бактериальных фильтратов /36/, а самое обнаружение токсина является возможным только при больших его концентрациях, часто результаты являются неповторимыми, а сама проба является не стабильной, чувствительной на внешние факторы /8,21/. Аналогические результаты были получены при обнаружении кристаллического токсина /10/.

Русај /35/ применил собственную модификацию реакции посредственной геммагглютинации для обнаруживания ботулинического токсина. Идио положительной оценки со стороны большинства авторов /12,14,44,

45/ этой реакции не принято для повсеместного применения ее вероятно в виду трудностей дифференциации других антигенов из группы Clostridium /4,5/.

Русая /33/ применил также латексную реакцию для обнаружения токсина. Основана она на покрытии частиц латекса антиботулиновыми сыворотками аналогически как эритроцитов при реакции сравнительной гемагглютинации /р.с.г/. До сих пор в литературе не констатировано мнения других авторов относительно пригодности этой реакции для обнаружения ботулинического токсина.

Boroff и сотр. /1,2/ подали, что как-будто биологическая активность и флуоресценция ботулинического токсина были зависимы от существования целой частицы токсина, а в связи с этим возможно обнаружение токсина путем измерения его автофлуоресценции. Результаты этих исследований до сих пор не несли подтверждения у других авторов /22,37/.

Из представленных данных вытекает, что биологическая проба остается в дальнейшем единственным надежным методом обнаружения ботулинического токсина. Исходя из этого является необходимым продолжать дальнейшие исследования по разработке чувствительных и быстрых методов согласно с общей тенденцией сокращения диагностических циклов болезнетворных микроорганизмов и их токсинов.

До сих пор не замечено донесений по использованию, для этой цели, реакции иммунофлуоресценции /иф/, которая имеет более широкое применение в микробиологических исследованиях даже для обнаружения жидких антигенов.

Paronetto /29/, а потом Toussaint и сотр. /47,48/ описали обнаружение жидких антигенов реакцией иф при использовании матриц /мембранных фильтров, эритроцитов/. Reiss и сотр. /31/ определяли при помощи реакции иф разные анатоксины адсорбированные на

коллоидных химических соединениях. Как наилучший адсорбент признали фосфат алюминия /32/.

Дальнейшие исследования следует вести по модификации биологической пробы с целью быстрого обнаруживания ботулинического токсина. Mezejewski и Kujawski /24/ показали, что белые мышки живут уже в ранней стадии отравления ботулиническим токсином живут дольше после получения летальной дозы ингибитора холиновой эстеразы по сравнению со здоровыми мышками.

На основании этих данных признано, как целесообразное, вести дальнейшие исследования по разработке методики быстрого обнаружения ботулинического токсина при помощи модифицированной реакции иф, а также при помощи модифицированной биологической пробы.

Окончательной целью работы было:

1. Сравнение пригодности избранных белковых адсорбентов как матриц для быстрого обнаруживания ботулинического токсина при помощи модифицированной реакции иф.
2. Сравнение пригодности избранных белковых преципитинов для быстрого обнаружения токсина при помощи модифицированной реакции иф.
3. Определение самого короткого времени необходимого для отчета модифицированной биологической пробы при обнаружении ботулинического токсина.

#### Материал и методы

##### Токсин

В исследовании был использован неочищенный преципитат ботулинического токсина / из 4-дневной культуры *Cl.botulinum C* /штамм Netz / на питательной среде Wzgoska / полученный по методу Snipe и Sommeta /43/.

### Антитоксическая сыворотка

Кролики-гибриды весом около 4 кг иммунизированы были ботулиническим антитоксином типа С, очищенным по методу Gordona и сотр. /11/ и адсорбирован на гидроксид алюминия /21/. Один миллилитр полученной сыворотки нейтрализовал 6000 ДИМ мышинных, а электрофоретически констатировано в ней повышение гамма-глобулиновой фракции на около 10% по сравнению с состоянием перед иммунизацией.

Часть антитоксической сыворотки была определена при помощи изоприаната флюоресцеина по методу Rindenknechta модифицированному Kubicy и сотр. /17/.

### Нормальная сыворотка

Нормальная сыворотка была получена от кроликов весом около 4 кг, которые перед тем не болели и не были иммунизированы никакими антигенами.

### Адсорбенты

Применены были следующие адсорбирующие препараты:

1. Sephadex G-25 продукции Pharmacia, Uppsala
2. Поливинилпирролидон /PVP/ продукции Brit. Drug House Ltd.,
3. Декстран продукции Warsz. Zaklady Farmaceutyczne
4. Талк продукции Polskie Odczynniki Chemiczne, Oswiecim
5. Латекс LBS - 3012 продукции Zaklady Chemiczne, Oswiecim
6. Терапевтический уголь прод. Chem. Fabrik E. Merck, Darmstadt
7. Вактолатекс прод. Difco Laboratories, Detroit

### Осаждатели

Применены были следующие биологические осаждатели:

1. Ацетон прод. Zaklady Chemiczne Oswiecim
2. Танин прод. Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice
3. Трихлоруксусная кислота прод. как выше



Для этой цели использован был физостигмин, которого 1 DIM интраперитонеальная доля белой мышки составляла 0,06 мг в 0,1 мл. водного раствора при интраперитонеальной инъекции.

Лабораторные животные

Биологическая проба была проведена на белых мышках весом 16-20г не смотря на пол.

Процедура

Проведение реакции иф.

К двум препаратам токсина /адсорбированного или осажденного/ прибавлялась первоначально система необозначенных сывороток / нормальной для специфической реакции и антитоксической для контрольной реакции/, а только потом для обоих препаратов обозначенную антитоксическую сыворотку.

Благодаря такой процедуре каждый раз проводили реакцию иф. надлежащую и контрольную. При учете результатов брали во внимание разную по интенсивности флуоресценцию и разную остроту препаратов как основной критерий их оценки. На основании этих предпосылок препараты надлежащей реакции при хорошей адсорбции токсина должны давать более интенсивную флуоресценцию по сравнению с препаратом контрольной реакции.

Проведение модифицированной биологической пробы

Белым мышкам, находящимся в стадии перед появлением признаков или ранней стадии появления признаков отравления ботулиническим токсином применяли 1 DIM физостигмина. Одновременно такую самую дозу физостигмина применяли здоровым мышкам. От момента подачи физостигмина определяли время переживаемости мышек обеих групп, после чего подсчитывали среднюю переживаемость отдельно для обеих групп.

## Результаты

### Реакция иф с использованием адсорбентов.

Микроскопическая картина иф с использованием серпадеха показала интенсивное откладывание маркированных антител нацелой поверхности частиц,

В картине контрольной реакции констатировано менее интенсивная флуоресценция.

Поливинилпирролидон и декстран как адсорбенты покрытые токсином и специфическим для его конъюгатом проявили интенсивную флуоресценцию.

В картине контрольной реакции видны были не остро ограниченные совокупности адсорбентов. Это свидетельствует о том, что конъюматы адсорбента с токсином были свободно соединены небольшим количеством маркированных тел.

Взвеси серпадеха и поливинилпирролидона в физиологическом растворе проявляли автофлуоресценцию, что может препятствовать применению их к реакции иф.

Микроскопическая картина реакции иф с применением талька показала более интенсивную флуоресценцию больших частиц по сравнению с малыми. В контрольной реакции только немногие большие частицы проявляли интенсивную флуоресценцию, но большинство из них, а также все малые проявляли более слабую флуоресценцию и имели затертые контуры. Взвесь талька проявляла незначительную автофлуоресценцию аналогично как сефадекс и поливинилпирролидон.

В картине реакции иф при применении латекса видны были свободные совокупности его, покрыты токсином и минимальным количеством маркированных антител. Контрольная реакция давала слабую флуоресценцию.

Микроскопическая картина реакции иф с применением бактолатекса показала большое адсорбирование токсина связанного со специфическим конъюгатом. Результатом этого была интенсивная флюоресценция совокупностей ярко зеленого цвета. Контрольная картина указывала отчетливо на затухание флюоресценции.

Последним адсорбентом, который был применен в соответствующих исследованиях - это был уголь. Аналогически как у других адсорбентов также и здесь большие частицы угля проявляли отчетливо зону флюоресценции, а малые частицы проявляли слабую флюоресценцию и имели более затертые контуры. Картина контрольной реакции не проявляла заметной разницы по сравнению с соответственной реакцией.

#### Реакция иф при применении осадителей

В картине реакции иф, в которой токсин осажден был при помощи ацетона, был видим осадок токсина в малой степени соединенный с конъюгатом. Аналогически представлялась картина контрольной реакции.

Еще более слабую флюоресценцию получили при применении танина как осадителя. Констатировали очень слабую флюоресценцию небольшого количества осадка, а также слабо флюоризирующей однородной взвеси. Контрольная реакция не отличалась от соответственной реакции.

Одним из концевых осадителей была применена трихлоруксусная кислота. В картине этой реакции была отчетливо видна ограниченная флюоресценция большого осадка токсина. В некоторых частях картины констатированы большие, ясно светящиеся совокупности маркированных антител собранных только в определенных местах берегов осадков. В контрольной картине видны были хлопья токсина свободно покрытые маркированными антителами. Картина была затертой без отчетливых линий берегов осадка.

Обнаруживание токсина при помощи модифицированной биологической пробы.

В опыте одна средняя времени переживаемости мышей отравленных дозой 1000DLM ботулинического токсина, а потом 1DLM токсина находилась первоначально в границах средней переживаемости мышей из контрольной группы /мышки из контрольной группы переживали в среднем  $4,8 \pm 2$  мин./ По 3-х, а особенно по 4-х часах по отравлению ботулиническим токсином эта средняя подвергалась увеличению до 6,7 и 11,6 мин.

Во 2 опыте среднее время переживаемости мышей, отравленных 100DLM токсина, а потом физостигмина было незначительно выше для контрольной группы / до 3 часов после отравления ботулиническим токсином мышки из контрольной группы переживали в среднем  $4,2 \pm 1,5$  мин./ От 4 до 6-ти часов эти подвергались увеличению до 6,7 и 9,1 мин.

В третьем опыте средняя времени переживаемости мышей отравленных 10DLM ботулинического токсина, а потом физостигмина была незначительно меньше или больше средней / до 6-ти часов после отравления токсином для контрольной группы/. Мышки из контрольной группы переживали в среднем  $4,7 \pm 1$  мин. По истечении 7,8 и следующих часов время переживаемости удлинялось до 6 и свыше 6 минут.

В четвертом опыте среднее время переживаемости мышей отравленных 1 DLM ботулинического токсина, а потом физостигмина находилось в границах средней переживаемости мышей из контрольной группы до 12 часов по отравлению ботулиническим токсином /мышки из контрольной группы переживали в среднем  $4,4 \pm 1,13$  мин./ В следующие часы переживаемость удлинилась до 5-9 минут.

В пятом опыте мышки, которые получили нейтрализованный токсин переживали все более коротче после подачи физостигмина по сравнению с мышками, которые получали токсин смешанный с нормальной сывороткой. Разхождение среднего времени переживаемости



между группами составляло поочередно 0,5; 3,5; 6,5; 6,25 и 8,5 минут. При разбросе определений в первой группе от 2 до 7 мин., а во второй от 3 до 21 мин.

#### Дискуссия

Сефадекс адсорбировал токсин довольно свободно, что нашло подтверждение в известном явлении быстрого вымывания белков из сефадексовых колонок /18/. Констатированная, в собственных исследованиях, незначительная автофлуоресценция взвеси сефадекса может представлять серьезное препятствие при отчете результатов особенно при слабых реакциях иф.

Поливинилпирролидон и декстран известные как кровезаместительные препараты /первый применяется также в лечении отравлений ботулиническим токсином/ /39,46,50/, добавляемые в виде начального вещества оказались хорошими адсорбентами токсина.

Поливинилпирролидон проявляет однако значительную автофлуоресценцию и потому является не пригодным для адсорбции токсина в реакции иф.

На основании этих результатов можно предложить декстран как адсорбент при применении реакции иф для обнаруживания ботулинического токсина. Следует только обратить внимание на содержание тех самых условий в методике, которые принято в настоящей работе. Предварительные исследования показали, что прибавка большого количества декстрана или поливинилпирролидона к раствору токсина является причиной избыточного загущения затрудняющего дальнейшую "обработку" препарата. Прибавка очень малого количества этих адсорбентов может с другой стороны причиниться к полному растворению их и в итоге дать малую остроту микроскопической картины.

Тальк зачислен к веществам характеризующимся слабой способностью адсорбирования /28/. Это также подтвердилось в малой ад-

сорбции токсина как это констатировано в собственных исследованиях. Тальк аналогически как и сефадекс проявляет свойства автофлуоресценции, что практически делает непригодным как адсорбент для реакции иф. Аналогически следует отрицательно оценить латекс и уголь. Возможно, что адсорбция токсина на этих препаратах требует более длительного времени, чем это было принято в методике исследований. Например: Reiss и сопр. /32/ адсорбировали анатоксины на фосфате алюминия во времени, которое было двукратно большее. В собственных исследованиях постоянно принималось во внимание быстрота и поэтому не продолжалось адсорбирование за пределы принятое, а именно по часу. Следует сказать, что в отличие от талька, латекс и уголь являются хорошими адсорбирующими веществами /28/. Их применяют или в терапии, или в диагностике как препараты с очень активной поворотностью частиц, дающую возможность адсорбировать разные вещества даже содержащие большие частицы типа белков /13,28/. Наиболее контрастные картины соответственной реакции и контрольной реакции получены при применении бактолатекса как адсорбента токсина. Картины эти отличались по остроте контуров, а также по интенсивности и раскраске флуоресценции.

Другая модификация реакции иф основана была на осаждении токсина из раствора. Дальше поступали с осадками так, как с адсорбированным токсином. Среди примененных по выбору 3-х осадителей только трихлорусусная кислота причиняла к отчетливому осаждению токсина в таком состоянии, что его хлопья входили в реакцию с антитоксической сывороткой. Применение остальных осадителей, как ацетона и танина, вызвало незначительную флуоресценцию микроскопически препаратов и реакции иф.

«Одводя итог этой части исследований следует принять, что применение бактолатекса или декстрана аналогически как и фосфата алю-

иния, исследуемого Reissom и сотр., а среди осадителей трихлор-уксусной кислоты дает надежду на практические возможности использования реакции иф для быстрого обнаруживания ботулинического токсина. Следующим этапом исследований должна быть оценка пригодности этой реакции при обнаруживании других типов токсинов, определение специфичности в отношении к жидким антигенам общих для Cl.bot., Cl. proteogenes и Cl.putrifactum, обнаруживание токсина в разной среде /продовольственные продукты, вода, материал взят от больных или павших животных, анаэробные культуры бактерий и тп/. Эти проблемы должны быть темой отдельных работ, практического характера, предлагаемых модификаций реакции иф для диагноза, в лабораторных условиях, отравлений ботулиническим токсином.

Вторая часть исследований касалась установления, до какого минимум можно сократить время для обнаруживания токсина модифицированной биологической пробой.

Показано, что длительная переживаемость мышек, отравленных ботулиническим токсином, а потом физостигмином наступает уже по истечении 3-6 часов после отравления ботулиническим токсином в дозе по 1000, 100 и 10 ДИМ.

Результаты, полученные в исследованиях по модификации биологической пробы согласны с результатами исследований по комбинированному действию токсина и изопропилового эфира метилфторофосфорной кислоты, которая аналогически как физостигмин является ингибитором холиновой эстеразы /24/. Рабочая схема механизма действия ингибитора и ботулинического токсина на взаимное соотношение холиновой эстеразы и ацетилхолина в итоге на переживаемость пораженного организма представлено на рис.26.

Согласно со схемой интерпретация этих явлений следующая: после подачи ингибитора эстеразы в организме наступает торможение

ее активности при сохранении физиологической секреции ацетилхолина. Подача ботулинического токсина вызывает уменьшение количества выделенного ацетилхолина нервными окончаниями двигательных нервов. В связи с этим организм требует меньшей активности энзима разлагающего ацетилхолин, что клинически проявляется длительной переживаемостью животных, подвергнутых комбинированному отравлению по сравнению с животными отравленными самим ингибитором эстеразы.

Результаты собственных исследований являются приближенными к тем, которые получили Kowatzuk и сотр. /15/ при исследовании комбинированного действия ботулинического токсина и столбнячного токсина. Этот последний, аналогически как физостигмин является ингибитором холиновой эстеразы.

Представленные две модификации реакции иф как и биологической пробы разрешают сократить процесс обнаруживания ботулинического токсина. Если принять, сравнительно, минимальное время 24 часа требуемое для постановки и учета до сих пор применяемой биологической пробы, то для постановки и учета модифицированной реакции иф требуется время 3 часа /сокращение на свыше 87%, а для модифицированной биологической пробы около 6 часов при дозе токсина 10D<sub>50</sub> /сокращение на 75%/. Это минимальное время требуемое для проведения обеих проб является зависимым от иммунобиологических и физико-химических свойств ботулинического токсина. На настоящем этапе развития иммунохимии нет теоретических предпосылок для проведения других направлений исследований по разработке быстрых методов обнаруживания ботулинического токсина.

#### Выводы

1. Для реакции иф при обнаруживании ботулинического токсина наиболее пригодными оказались бактолатекс и декстран.
- 2, Сефадекс, тальк и поливинилпирролидон будут иметь ограничен-



ное применение в виду автофлуоресцирующих свойств.

3. Латекс и уголь проявили медленный адсорбционный процесс и поэтому не будут иметь применения в модификации реакции иф для быстрого обнаруживания ботулинического токсина.

4. Среди 3-х исследованных осадителей, только трихлоруксусная кислота вызвала хорошее осаждение токсина, который сохранил антигенные свойства и хорошо соединялся с маркированной сывороткой.

5. Кроме реакции иф можно применять собственную модификацию биологической пробы для быстрого обнаруживания ботулинического токсина.

6. В этой пробе следует применять наиболее однородных лабораторных животных с целью избежания значительного разброса времени переживаемости.

7. Предлагаемая модификация реакции иф разрешает сократить процесс обнаруживания ботулинического токсина на свыше 87%, а модификация биологической пробы на свыше 75%.

8. Исследования, которые проведены до сих пор, следует расширять на другие типы токсинов ботулинических и антигенов других ти-  
пов

Pismienictwo

1. Boroff D.A., Fitzgerald J.E.: Nature 181 /4611/ , 751 , 1958
2. Boroff D.A.: Int.Arch.Allergy 15 /1-3/ , 74 , 1969
3. Boyden S.V.; Sorkin E.: Journ.Immunol. 75 /1/ , 15 , 1955
4. Bulatowa T.I.: Zurn.Mikrob.Epid.Immun. 41 /1/ , 96 , 1964
5. Bulatowa T.I.: Zurn.Mikrob.Epid.Immun. 41 /7/ , 79 , 1964
6. Cartwright T.E.; Lauffer M.A.: Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 81 /3/ , 508 , 1952
7. Cristey T.D.: Appl.Mikrob. 8 /5/ , 282 , 1960
8. Czernietskaja N.B.: cyt wg Matwieejewa , Botulizm , Medgiz , Moskwa , 1959
9. Doniec I.F.: Zurn.Mikrob.Epid.Immun. 28 /7/ , 84 , 1957
11. Freeman N.L.: Journ.Bact. 81 /1/ , 156 , 1961
11. Gordon M., Flock M.A., Jarincky A., Duff J.T.: Journ.Bact. 74 /4/ , 533 , 1957
12. Jafajew W.R., Czepielew G.A.: Zurn.Mikrob.Epid.Immun. 32 /1/ , 21 , 1961
13. Kardaszewicz E.: Pol.Tyg.Lek. 20 /34/ , 1286 , 1965
14. Konikowa R.E.: Wojenmed.Zurn. 2,24 , 1961
15. Kowarzyk H., Fall W., Czerchawski L.: Arch.Immun.Therap.Exp. 13 /4/ , 426 , 1965
16. Kowtunowicz S.L.: Tiezisy dokl.miezinstituck.naucznoy konferencji po probleme anaerobow , cyt wg Matwieejewa , 1956
17. Kubica J., Bilecki Sw., Biel J., Grzybowski J.: Rocznik WIH 7 /4/ , 11 , 1965
18. Kubica J.: Immunofluorescencja , PZWL , Warszawa , 1967
19. Lemannz C.: Science 130 /3378/ , 763 , 1959
20. Lewis K.H., Cassel K.: Botulizm /Proc.Symposium/ , Cincinnati , Ohio , 45226 , 1964
21. Matwiejew K.I.: Botulizm , Medgiz , Moskwa , 1959

2. Mierzejewski J.: Med.Dośw.Mikrob. 18 /4/, 369, 1966
- 2a. Mierzejewski J.: Przegl.Epid. 18 /1/ , 77 , 1964
3. Mierzejewski J.: Med.Dośw.Mikrob. 20 /4/ , 355 , 1968
24. Mierzejewski J.: Kujawski J.: Pol.Arch.Wet. 11 /2/ , 275, 1968
25. Minerwin S.M., Zak S., Czerwiakowa K.I.: Zurn.Mikrob.Epid. Immun. 25 /5/ , 48 , 1955
26. Minerwin S.M. , Zak S., Czerwiakowa K.I.: Zurn.Mikrob.Epid. Immun. 27 /6/ , 44 , 1956
27. Mc Nemar Q.: Psychological Statistics, J.Willey , N.York, 1949
28. Opieńska - Blauth J., Waksmudzki A., Kański M.: Chromatografia , PWN , Warszawa , 1957
29. Paronetto F.: Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 113 /2/ , 295 , 1963
30. Figoury L., Michel C., Chabassol C.: Rev.Corps , Sant.Terr. Med. Air. 3 /3/ , 1962
31. Reiss J., Wojtyła B., Lachowicz T., Zyzyński Z.: Rocznik WIHE, 8 /5/ , 5 , 1966
32. Reiss J., Wojtyła B., Lachowicz T., Pawelczak M.: Rocznik WIHE , w druku
33. Rycaj T.: Przegl.Epid. 19 /2/ , 268 , 1965
34. Rycaj T.: Biul.Polskiej Akademii Nauk 4 /9/ , 335 , 1956
35. Rycaj T.: Biul.Polskiej Akademii Nauk , 4 /9/ , 341 , 1956
36. Sawin W.R.: Mikrob.Zurn. 22 /4/ , 51 , 1960 , cat wg Ref.Zurn. 13 , 1961
37. Schantz E.J., Stefanye D., Spero L.: Journ.Biol.Chem. 235 /12/ , 3489 , 1960
38. Schubel K.: Arch.Exp.Pathol.Pharmacol. 96 , 193 , 1923
39. Schubert R.: Dtsch.Med.Wschr. 76 , 1487 , 1951
40. Siergiejeva T.I.: Zurn.Mikrob.Epid.Immun. 33 /5/ , 96 , 1962

41. Sirgiejewa T.I.: Zurn.Mikrob.Epid.Immun. 40 /7/ , 77 , 1963
- 42 .Siergiejewa T.I.: Zurn.Mikrob.Epid.Immun. 43 /4/ , 54 , 1966
43. Snipe P.P., Sommer W.: Journ.Inf.Dis. 43 , 152 , 1928
44. Synicyn W.A.: Zurn.Mikrob.Epid.Immun. 31 /3/ , 22 , 1960
45. Synicyn W.A.: Zurn.Mikrob.Epid.Immun. 31 /4/ , 102 , 1960
46. Szostakowskij M.F., Sidielkowskaja F.P.: Priroda 1 , 105 ,  
1962
47. Toussaint A.J., Anderson A.S.: Appl.Mikrob. 13 /4/ , 552 ,  
1965
48. Toussaint A.J., Tarrant C.J., Anderson R.J.: Proc.Soc.Exp.  
Biol.Med. 120 /3/ , 783 , 1965
49. Waart J., Allen J.H.: Dhout J.H.: IX Intern.Congr.Mikrob.,  
Moskwa , 1966
50. Zuk E.: Zurn.Mikrob.Epid.Immun. 41 /8/ , 26 , 1962