

FLUORESKUJÍCÍ PROTILÁTKY V RYCHLÉ MIKROBIOLOGICKÉ DIAGNOSTICE

2. Diagnostika střevních infekcí bakteriální etiologie

Podplukovník MUDr. Jiří FRANĚK, CSc.

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie v Praze

Z hlediska rychlé bakteriologické diagnostiky a účelnosti použití v epidemiologické praxi přinesla zatím nejúspěšnější výsledky aplikace FP k znázornění **enteropatogenních E. coli** (EEC).

V roce 1958 publikovali Whitakerová a ost. zprávu o použití FP k detekci EEC ve vzorcích stolice odebraných při epidemii v roce 1954 a uchovávaných ve zmrazeném stavu. FP byly citlivější než kultivace i při srovnání s výsledky dosaženými původně u čerstvých vzorků v ohnísku. Aplikace FP byla cílená; s využitím poznatků získaných při původním vyšetřování byl v přímé metodě použit konjugát připravený z typového séra.

Téměř současně byla publikována řada prací převážně metodického charakteru (Petuely a Lindner 1958, Thomasonová a ost. 1959-a, Kabanova a ost. 1960, Nelson a Whitakerová 1960, Styčinskij 1960 a j.), které na malých ověřovacích sestavách vzorků od nemocných dětí potvrdily použitelnost metody. Skutečně cennou informací o epidemiologickém významu metody znamenalo sdělení Nelsona a ost. (1961): FP byly poprvé s velkým úspěchem použity k vyhledávání zdrojů v zařízení pro nedonošené děti, kde vznikla epidemie vyvolaná E. coli 0119: B14. Epidemie byla promptně zvládnuta — po prvé v podobné situaci bez přerušení provozu — vyřazením zdrojů a jejich bezodkladnou sanací antibiotiky. Znovu také byla potvrzena vyšší záchytnost ve srovnání s kultivací; FP se ukázaly výhodnější i pro sledování účinnosti sanace, protože výsledek reakce nebyl na rozdíl od kultivace ovlivňován aplikací antibiotika.

Metoda získala obecné uznání, vyjádřené jak počtem pracovišť, která ji začala používat, tak mj. i uveřejněním rozsáhlé třídílné práce v bulletinu SZO, obsahující nejen podrobné metodické návody (Thomasonová a ost. 1961a, 1961), ale i vyhodnocení výsledků široce organizované terénní prověrky (Cherry a ost. 1961).

Vysloveně epidemiologickou otázkou řešili pomocí FP Thomasonová a ost. (1963). Během 14měsíčního období (1961—1962) vyšetřili 664 dětí ošetřovaných nebo vyšetřovaných v jedné nemocnici. U 48 % hospitalizovaných a u 30 % ambulantních pacientů byly nalezeny EEC celkem 9 typů. Ve snaze zjistit cesty přenosu byly prováděny jak rektální, tak nazofaryngeální

výtěry. Jen 18 % příslušníků rodin a 4 % osob z okolí nemocných dětí mělo pozitivní rektální výtěr, zatímco v nazofaryngeálních výtěrech byly EEC nalezeny u 50 %, resp. u 37 % vyšetřovaných osob. Ze vzorků FP pozitivních byly EEC izolovány v 57 %. Použití FP tedy umožnilo hromadné vyšetřování velkého počtu vzorků a znamenalo i vyšší záchytnost.

Hlavní význam nověji publikovaných prací je v rozpracovávání používané metodiky. Především naprostá většina autorů přešla — podobně jako při detekci shigel a salmonel — od aplikace FP přímo na nátěry stolice k aplikaci na preparáty připravené ze smíšené primokultury po krátkodobé předkultivaci. Ať už totiž byla výchozím materiálem pro přípravu preparátů přímo stolice, její suspenze nebo i filtrát (po přefiltrování přes gázu), přítomnost nejrozličnějších částic vyznačujících se autofluorescencí nebo velkou schopností nespecificky adsorbovat konjugáty ztěžovala hodnocení výsledků a zhoršovala spolehlivost reakce.

Danielson a Laurell (1961) srovnávali čtyři způsoby zpracování vzorků:

- a) kultivace na pevné půdě, aglutinační určení 12—15 kolonií;
- b) suspenze ze stolice ve fyziologickém roztoku, kultivace a současně nátěr na sklíčko pro aplikaci FP;
- c) stejná suspenze, filtrace přes gázu; pro aplikaci i pro přípravu preparátu použit sediment po centrifugování filtrátu (3000 ob./min., 10 minut);
- d) předkultivace v malém objemu (2,5 ml bujónu), přeočkování na pevnou půdu a současně příprava preparátu ze sedimentu po zcentrifugování bujónu.

V době zvýšeného výskytu E. coli 0111:B4 v dětském domově v Norsku na podzim 1959 bylo vyšetřeno celkem 264 vzorků. Maximální záchytnost měla aplikace FP po předkultivaci (metodika sub d). Ostatní tři postupy se prakticky nelišily (21—24 pozitivních proti 35 při poslední modifikaci).

Tato práce také přinesla zajímavé údaje o citlivosti metody: při ředění pozitivní stolice suspenzí stolice od zdravých byla kultivace úspěšná jen při poměru 1:2, zatímco FP ještě při ředění 1:128. Při srovnání masívnosti nálezu byly výsledky podobné:

Ze sedmi vzorků, obsahujících pouze ojedinelé fluoreskující mikroby (FP+), se nepodařil kultivační záchyt ani jednou. Ze dvou vzorků s FP++ byla kultivace pozitivní 1krát, ze čtyř s FP+++ byla kultivace úspěšná 4krát, z pěti s FP++++ také čtyřikrát; u 17 s FP++++ byla naprostá shoda, při masivním kultivačním nálezu.

Podobné pozorování popsali už dříve Kabanova a ost. (1960), kteří dosahovali úspěšné kultivace jen z těchto vzorků, kde byl velký počet fluoreskujících mikrobů. Ve vzorcích, kde byly pomocí FP detekovány jen jednotlivé buňky, byla kultivace vesměs negativní (vyšetřeno celkem 230 dětí, z nichž 147 mělo průměry. Pozitivní výsledek byl zaznamenán 63×). Autoři proto považují FP za zvlášť vhodnou metodu pro sledování dynamiky vylučování EEC v průběhu infekčního procesu.

Glazerov (1964) považuje za velmi efektivní 5hodinové pomnožování na šikmém agaru. Preparáty pro aplikaci FP byly připravovány z kondenzátu. Autor zdůrazňuje význam nejen samotného pomnožení, ale i vzniku mladých „gigantických forem“ EEC, které umožňují zvlášť účinně využít FP.

Ze všech popsanych výsledků tedy vyplývá, že v případě EEC je při použití vhodné techniky imunofluorescenční metoda skutečně citlivější než kultivace. Je ovšem třeba si uvědomit, že nejde o kultivaci na selektivní půdě, ale o vyhledávání kolonií na plotnách se smíšenou kulturou pomocí aglutinačního určení. Tím, že při použití FP je ve skutečnosti vyšetřována větší část mikrobiální populace, je možné vysvětlit i neobvykle vysoký počet současných nálezů několika různých typů EEC u jednoho a téhož nemocného. Wagner a Unger (1963) navrhli pro kvantitativní analýzu smíšené mikrobiální populace na plotně používat zvláštní otiskové preparáty, při nichž používají kruhové skleněné destičky o průměru 85 mm. FP se tedy v tomto případě aplikují na otisky kolonií.

Mimořádně důležitou otázkou je volba specifického séra. V původních pracech (Whitakerová a ost. 1958, Petuely 1958 a j.) byla používána jednotlivá typová séra, respektive z nich připravené konjugáty. Tento postup je jistě pro praxi málo vhodný. Thomasonová a ost. už v roce 1959 referovali o možnosti použít polyvalentní konjugáty proti 4—5 nejběžnějším typům EEC. Tuto možnost téměř současně vyzkoušeli i jiní autoři (Nelson a Whitakerová 1960, Stulberg a ost. 1960); zkušenosti byly vesměs dobré. Ve všech případech však bylo polyvalentní sérum připraveno jako **směs monovalentních typových**, při čemž vzájemně kvantitativní poměry bylo třeba předem vyzkoušet. Thomasonová a ost. uvádějí např. stai-

ning-titer jednotlivých typových konjugátů 1:32 až 1:80; optimální pracovní ředění bylo 1:20. Úměrně tomu pak byla séra pro polyvalentní konjugát ředěna 1:4 a smíchána ve stejných objemech (tj. při smíchání 4—5 sér je zachováno zhruba stejné pracovní ředění jako u monovalentních konjugátů, 1:20).

Pokud jde o druhou část otázky, není odpověď zcela jasná. Zatím nejuplněnější údaje obsahuje už citovaná práce Thomasonové a ost. (1961a). Vyplývá z ní, že na reakci se podílejí jak O, tak i B antigeny. Konjugáty ze séra obsahujícího protilátky pouze proti O antigenu barví EEC stejně jako konjugát obsahující protilátky proti O i B, tj. nedochází k inhibici, známé z reakce aglutinace. Také charakter vazby (morfologie fluoreskujících mikrobů) je stejný. OB konjugáty však dosahují dvojnásobně až čtyřnásobně vyššího „barvicího titru“ než O konjugáty. Autoři je proto považují za výhodnější, už také vzhledem k dříve zjištěným skutečnostem o zkřížených reakcích, které jsou u OB sér méně časté než u O sér.

Při testování 28 kmenů *Salmonella* sp., 12 kmenů *Shigella* sp., 12 kmenů *Providencia*, 12 coliformních kmenů, 32 kmenů *Citrobacter freundii* a 12 sérotypů *Arizona* autoři zjistili jen minimální počet zkřížených reakcí: 3 u *salmonel*, 1 u *Providencia* O6 (ve všech případech šlo o těsnou antigenní příbuznost, známou i z jiných reakcí) a po jedné zřetelně slabší reakci u *C. freundii* O26 a *Arizona* O18.

Velmi podobné výsledky měli při obdobné prověrce specifičnosti reakce Davis a Ewing (1963).

Zatím nejhorší zkušenost popsal Martineau (1962), který při vyšetřování 2061 vzorků pomocí FP pozoroval 61 nesprávně pozitivních a 33 nesprávně negativních reakcí. Autor se domnívá, že FP jsou pro klinickou bakteriologii prakticky bezcenné, i když nepopírá jejich účelnost při vyšetřování ohnisek. Z rozboru nesprávných výsledků však vyplývá, že byly zaviněny m. j. i obsahem „přirozených protilátek“ v konjugátech (tj. nedokonale provedenou předběžnou prověrkou sér), malou intenzitou fluorescence konjugátů s LRB 200 a i některými dalšími vysloveně technickými nedostatky. Výsledky je proto obtížné srovnávat s ostatními metodicky odlišnými pracemi.

Měřeno úspěšností pokusů o praktickou aplikaci je na druhém místě rychlá diagnostika shigel.

Z experimentálních prací, věnovaných pokusům o identifikaci *Sh. flexneri* (La Brec a ost. 1958, Daškovičová a Djakov 1959, Kabanova a spol. 1960, Grabovskij 1961, Kožuško a ost. 1961) vyplývá jednoznačný závěr: při použití faktorových (monospecifických) sér, ředěných

do „barvícího titru“, je identifikace čerstvě izolovaných i sbírkových kmenů dobře možná a výsledky jsou stejně spolehlivé jako u reakce aglutinace.

Jakmile ale bylo přistoupeno k pokusům o detekci shigel i v uměle kontaminovaném materiálu, objevila se řada obtíží. Djakov a ost. (1962) např. kontaminovali vzorky mléka 24-hodinovou kulturou *Sh. flexneri* a v různých intervalech se pokusili o průkaz kontaminace pomocí FP. Z výsledků vyplývá, že přímý průkaz je možný jen při použití inokula alespoň 10^7 v 1 ml, a to jen první 2—3 dny po kontaminování. S postupem času nejen že se zmenšuje počet zjišťovaných shigel (podobně jako při pokusech o jejich reisolaci), ale rychle **slábne i intenzita fluorescence**. Při srovnávání různých pracovních postupů se jako nejlepší ukázala předkultivace v bujónu (6—24 hodin), s aplikací FP na preparáty ze sedimentu.

Autoři se pokusili prověřit metodu v praxi: ze 181 vzorků mléka jen 99 bylo zcela negativních, ve 32 byly nalezeny fluoreskující tyčky po aplikaci různých konjugátů (tj. zřetelně nespecifická reakce), v 28 vzorcích byly ojediněle typicky fluoreskující mikroby a ve 22 byl nalezen těchto mikrobu masivní. Při kultivaci byla zjištěna značná kontaminace banálními střevními mikroby, shigela nebyla izolována ani v jediném případě. Údaj autorů o izolaci asi 62 „parakmenů“ *E. coli*, které aglutinovaly v séru proti *Sh. flexneri*, vzbuzuje pochybnosti o kvalitě používaného séra. Práce je přesto dokladem toho, že vyšetřování přirozeně kontaminovaného materiálu je podstatně obtížnější než identifikace už izolovaných kultur.

To potvrdily i výsledky vyšetřování vzorků stolice: jak např. uvádějí Taylor a ost. (1963), byla při vyšetřování 274 vzorků stolice (FP proti oběma fázím *Sh. sonnei* byly aplikovány na nátěry ze stolice nemocných) nalezena shoda FP a kultivace v 70,8 proc. Bylo 13,5 proc. nesprávně pozitivních a 15,7 proc. nesprávně negativních výsledků.

Podobnou zkušenost zřejmě už dříve učinila řada sovětských autorů (viz Grabovskij 1961, Kulikova a ost. 1963, Jegorov 1963 a j.). Zinověva a Špagina (1962) i někteří jiní měli dobré výsledky při aplikaci FP na preparáty ze sedimentů, získaných centrifugováním filtrátů ze stolice.

Stojí za zmínku, že u pozitivních nemocných autorky pozorovaly 2 — 10 i více fluoreskujících shigel v zorném poli, tj. že koncentrace ve výchozím materiálu musela dosahovat úrovně alespoň 10^6 — 10^7 /ml. Většina autorů však doporučuje používat FP ne k přímé detekci ve stolici, ale — jak už to bylo popisováno u EEC — až k identifikaci smíšené primokultury po

alespoň krátkodobém pomnožení. Čuchlovin a Ivanova (1961) měli při zachování tohoto postupu při vyšetřování 119 vzorků stolice plnou shodu kultivace a FP (byly izolovány 63 kmeny shigel).

Určité zkušenosti byly získány také v rychlé diagnostice salmonel.

V roce 1957 byla publikována práce Thomasonové a ost., kteří zjišťovali principiální možnost použití FP k znázornění jednotlivých antigenů salmonel a srovnávali FP s reakcí aglutinace. Získané zkušenosti se pokusili využít k detekci salmonel ve stolici, setkali se však s početnými zkříženými reakcemi, které přesahovaly i hranice rodu (Thomasonová a ost. 1958). Autoři se pokoušeli zvýšit spolehlivost reakce odstraněním balastního materiálu (preparáty z filtrátů) zavedením kvantitativního hodnocení typické fluorescence a j., nepodařilo se však dosáhnout uspokojivých výsledků (Thomasonová a ost. 1959b).

Podobnou zkušenost udělal i Truant (1959) v pokusech s konjugáty z polyvalentních skupinových (proti A, B a D) salmonelových sér. Zvláště nevýhodnou (co do počtu zkřížených reakcí) se ukázala nepřímá metoda. Za jednu z příčin nesprávných výsledků je považováno velké kolísání intenzity specifické fluorescence, která je jen u části homologních mikrobů brilantní (už uvedený pokus Thomasonové a ost. o stanovení kvantitativních kritérií pro hodnocení fluorescence je zřejmě reakcí na stejnou zkušenost). Jedinými materiály, kde průkaz salmonel mohl být prováděn pomocí FP bez obtíží, byly mozkomíšni mok a krev.

Tyto zkušenosti jsou podkladem nejúspěšnějších výsledků publikovaných v poslední době: Miroljubova (1962a) nejprve experimentálně ověřila, že důkaz salmonel v krvi je technicky možný: po 18hodinovém pomnožení v bujónu s 5 % žluče se podařilo zachytit 5 — 25 salmonel/ml výchozího inokula.

Postup byl pak vyzkoušen na klinickém materiálu (Miroljubova 1962b). Při vyšetřování vzorků krve od 59 nemocných, z nichž u 24 šlo o břišní tyfus nebo o paratyfy, daly FP pozitivní výsledek $14\times$. Nebyly pozorovány žádné nespecifické reakce při aplikaci na kontrolní vzorky.

Ivanova a Bočorišvili (1963) podobný postup vyzkoušeli u 72 nemocných. Konjugátem ze séra proti *S. typhi* (proti O,H i Vi antigenům) vyšetřili 87 vzorků krve a 36 vzorků žluči, získaných duodenální sondou. V primokultuře po předkultivaci byly salmonely nalezeny $17\times$ v krvi a $16\times$ ve žluči; zcela stejné výsledky dala i kultivace s následujícím biochemickým a sérologickým určením.

V literatuře je možné najít také zprávy o detekci salmonel ve vzorcích zevního prostředí.

Význam mají zejména dvě práce: Ivanova (1960) publikovala výsledky pokusů provedených sice ve vysloveně experimentálních podmínkách, přesto však dostatečně informativních. Vyplývá z nich mimo jiné, že intenzita fluorescence se s dobou přežívání salmonel v prostředí poměrně rychle snižuje — po 5 dnech je už slabá. Se snižováním fluorescence se do popředí dostává nespecifické fluoreskovaní různých částic (prachu apod.). Už při vyšetřování povrchů kontaminovaných před 48 hodinami bylo někdy obtížné oddiferencovat specifickou fluorescenci. I v této práci byla také pozorována nestejná intenzita fluorescence jednotlivých buněk kultury, kterou autorka považuje za projev nerovnoměrné tvorby antigenů; ojedinělé intenzivně fluoreskující mikroby bylo možné pozorovat i u antigenně vzdálených druhů.

Možnost použít FP k rychlé detekci salmonelové kontaminace prášku ze sušených vajec zkoušeli Haglund a ost. (1964). Autoři především ukázali rozhodující význam výběru sér. V předběžných pokusech zjistili, že anti-O séra dávají v imunofluorescenční reakci daleko více zkrřížených reakcí než anti-H séra (v nepřímé metodě byla používána globulinová frakce, vysycená čtyřmi různými kmeny *E. coli*). Pro praktické účely bylo připraveno „polyvalentní“ sérum proti antigenům 1 — 10, 12, 13, 15, 19, 22, 36, 46 a Vi jako směs přísně monovalentních sér (tzv. multisérum). Bez konkrétních údajů autoři konstatují, že některá komerční séra, ačkoli byla v reakci aglutinace zcela vyhovující, nebyla použitelná pro imunofluorescenční testy pro nízkou intenzitu specifické fluorescence.

Pokud jde o citlivost metody, v sérii srovnávacích pokusů byla těmito autory zjištěna možnost prokazovat ještě 0,03 salmonely/g výchozího materiálu; záchytnost kultivačních metod byla asi 0,06 salmonely/g. Úměrně tomu se podařilo prokázat salmonely pomocí FP v 10 ze 14 přirozeně kontaminovaných vzorků, kultivačně v 8 vzorcích. Podrobný popis půd používaných ke krátkodobé předkultivaci a ostatní technické otázky jsou uvedeny v práci.

Komentář

Přes rozdílné výsledky různých autorů je už dnes možné některé — zejména metodické — zkušenosti přece jen do určité míry zobecnit.

Nesporné je, že pomocí FP je možné detegovat různé antigenní frakce enterobakterií a že metoda je vysoce citlivá. Aplikace FP proto umožnila řešit některé závažné otázky patogeny i obecné mikrobiologie (význam výskytu *E. coli* v moči — Cotran 1963; patogeniza dyzentérie na morčatech — LaBrec a ost. 1959,

1960, 1961, na opicích — Vojno-Jaseneckij a Chavkin 1964; antigenní povaha jednotlivých izolovaných buněčných struktur — Michajlov a Stanislavskij 1963; způsob tvorby nové stěny a uložení antigenního materiálu — Cole 1963).

Pokud jde o vlastní diagnostiku je samozřejmé, že FP nemohou mít při nutně komplexním, biochemicko-sérologickém způsobu určování střevních patogenů jiné, samostatnější postavení než ostatní sérologické reakce. Přesto je při správném výběru a zpracování vzorků a při správném výběru séra rychlá diagnostika i detekce možná.

Pokud jde o materiál a jeho zpracování, preparáty přímo ze stolice ani z filtrátů nejsou vhodné. Nejlepší výsledky dává detekce ve smíšených primokulturách po několikahodinovém pomnožení, i když všechny aspekty účelné předkultivace dosud nejsou známy (Haglund a ost. např. zjistili, že glukóza v bujónu má zřetelně zeslabující účinek na intenzitu fluorescence a je třeba ji zaměnit manitem).

Rozhodující význam má příprava kvalitních sér s co nejužším spektrem protilátek. Popisované pozorování Haglunda a ost. o nevhodnosti některých komerčních sér znovu potvrzuje, že výsledky reakce aglutinace nejsou vždy směrodatné a že prověrka aktivity séra v nepřímé imunofluorescenční reakci by měla být nezbytným předpokladem, i když má být sérum použito pro přípravu konjugátu pro přímou metodu.

Téměř ve všech pracích se upozorňuje na nevhodnost polyvalentních sér. Pokud je pro praxi výhodné používat séra se širším spektrem, je třeba je připravovat jako směs vysycených, přísně specifických globulinů („multi-séra“). Velmi zajímavý je v této souvislosti údaj o specifčnosti anti-H protilátek v detekci salmonel. O významu anti-OB protilátek pro intenzitu specifické fluorescence EEC byla zmínka už dříve. Pro praxi našich laboratoří je významné zjištění možnosti používat k průkazu EEC (po předkultivaci, pomocí nepřímé imunofluorescenční metody) alespoň některá komerčně (ÚSOL) vyráběná typová séra (R. Kramář, v tisku); dosavadní práce však nepřekročila rámeček orientačních pokusů.

Pokud jde o prakticky významné, nejperspektivnější indikace k jejímu použití, je to dnes především:

— vyšetřování v epidemických ohniscích, kdy opakování nálezu zvyšuje jeho spolehlivost a kdy rychlost a citlivost i orientačního vyšetření má pro epidemiologa nesporný význam

— sledování dynamiky vylučování u osob léčených antibiotiky,

— detekce salmonel v krvi a žluči.

Literatura

- LaBrec E. H., Formal S. B., Schneider H.:* Bact. Proc., 1958 p. 135.
- LaBrec E. H., Formal S. B., Schneider H.:* J. Bact., 1959, 78:384.
- LaBrec E. H., Formal S. B.:* Bact. Proc., 1960, p. 133.
- LaBrec E. H., Formal S. B.:* J. Immunol., 1961, 87:562.
- Cherry W. B., Thomason B. M., Pomales-Lebrón A., Ewing W. H.:* Bull. Wld. Hlth. Org., 1961, 25:159.
- Cole R. M.:* Bact. Proc. 1963, p. 26.
- Cotran R. S., Thrupp L. D., Hajj S. N. a ost.:* J. Lab. Clin. Med., 1963, 61:987.
- Čuchlovin B. A., Ivanova S. P.:* Vojenno-Med. Žurnal, 1961, No. 9:55.
- Danielson D., Laurell G.:* Acta Paediatrica, 1961, 50:339.
- Daškovič I. O., Djakov S. I., Jermakov N. V., Ivanova M. T.:* Majboroda G. M., ŽMEI, 1959, No 1:97.
- Davis B. R., Ewing W. H.:* Am. J. Clin. Pathol., 1963, 39:198.
- Djakov S. I., Kasatkina P. V., Nikitin V. M., Pěstrakova Z. V.:* Gig. sanit., 1962, No. 7:59.
- Glezerov V. Z.:* ŽMEI, 1964, No. 8:136.
- Grabovskij P. M.:* a) Lab. dělo, 1961, No. 9:38.
- Grabovskij P. M.:* a) ŽMEI, 1961, No. 2:3.
- Haglund J. R., Ayres J. C., Paton A. M., Kraft A. A., Quinn L. Y.:* Appl. Microbiol., 1964, 12:447.
- Ivanova S. P.:* ŽMEI, 1960, No. 31:25.
- Ivanova S. P., Bočorišvili V. G.:* ŽMEI, 1963, No. 1:61.
- Jegorov V. I.:* ŽMEI, 1963, No. 11:146.
- Kabanova J. A., Mordvinova I. B., Kuzněcova N. S. a ost.:* ŽMEI, 1960 No. 31:30.
- Kožuško M. I., Kozar M. I., Margulis I. L.:* Vojenno-Med. Žurnal 1961, No. 9:57.
- Kulikova E. N., Bajman E. I., Kuzmina J. T. a ost.:* ŽMEI, 1963 No. 6:131.
- Mancini L., Scafi M., Rossi M., Beni G.:* Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1963, 39:175.
- Martineau B.,* Canad. Med. Ass. J., 1962, 87:947.
- Miroljubova L. V., Dvurečinskaja G. S.:* ŽMEI, 1962.No. 10:3.
- Miroljubova L. V.:* ŽMEI, 1962, No. 3:14.
- Michajlov I. F., Stanislavskij E. S.:* ŽMEI 1963 No. 6:74.
- Nelson J. D., Whitaker J.:* J. Padiat., 1960, 57:684.
- Nelson J. D., Whitaker J. A., Hempstead B., Harris M.:* JAMA, 1961, 176:110.
- Petuely F., Lindner G.,* Arch. Kinderheilk, 1958, 158:248.
- Stulberg C. S., Cohen F., Page R. H.:* Bact. Proc. 1960 p. 141.
- Styčinskij G. A.:* Lab. dělo, 1961, No. 12:23.
- Taylor C. E. D., Lea D. J., Heimer G. V., Thomlinson A. J. H.:* Proc. Roy. Soc. Med., 1963, 56:478.
- Thomason B. M., Cherry W. B., Moody M. D.:* J. Bact., 1957, 74:525.
- Thomason B. M., Cherry W. B., Edward P. R.:* Bact. Proc., 1958, p. 134.
- Thomason B. M., Cherry W. B., Ewing W. H.:* Bact. Proc., 1959 p. 90.
- Thomason B. M., Cherry W. B., Edwards P. R.:* J. Bacteriol., 1959 77:478.
- Thomason B. M., Cherry W. B.:* Bact. Proc., 1960, p. 142.
- Thomason B. M., Cherry W. B., Davis B. R., Pomales-Lebrón A.:* Bull. Wld. Hlth. Org., 1961, 25:137.
- Thomason B. M., Cherry W. B., Pomales-Lebrón A.:* Bull. Wld. Hlth. Org. 1961, 25:153.
- Thomason B. M., Boris M., Hines V. D., a ost.:* Bact. Proc., 1963, p. 89.
- Truant J. P.:* Bact. Proc. 1959, p. 90.
- Vojno-Jaseneckij M. V., Čavkin G. N.:* ŽMEI, 1964, No. 4:98.
- Wagner M., Unger H.:* Zblt. Bakt. 1. Abt., Orig, 1963, 189:482.
- Whitaker J., Page R. H., Stulberg C. S., Zuelzer W. W. A. M. A. J. Diseases Children,* 1958, 95:1.
- Zinověva I. S., Špagina M. K.:* ŽMEI 1962, No. 11:112.