

Z bakteriologicko-serologického ústavu prof. Dr. Honla.

# PŘÍSPĚVEK K DIAGNOSTICE MIKROBŮ STRIKTNĚ ANAEROBNÍCH.

Doc. Dr. FRANT. PATOČKA.

*Zvláštní otisk*

z „ČASOPISU LÉKAŘŮ ČESKÝCH“

čís. 16, roč. 1936.



V PRAZE 1936.

NÁKLADEM VLASTNÍM. TISKEM Dra ED. GRÉGRA A SYNA V PRAZE.

# Příspěvek k diagnostice mikrobů striktně anaerobních.

Doc. dr. FRANT. PATOČKA.

Z bakteriologicko-serologického ústavu prof. dra Honla.

Jest známo každému mikrobiologovi, který se s odvahou pustil do tohoto poměrně nevděčného odvětví bakteriologie, že diagnostika anaerobních mikrobů, přes to, že již dosáhla vynikajícího stupně dokonalosti, naráží stále na určité obtíže. Že je v zásadě možná, podobně jako u pathogenních mikrobů aerobních, dokázal svým výborným schematem na př. Zeissler; proč však zůstává stále těžko řešitelným problémem v méně specialisovaných laboratořích, to hodláme níže podrobněji rozebrati.

Nebudeme se zde šířiti o vědecké klasifikaci striktních anaerobů, která ostatně není definitivní a při které denně jsme svědky té zkušenosti, že jednak přibývají nové druhy, jednak jsou staré a doposud rozdílné indentifikovány jako varianty téhož druhu. Vedeni účely diagnostickými a klinickou praksí, dělíme pravidelně anaerobní infekce do tří skupin.

1. Skupina první obsahuje anaerobní infekce, vyvolané mikroby pouze toxickými. Sem patří bacillus tetani a bacillus botulinus. Tyto dva bacily patří mezi nejlépe prostudované i co do svých vlastností biologických, i co do kultivační diagnostiky.

2. Druhá skupina onemocnění je vyvolána mikrobami, které jsou známy jako vyvolatelé t. zv. anaerobních traumatos (název podle Weinberga, shrnující

pojmy starší, jako je plynová flegmona, maligní oedem, plynová gangrena). Jejich pathogenní účinek je charakterisován dvojím způsobem: jednak jako u předchozích produkcí specifického toxinu, jednak tím, že se chovají jako mikroby virulentní, t.j., že aktivně pronikají do hloubky tkání, zejména tkáně svalové a zde se ohromně rozmnožují. Některé z nich mohou dokonce pronikati i do krevního oběhu a vyvolávati obraz foudroyantní sepse.

3. Anaerobní infekce, vyvolané mikroby nesporujícími, které jsou pravděpodobně obdařeny virulencí nesmírně kolísavou, takže je můžeme považovati podle Gotschlichova termínu za tak zv. přiležitostné vyvolavatele onemocnění. Na rozdíl od mikrobů ze dvou skupin předcházejících, které patří mezi ubikvitérní, namnoze telurické zárodky, jsou tyto poslední velmi pravděpodobně obligátními parasyti lidskými a zvířecími, i když se jejich pathogenní vlastnosti projeví pouze za určitých, nám blíže neznámých podmínek (pravděpodobně na terénu zvláštním způsobem disponovaném). Velmi mnohé z nich jsou v experimentu na zvířeti naprostě nepathogenní, takže právě zde jsme omezeni často pouze na diagnostiku kultivační a i tato je velmi ztížena velikou jejich náročností na kultivační prostředí, často abnormální citlivostí na ky slík a minimální resistencí proti zevním škodlivým podmínkám. Vytvoření třetí skupiny je zcela umělé, neboť jednotlivé mikroby sem patřící přináležejí do nejrůznějších rodů, případně i čeledí, takže tato nemá s vědeckou systematikou bakteriologickou nic společného.

Z právě uvedeného, pro praktickou potřebu konstruovaného rozdělení striktně anaerobních mikrobů, vyplývá první poznatek pro možnosti kultivační diagnostiky. Zárodky z prvních dvou skupin, jakožto sporulující a poměrně expansivně rostoucí, lze vypěstovati a identifikovati poměrně snadno. Po-

sledně zmíněné se isolují v čistých kulturách ne-poměrně tíže a stejně nesnadná je jejich identifikace.

Nepokládáme-li techniku anaerobní kultivace již samu o sobě za nesnadnou proto, že je málo vžitá, narázíme ještě na řadu dalších obtíží. Prvá z nich jest ta, že nemáme dosud vlastně standardní universální půdy, na které by se alespoň většina anaerobních zárodků dala vyisolovati. Druhá nesnáz spočívá v methodice odstranění kyslíku z kultivačního prostředí, která se děje téměř v každé laboratoři jiným způsobem. Třetí nesnáz jest výslednicí obou předcházejících. Popis kultivačních vlastností různých anaerobních mikrobů je odlišný podle toho, jaké methodiky kultivace bylo použito. Pouhé přidání glykosy ke krevní plotně může změnit kultivační charakter některého mikroba tak dalece, že by tento téměř nemohl být diagnostikován autorem, užívajícím též půdy, ale bez glykosy. Markantním příkladem jest tvorba kolonií bacila plynové flegmony na plotně podle Zeisslera a na plotně Fortnerově. A konečně poznáváme stále jasněji, že určité druhy anaerobů, zejména ty ze třetí skupiny, mají přečetné varianty v literatuře buď nedokonalé, nebo vůbec nezaznamenané, což zvyšuje diagnostickou nejistotu, ba dokonce i pro začátečníka činí ji někdy nemožnou.

Jak viděti z předcházejícího, je pocitována velmi silně při laboratorní diagnostice anaerobů potřeba standardních metod kultivačních, která by alespoň zčásti odpomohla dosud těžko překonatelným diagnostickým obtížím. Kdyby se povedla, měla by mimo čistě praktickou stránku i velikou cenu vědeckou, neboť by určitě zvýšila zájem o hlubší studium této dosti nevděčné, ale velmi důležité části mikrobiologie, přispěla by nesmírně k jejímu obohacení o nové druhy a k definitivnímu objas-

nění některých, dosud naprosto záhadných kapitol. Pokusili jsme se o tuto standardisaci v laboratořích bakteriologického ústavu prof. Honla, při čemž jsme se pochopitelně snažili použíti jen takových method, které snadnou proveditelností a nepatrnu nákladností byly by přístupné i méně zámožným laboratořím. Výsledky svých laboratorních, systematicky sbíraných zkušeností, zde stručně podáváme. K vůli úplnosti podotýkáme, že některé druhy anaerobních mikrobů jsme neměli příležitost isolovati sami z pathologických produktů, takže jsme byli nuceni si je opatřiti z odborných laboratoří v Paříži nebo v Berlíně, při čemž jsme si znova ověřili svoji starou zkušenosť, že některé méně známé anaeroby jsou i ve vynikajících laboratořích různě identifikovány.

Po několikaletých zkušenostech setrváváme na použití následujících kultivačních půd:

Především je to bouillon se zvířecími játry sterilovanými (nikoliv čerstvými, jako klasická půda Tarozziho), který slouží k předběžnému pomnožení mikrobů v případě, kdy je jich v pathologickém produktu velmi málo. Za účelem zvýšení jeho výživnosti pro mikroby zvláště citlivé, přidáváme k němu formolisované sterilní koňské serum a extrakt z krvinek (podle Legrouxe), řidčeji glykosu. Pouze v ojedinělých případech zvláště citlivých leptotrich, nebo u bacilů fusiformních byli jsme nuceni přidati několik ccm čerstvé králičí krve. Bouillon má být před použitím čerstvě převařen a schlazen, k uzávěru je vhodná pouze zátka ze sterilní americké vaseliny. Též půdy jsme používali k pomnožení již vypěstované čisté kultury, k produkcii toxinů, za účelem studia produkce plynu (vaselinová zátka je vytlačována vzhůru) a vůbec ke studiu kultivačních charakterů v půdě tektuté. Ke studiu proteolytických vlastností užíváme játrové želatiny, ve které se kultivuje při tem-

peratuře 37°, opět pod vaselinovou zátkou, s následovným ochlazením v ledničce. Třetí identifikační půdou je játrové mléko, vhodné pro poznání fermentů srážejících, po případě peptonifikujících kasein. Ke studiu sacharolytických vlastností se přirozeně bouillon s játry nehodí, neboť obsahuje vždycky glykogen, případně glykosu z jater, proto v těchto případech naléváme cukru zbavený bouillon do zkumavek, na jejichž dno se vkládá kostka koagulovaného bílku vaječného a k němuž se dále přidává asi 1 platinová klička sterilního magnesium sulfitu. Tato zkumavka jest uzavřena gumovou zátkou, kterou prochází skleněná rourka, uprostřed zúžená. Po nakultivování se rourka zapne na vodní pumpu nebo vývěvu a po dosažení vakua určitého stupně se skleněná rourka v zúženém místě zataví. Indikátor nepřidáváme hned před početím kultivace, neboť bývá v anaerobním prostředí redukčními pochody odbaven. Po několika dnech kulturu otvíráme a jako indikátor přikapáváme bromthymolovou modř. Současně s naokováním do bouillonu za účelem pomnožení, nebo když jsme již předběžného pomnožení docílili, zakládáme kulturu na Fortnerově plotně, kterou po kládáme za nejjednodušší, nejlevnější a nejúspěšnější praktickou methodu pro kultivaci anaerobů v povrchových koloniích. Pravidelně jsme vystačili s plotnami, obsahujícími 10% celé králičí krve. Pro některé, zvláště citlivé anaeroby, zejména leptotrichy a bacily fusiformní, jsme museli zvýšit kvantum krve na 15%. Nemáme-li náhodou dostatek králíků, můžeme s výhodou modifikovat Fortnerovu plotnu tím způsobem, že k obyčejnému agaru přidáváme formolisované serum koňské a defibrinovanou lidskou krev. Tato naše modifikace Fortnerovy půdy se ukázala téměř stejně dobrou, jako metoda originální. Chceme-li míti průhledné kultivační prostředí, čehož jest pouze výjimečně

zapotřebí, přidáme k 1% glykosového agaru formolované koňské serum a asi 30 kapek extraktu z červených krvinek připravených podle methody Legrouxovy. Tato kultivační půda jest sice již mnohem méně výživná, nežli předcházející, také její redukční potencial je o něco nižší, ale pro mnohé případy zcela vyhovuje. Pohyblivost anaerobních mikrobů, jejich vzrůst a případně tvorbu spor sledujeme s úspěchem v mikrokulturách Fortnerových, ve vyhloubeném sklíčku podložním. Pouze výjimečně užíváme také Veillonova agaru, a to hlavně ve dvou případech. Po prvé tam, kde se chceme rychle orientovati jsou-li mikroby v určitém materiálu striktními nebo fakultativními anaeroby. To, co nám nemůže bez bližšího rozboru říci povrchová kultura, dovíme se během 48 hodin z přítomnosti nebo nedostatku sterilní povrchové zony v této půdě. Za druhé jsme nutni použít tohoto poměrně primitivního způsobu kultivace v těch případech, kde nám běží o identifikaci některého anaeroba, který je popsán pouze francouzskými autory, kteří i v novější době důsledně užívají k popisu hlubkových kolonií ve Veillonově agaru. Použitím těchto několika metod velmi jednoduchých, přístupných každé laboratoři bez výjimky, podařilo se nám vypěstovati a identifikovati většinu běžných a celou řadu méně známých, nebo docela neznámých anaerobů, takže jsme klidně mohli opustiti všechny zastaralé a nepraktické methody, jako je metoda Buchnerova nebo metody s vakuem pod různými zvony, začasté ohromných rozměrů. Stejně tak jsme nepotřebovali zaváděti některé metody nové, velmi dobré, jako je centrální katalytická stanice Božzova nebo metoda Zeisslerova s použitím Pfeiffrovy pumpy, které všechny mají dvě společné nevýhody: jednak vyžadují velmi dražích aparátů, jednak, aby se jejich provoz vyplatil, musí být kultivována celá spousta ploten na-

jednou, což vylučuje individuelní zacházení s každou kulturou zvláště, podle potřeby. Máme dojem, že stejně jako my jsme vystačili s těmito několika málo jednoduchými methodami, které pokládáme pro naši laboratoř za standardní, mohly by tyto býti snadno adoptovány jinými laboratořemi u nás, i nejskromněji zařízenými. Pro ty, kteří by tak skutečně chtěli učiniti, předkládáme stručný přehled kultivačních symptomů podle svých zkušeností v naději, že by mohly býti základem, který by pomohl méně zkušenému přes nejobtížnější začátky.

Počneme s mikroby z prve skupiny podle našeho rozdělení. Naše zkušenosti se opíraly o studium dvou kmenů bacila tetanu z cizích laboratoří ( jeden z Weinbergovy v Paříži, druhý z Kochova ústavu v Berlíně) a o několik kmenů isolovaných námi z půdy. Všechny kmeny námi pozorované, vyrůstaly na Fortnerově plotně ve formě šířícího se povlaku, který během 48 hodin kultivačních, v některých případech až 3 dnů, povléká stejnoměrným, jako by lehce granulovaným závojem volnou část Fortnerovy plotny. Pokud povlak není kompletní, vyrůstají na jeho periferii velmi jemné, někdy pouze lupou viditelné výběžky. Některé z námi zkoušených kmenů, které vytvářely povlak na Fortnerově plotně, vyrůstaly na glykososerumagarové plotně s extraktem z krvinek, jak byla shora popsána, ve formě velmi jemných uzavřených kolonií s věncem periferních vlakének. Je to jeden z markantních důkazů nesnází, o kterých jsme se zmínili: týž kmen na různých půdách vyrůstá způsobem naprosto odlišným; odtud ta nesourodost popisu v literatuře. Hemolysa na Fortnerově plotně u různých kmenů jest nesmírně různá. Od téměř neznatelné, až k viditelně patrné již po 24 hodinách, ale téměř vždycky slabší, nežli u stejně rostoucího bacila maligního oedemu. Isolace mikroba

v čisté kultuře z jakéhokoliv materiálu jest jednou z nejlehčích, neboť lze využíti jednak resistance jeho spor k zničení jej doprovázejících nesporujících bakterií, jednak (což jsme zvláště využívali) jeho schopnosti expansivně se rozlézati po povrchu půd. Stačí naočkovati kapku bouillonu, v němž byl mikrob předběžně rozmnožen, na jeden okraj Fortnerovy plotny a během necelých 48 hodin můžeme z druhého konce rozrůstajícího se povlaku vyisolovati bacila v téměř čisté kultuře. Několikerým opakováním této procedury se vyčistí úplně. Z ostatních kultivačních znaků, kterými lze doplniti diagnostu, zdůrazňujeme poměrně malou schopnost tvořiti plyny v tekutých půdách, ve většině případů nepříliš intensivní zkálení bouillonu během prvních 48 hodin, rychlé zkapalnění želatiny, pomalou a často neúplnou koagulaci mléka a buď minimální nebo vůbec žádné vlastnosti sacharolytické. Ve Veillonově agaru pod sterilní aerogenní zonou se vytvářejí málo masivní kolonie, které lze nejlépe přirovnati k bílým hlavicím odkvetlé pam-pelišky.

Druhým mikrobiem z téže skupiny jest bacillus botulinus. Neměli jsme příležitosti isolovati žádny kmen vlastní, podáváme tedy pouze stručný popis několika kmenů cizích a sice dvou serologických typů A, jednoho B, jednoho typu serologicky neurčeného a jednoho z berlínské laboratoře, označeného jako clostridium parabotulinum. Výsledkem našich studií jest poznatek, že pouze kultivační diagnostika bacila botulina a jeho variant není možná. Je vždy nutno připojiti experiment na zvířeti, případně agglutinační reakci. Za charakteristický tvar povrchových kolonií bývá pravidelně uváděna forma uzavřených kolonií s četnými výběžky, rozbíhajícími se na různé strany, které, jak Zeissler zdůrazňuje, mají býti dvojitě konturovány. Tvorbu těchto kolonií, které na Fortnerově plot-

ně konturami připomínají na první pohled značně kolonie bacila anthraxu (jsou ovšem průhledné nebo alespoň silně průsvitné a chybí jim velurovaný povrch) jsme pozorovali pouze v jednom z našich případů. Kolonie byly obdány lehkým hemolytickým dvorcem. V jednom případě se vytvářely okrouhlé, necharakteristické kolonie, které považujeme za S formu bacila botulina. Oba právě popsané druhy byly minimálně toxicke hned s počátku a během doby jejich toxicita poklesla téměř na nulu. Zbývající, silně toxicke kmen botulinu A a bacillus parabotulinus, vytvářely na Fortnerově plotně homogenní povlaky, ale mnohem hutněji a rychleji se rozrůstající, nežli bacillus tetani. Tuto zvláštní vzrůstovou formu, která nebývá pravidelně popisována, si nedovedeme dobře vysvětliti. Pokládáme za zcela možno, že byly oba kmény znečištěny nějakým saprofytickým sporulujícím anaerobem, kterého se nám nepodařilo ani při nejpečlivějších isolačních pokusech od původní kultury odděliti. Silná toxicita obou kmén svědčí však o tom, že i v těchto případech byl bacillus botulinus v kulturách, když už ne docela čistý, tedy aspoň v naprosté převaze. Kultivační symptomy na ostatních, námi adoptovaných půdách odpovídají běžným popisům v literatuře a i jinak jsou tak dalece necharakteristické, že nemají zvláštní ceny.

Poměrně nejlépe se diagnostikují sporulující anaerobionti ze skupiny druhé, ke kterým připojíme několik druhů sice nepathogenních, většinou pouze putriditu vyvolávajících mikrobů, které však jsou velmi často s předcházejícími sdruženy a které se nám podařilo vypěstovati z nejrůznějších pathologických produktů, jako sekundární bakteriální agens. Nejčastějším anaerobem vůbec a současně také nejlépe diagnostikovatelným, jest bacil plynové flegmony. V tekuté půdě lze ho často di-

agnostikovati již po 7 hodinách. Patří mezi nejmo-  
hutnější producenty plynu z anaerobů vůbec, tak-  
že v případech urgentních troufáme si učiniti vel-  
mi pravděpodobnou diagnosu na základě přítomno-  
sti mohutných, grampositivních tyčinek ve zkale-  
ném a šumícím bouillonu, je-li současně vaselino-  
vá zátka plynem vytlačena až po okraj zkumavky.  
Nespěchá-li příliš diagnosa, kultivujeme na Fort-  
nerových plotnách, kde se vytvářejí obyčejně za  
necelých 48 hodin téměř průhledné, okrouhlé koloni-  
lie, podobné mladým koloniím bacila tyfu, ale  
obyčejně klenutější a mukosnější. Co je zvláště ty-  
pické, je široký, hemolytický dvorec, obklopující  
kolonie do vzdálenosti alespoň 1 cm, který je le-  
mován obyčejně na své periferii zvláštním, inten-  
sivně nachově červeným proužkem. Vzhled této  
kultury je tak nápadný a vzrůstové schopnosti mi-  
kroba tak mohutné, že jeho vypěstování a diagnosa  
je naprostě snadná i pro začátečníka. Uváděti  
ostatní kultivační charaktery je téměř zbytečné.  
Vypěstovali jsme ho během posledních let mnoho  
desítek kmenů z nejrůznějšího materiálu a pouze  
ve zcela ojedinělých případech jsme se setkali  
s kulturami poněkud atypickými, patrně R forma-  
mi tohoto mikroba, kde kolonie byly ploché, na po-  
vrchu jako rozbrázděné, s okraji nepravidelnými —  
podobné formy byly popsány v poslední době  
několikrát v literatuře Fortnerem, Verderem a j.,  
pro praktickou diagnostiku jsou však téměř bez-  
významné. Jsme oprávněni ze svých četných zku-  
šeností zdůraznit fakt, že kultivační diagnostika  
tohoto mikroba jest mnohem spolehlivější, nežli  
experiment na zvířeti, který u polosaprofytických  
kmenů často selhává. Mohutná tvorba plynu, která  
jest nejdůležitějším vodítkem při kultivaci v játrovém bouillonu, může být značně omezena,  
je-li mikrob sdružen s jinými bakteriemi, zejména  
s bacteriem coli a proteem.

Druhým nejčastějším z pathogenních anaerobů této skupiny je Novyho bacil maligního oedemu, mikrob, který je pravděpodobně identický s Weinbergovým bacilem oedematiens a jehož variantami jsou asi *bacillus Sordellii* a *bacillus gigas*. Studovali jsme ho na třech kulturách cizích a jedné kultuře vlastní. Na Fortnerově plotně vytváří průhledné kolonie s výběžky, takže se značně podobá shora po- psanému typu bacila botulina, bývá však jemnější, výběžky se expansivněji rozrůstají a kolonie jsou vždycky obklopeny zřetelným hemolytickým dvorem. U jednoho kmene jsme pozorovali odštěp kulatých S forem bez výběžků. Je mikrobem málo plynnotvorným, za velmi charakteristický symptom v tekutých půdách i ve zkapalněné želatině pokládáme ve shodě s literaturou tu okolnost, že se iniciální zákal, dosti lehký, mění v charakteristické vločky, podobné vločkám při makroskopické agglutinaci, které poměrně rychle sedimentují. Dosti charakteristický je jeho vzrůst ve Veillonově agaru, kde se vytvářejí poměrně masivní, tmavší a nevelké kolonie s nepravidelnými a řídkými periferními výběžky, které jsou ovšem mnohem hutnější, kratší a řidší, nežli na př. u bacila tetanu. Tento mikrob sám i druhy jemu blízce příbuzné se dají diagnostikovat kultivačně s velikou pravděpodobností, ale na rozdíl od bacila plynové flegmony nutno diagnosu doplniti experimentem na zvířeti.

Třetím co do hojnosti jest v anaerobních traumatosách podle udání většiny autorů *bacillus histolyticus*. Neměli jsme dosud příležitosti ho isolovati a proto podáváme popis kultivačních symptomů podle tří různých kmenů z francouzských a německých laboratoří, jak byly získány na námi adoptovaných kultivačních půdách. První, co jsme konstatovali, bylo, že žádný z oněch kmenů se kultivačně neshodoval příliš s klasickým popisem Zeisslerova schematu, zejména jsme nikdy neviděli, že

by kolonie byly usazeny pod niveau kultivační půdy. Kultura jest s počátku průhledná, později se lehce do šediva kalí. Kolonie jsou zhruba dvojího typu. Jedny spíše S charakteru, rozměrů asi mladé kolonie meningokokka, hladkých okrajů, těch však jest mnohem méně. Většinou se vytvářejí kolonie kontur nepravidelných až zubatých, mírně nepravidelného povrchu s krátkými, tupými nebo až okrouhlými výběžky. Hemolysa jest většinou nepatrná. Je docela možno, že atypičnost kultur byla podmíněna tím, že šlo většinou o kmeny staré, dlouho chované v laboratoři. Produkce plynu jest prostřední, bouillon bývá silně zkalen, želatina ohromně rychle zkapalňována. Velmi charakteristické jest chování v mléce, které je již během 24 hodin peptonifikováno. Ve starších kulturách nastává rozpad kousků jater. Ve Veillonově agaru se vytvářejí poměrně malé, okrouhlé kolonie, dosti pravidelných kontur. Celkem možno říci, že kultivační symptomy jsou příliš málo charakteristické, nežli aby samy o sobě stačily k diagnose. Za to dosti typický jest mikroskopický obraz kultur, ale i tak je možno učiniti splehlivou diagnosu pouze ve spojení s experimentem na zvířeti. V celku možno říci, že diagnostika tohoto mikroba ze směsi jiných mikrobů může být jednou z nejtěžších.

Poměrně nejvíce vzácným, ale nejnebezpečnějším jest poslední z pathogenních anaerobů této skupiny. Je to klasický bacil maligního oedemu čili Pasteurův vibrio septique. Studovali jsme ho celkem na třech kmenech cizích a jednom kmeni našem, který se nám podařilo vypěstovati z orgánu člověka, zemřelého na plynovou flegmonu a pitvaného v pathologicko-anatomickém ústavu prof. Kimly. U všech kmenů byly symptomy kultivační stejně. Na Fortnerově plotně je vzhled nápadně podobný onomu, který jsme popsali u bacila tetanu. Jelikož mikrob na této půdě rychle

sporuluje, je možno resistence jeho spor i schopnosti tvořiti plazivé povlaky použíti snadno k získání čistých kultur. Je ovšem nutno si uvědomiti, že jeho spory nejsou tak odolné jako u bacila tetanu. Je-li mezi nimi na Fortnerově půdě nějaký rozdíl, spočívá hlavně v tom, že bacil maligního oedemu pravidelněji a mohutněji hemolysuje a že výběžky, které jsou vysílány jako předvoj z postupujícího, souvislého povlaku, jsou mnohem zřetelnější. Z pathogenních anaerobiontů se zdá být bacil maligního oedemu po bacilu plynové flegmony nejmohutnějším producentem plynu. V této okolnosti, dále v silném zkalení bouillonu, rychlém zkapalnění želatiny, spočívá další jeho rozdíl od bacila tetanu. Rovněž srážení mléka jest mohutnější a odlišná je i tvorba kolonií ve Veillonově agaru, které mají sice ostnatou periferii, ale jsou v celku hutnější, kompaktnější a na periferii méně bohaté. Experiment na zvířeti pak snadno potvrdí diagnostiku, která je již z nálezu kultivačního vysoce pravděpodobná.

Ze sporulujících anaerobiontů nepathogenních, které jsme přiřadili k této druhé skupině pro jejich časté vyskytování se v anaerobních traumatosách i v nejrůznějších flegmonosních a nekrotických procesech, na př. při ulcerosních anginách, při těžkých difteriích a při gangrenosních appendicitidách, popíšeme pouze ty, které jsme sami častěji vyisolovali. V prvé řadě jest to bacillus sporogenes, který jest považován za nejčastějšího ze sporulujících putridních anaerobiontů. Vyrůstá téměř tak snadno jako bacil plynové flegmony, obyčejně ho však bývá v pathologickém produktu mnohem méně, takže se doporučuje předběžné pomnožení v játrovém bouillonu. Na Fortnerově plotně vytváří charakteristické kolonie kompaktní a téměř neprůhledné, obyčejně s věncem periferních vlakánek, které jsou však na rozdíl od výběžků,

pozorovaných u botulina, a oedematiense nápadně jasné a dosti krátké. Nedají se tedy jeho kultury s předcházejícími zaměnit. Jestliže jsme srovnali ony prvé s mladými a průhlednými kulturami bacila anthraxu, podobají se kolonie tohoto spíše hrubému tělu nějakého ornithodora, s jemnými a ovšem přespočetnými nožičkami. Nápadným znakem je přesně ohrazený, ale pouze několik milimetrů široký a světle zlatý hemolytický dvorec, který obklopuje kolonii jako by aureolou. Zde ovšem odpadá možnost diagnostiky experimentální, lze ji však snadno doplnit z rychlé tvorby charakteristických spor, dále z význačných proteolytických vlastností, mohutné produkce plynu (asi jako u bacila plynové flegmony), z koagulace a následné rychlé peptonifikace mléka a konečně ze zčernání a rozpadu jater v tekutých půdách.

Druhým mikrobem, který byl ještě častěji nalezen, nežli bacillus sporogenes, byla rychle sporující tyčinka, kterou jsme na základě některých shodných kultivač. symptomů nuceni považovat buď za identickou nebo blízce příbuznou s mikrobem, kterého Zeissler označuje jako bacillus pterificus tenuis. Tento bacil v málo odchylných variantách byl námi isolován celkem 8krát, naposledy z rychle smrtící flegmony na krku, vzniklé po operaci, kde byl sdružen s hemolytickým streptokokkem. Na Fortnerově plotně vyrůstá ve formě, která jest něčím mezi uzavřenou kolonií s výběžky a mezi souvislým povlakem, jako je na př. u maligního oedemu. Je-li naočkován na jedno místo Fortnerovy plotny, rozrůstá se odtud v jazykovitých výběžcích, obyčejně tupě zakončených. Naočkujeme-li ho v čáře, vyrůstají na obou místech od centrální partie opět výběžky, podobné trochu výběžkům u bacila oedematiense, ale tupěji zakončené a úplně ploché, které probíhají určitou dobu paralelně až

pak se ve vzdálenosti  $\frac{1}{2}$  až 1 cm od centrálního povlaku spojují. Je tedy tento mikrob kultivačně odlišný od onoho, kterého Zeissler popisuje jako *bacillus putrificus tenuis*, zdá se nám však, že to může být způsobeno odlišnými vlastnostmi Fortnerovy plotny od Zeisslerova způsobu kultivace. Ve Veillonově agaru vyrůstá ve formě hnědých, hrudkovitých kolonií s nepravidelným povrchem. Ostatní znaky, t. j. poměrně malá tvorba plynů, vlastnosti proteolytické, mohutné zkalení játrového bouillonu a poměrně rychlá tvorba spor svědčí o tom, že je námi učiněná diagnosa nejpravděpodobnější, nechceme-li předpokládati, že se jedná o nový druh, doposud blíže nepopsaný. Mikrob tento jest značně striktně anaerobním, u zvířat vyvolává pouze lehký oedem, který za dva dny pomíjí, i když byl očkován ve veliké dávce. Velmi pozoruhodným jest fakt, že byl námi nalezen vždycky pouze v pathologických produktech (gangrenosní apendicitidy, ulcerace na tonsilách a případ shora popsaný), takže není vyloučeno, že zesiluje účinek některých mikrobů pyogenních. Ostatně nepokládáme studium tohoto mikroba za ukončené, upozorňujeme na něho zejména proto, že jeho výskyt se nám zdá být poměrně častý a že tedy zhusta může přijít v úvahu při diferenciální diagnostice.

Skupina třetí skýtá, jak již několikrát zdůrazněno, největší diagnostické obtíže. Jelikož právě zde je systémové zařazení, diagnosa a často i pojmenování mikroba podrobeno nejvíce libovůli jednotlivých autorů, nebude se těmito mikroby zabývat soustavně, nýbrž popíšeme pouze ty, které jsme sami isolovali. Aby si čtoucí učinil představu o tom, o kterých mikrobech se zde bude pojednávat (zdůrazňujeme znovu, že vedení pouze praktickým stanoviskem a bez ohledu na jakoukoliv systematiku) vyjmenujeme alespoň ty, které jsou nejčastější. Především sem řadíme všechny

striktně anaerobní streptokokky a od nich odlišný druh putriditu vyvolávající, t. zv. streptokokkus putridus. O něco vzácnějšími jsou některé striktně anaerobní mikrokokky. Francouzskými autory jest zhusta uváděn grampositivní *bacillus ramosus*, difterii podobná tyčinka, někdy až vláknitého tvaru, o které jsme byli již delší dobu přesvědčeni, zejména na základě nálezů kultivačních, že jednak není zvláštním druhem bakteriálním, za druhé, že jest spíše mikroaerofilním, nežli striktně anaerobním, takže ho považujeme za jednu z přečetných odrůd mikroaerofilních aktinomyct. Zdá se ostatně, že v novější době i francouzští autoři se přiklánějí k tomuto stanovisku (Nattam-Larier). — Z gramnegativních tyčinek jsou popisovány hlavně dvě: *bacillus fragilis*, jemný mikrob, jehož patogenita pro morče podle udání některých autorů má být velmi charakteristická a téměř pravidelně se vyskytující a bacil Schmorlův s nehomogenně se barvícím protoplasmatem, produkující toxické látky v kulturách, který je důležitý hlavně pro patologii veterinární, ale příležitostně (na př. v erosivních balanitidách) byl nalezen i u člověka. Jedněmi z nejdůležitějších a nejčastěji se vyskytujícími jsou četné druhy bacilů fusiformních, jichž patogenitu (shodně s Ginsem) pro člověka pokládáme, alespoň v některých případech, za prokázanou, ačkoliv jsme neměli možnost jako tento autor, vyvolati čistými kulturami zřetelně pathologické symptomy u zvířat. S posledně jmenovanými téměř konstatně jsou sdruženy nejrozličnější druhy spiril a spirochaet, jejichž úloha zůstává velmi nevyjasněna. Velmi zajímavými a těžko kultivovatelnými jsou vláknité bakterie z genus *leptothrichia* v největším množství přítomné při pathologických procesech v dutině ústní, které však lze dokázati i jinde v zažívacím traktu, na př. ve šfávě duodenální a při appendicitidách. Tyto jsou jistě v převážné

většině případů saprofyty, ovšem nesmírně intimně adaptovanými na lidský organismus, zejména na tkáně, nacházející se v nekrobiose (odtud jejich veliká náročnost na kultivační prostředí), lze však nalézti ojedinělé případy v literatuře a sami jsme se o tom přesvědčili na případu popsaném Obrtem a námi, že mohou vyvolávat benigní sice, ale therapeuticky velmi těžko ovlivnitelné, lokalisované pathologické procesy. Z nověji popsaných bakterií lze sem počítati bacila Budayova, který se zdá být příbuzným dříve popsanému bacilu funduliformis. Konečně popíšeme mikroba, kterého sice nepovažujeme ani za příležitostně patogenního, kterého však kultivujeme tak často, jehož kultivační charakterystika jsou tak nápadné a který svým mohutným vzhledem často znemožňuje existenci anaerobů citlivějších, že pokládáme za důležité s ním čtenáře seznámiti. Je to tak zvaný bacillus melaninogenes.

Počneme s popisem tohoto posledního mikroba, jelikož je daleko nejčastější a nejnápadnější ze všech nesporulujících anaerobů. Můžeme téměř říci, že jest výjimkou, když ho nevypěstujeme z nějakého materiálu, obsahujícího anaerobní floru, ať již jde o putridní hnis jakékoliv provenience, o materiál z appendicitidy, o nekrotickou tonsilitidu, paradentosy atd. Mikroskopicky se nám jeví jako jemná, gramnegativní tyčinka jen o málo větších rozměrů, nežli Pfeiffrov bacil. Jeho kultura prvé dva až tři dny je naprostoto nenápadná, od této doby počínají se vytvářeti smolně černé, někdy kovově lesklé kolonie, s počátku okrouhlé, buď tuhé konsistence, nebo kašovitého charakteru (podobné nakupeninám dehtu), které mívají v průměru 2 až 3 mil. a pod nimiž mizí všechna ostatní flora bakteriální. Soudě podle zážitků pozorovaných kultivačních charakterů, má celou řadu odrůd. Pokud jsme zkoušeli jeho patogenitu na zvířeti, i po vstřiku-

vání velkých dávek, ukázal se býti vždycky ne-pathogenním. O jeho biologickém významu nevíme dosud nie. Hodláme všechny tyto jeho vlastnosti podrobiti podrobnému výzkumu.

Popis bacila ramosa podle shora řečeného, ne-spadá do rámce tohoto pojednání. S mikrobem, kte-reho podle morfologicky a některých kultivačních charakterů pokládáme za bacterium fragilis, se setkáváme dosti často, zejména při nejrůznějších putridních afekcích, jejichž východištěm je střevní trakt. Žádný však z těchto mikrobů neměl patho-genních vlastností pro zvíře, jak bývají v literatu-ře někdy zaznamenány. Nemůžeme tedy pokládati jeho studium pro sebe za ukončené. Na Fortnerově plotně vytváří necharakteristické, kulaté kolonie, bez hemolysy, ostatní jeho symptomy nevykazují nic typického, leda snad to, že jeho kultury velmi rychle zacházejí. S bacilem Schmorlovým jsme se dosud nesetkali.

Těžkým kultivačním problémem jsou bacily fusi-formní. Jednak proto, že jsou velmi náročné na kultivační prostředí (na př. k játrovému bouillonu je nutno přidati nativní serum, velmi často extrakt z krvinek nebo celou krev), za druhé alespoň ně-které druhy jsou tak abnormálně citlivé na kyslík vzdušný, že i na Fortnerově plotně vyrůstají pouze v čáře, která je nejbližší k vrstvě bacila prodigiosa. Kultivační místa blíže skleněných okrajů misky obsahují mikroby úplně degenerované, těžko se barvící a jako by rozteklé, které začasté již nelze přeočkovati. Obvykle vyrůstá pomalu, nejdříve za 4-5 kultivačních dnů. Fusiformní bacily, které jsme sami vypěstovali v poslední době (celkem 5 kultur). můžeme rozděliti do dvou skupin. Prvá skupinna vyrůstá v uzavřených, kulatých koloniích, které ve dvou případech byly téměř průhledné a jemné, v jednom případě masivní, neprůhledné, zvláštní, mazlavé konsistence, které se daly emulgovati

pouze za tvorby jakoby hlenovitých vloček. V játovém bouillonu se serem lze pozorovat obyčejně lehkou tvorbu plynu a zákal, který však, jak jsme se dodatečně přesvědčili, pochází z pozvolna koagulovaného sera. Druh posledně popsáný se nám nepodařilo vůbec přiměti ke zřetelnému vyrůstu na tekutých půdách. Druhá skupina námi pěstovaných fusiformních bacilů (celkem dva kmeny), se naprosto liší od toho, co bylo dosud v literatuře popsáno. Vyrůstají totiž ve formě obláčkovitě jemných kolonií s četnými výběžky, které se pozvolna měnily v jemný povlak. Neměli jsme dlouho chuti tyto bacily považovati za fusiformní bacily, neboť jeden z nejlepších znalců této otázky Gins tvrdí, že tvorba povlaků stojí v přímém rozporu s diagnosou bacila fusiformního. Konečně jsme však byli nuceni při této diagnose vytrvat, neboť nejen že byly oba kmeny isolovány z materiálu, obsahujícího fusiformní bacily téměř v čisté kultuře, nýbrž i mikroskopicky se skládal povlak z tyčinek tak charakteristických, že by bylo nesmyslem vnucovali si jinou diagnostiku, pro kterou bychom neměli ostatně vůbec žádné opory. Jeden z těchto kmenů byl chován v laboratoři po dobu několika měsíců, během nichž ztratil pozvolna schopnost tvořiti rozlézající se povláčky, takže dnes vyrůstá v naprosto nepravidelných, vločkovitých koloniích neurčitých kontur. Žádný z námi pozorovaných kmenů nehemolysoval.

Spirily z fusospirilarní symbiosy, se nám podařilo vypěstovati pouze jednou. Vyrůstaly na periferii kolonií sekundární flory ve formě sotva viditelných obláček. Ačkoliv jsme je ihned přeočkovali, nevyrostly již ani na půdách, obsahujících 15% králičí krve.

O kultivačních symptomech pathogenních leptothrich jsme pojednali podrobně ve své práci s Obratem v »České Dermatologii« (roč. XV, seš. 8, 1935).

Nehodláme zde tam uvedená fakta opakovati. K vůli doplnění celého obrazu uvádíme, že se nám od té doby podařilo tyto mikroorganismy vyisolovati ještě několikráte z nejrůznějších nekrotických afekcí. Některé z nich odpovídaly kultivačnímu typu, který byl námi popsán jako *leptothrix A*. Zdá se tedy býti tento mikrob dosti častým saprofytem, eventuelně příležitostným parazitem člověka. Za nejzajímavější pokládáme ony druhy, které vytvářejí na Fortnerově plotně buď nepravidelné, nebo přesně kulovité konkávní jamky, které jsou povleklé tenkou vrstvičkou kultury. Jak dochází k tomuto negativnímu tvaru kolonií, nedovedeme si vůbec vysvětliti. Analogické kultivační symptomy jsme rovněž dosud nenašli popsány v literatuře.

Končíme popisem několika kultur striktně anaerobních streptokokků, které se nám podařilo vyplýstovati buď z putridních abscesů, nebo z appendicitidy a konečně také v několika případech z hemokultur. Především bychom rádi zdůraznili, že se často zapomíná, že každý anaerobní streptokok nesmí býti označován Schotmüllerovým názvem *streptococcus putridus*. Naopak, většina námi isolovaných byly mikroby zcela neputridními a jenom výjimečně odpovídaly mikrobu, o němž právě učiněna zmínka. Užíváme tedy důsledně při diagnostice názvu *streptokokus anaerobicus*, a vždy ho přesně odlišujeme od *streptokokus anaerobicus varietas putrida*. Kultivační symptomy těchto streptokokků jsou téměř úplně shodné s oněmi streptokokků obyčejných, jenom že vyrůstají za podmínek striktně anaerobních a co je hlavně důležité, striktními anaeroby také i po sebe delší řadě kultivačních generací zůstávají. Nikdy jsme nepozorovali zřetelné hemolysy, ale dosti často lehkou nahnědlou pigmentaci v okolí kolonií. Kultury bouillonové bývají na rozdíl od anaerobních strep-

tokokků často mírně zkaleny, zejména u streptokokka putridního, který ještě nadto produkuje dosti značné množství páchnoucího plynu.

### Résumé.

L'auteur voulant établir un système facilement maniable, divise les infections anaérobies en trois groupes:

1. Celles qui sont provoquées par des microbes purement toxiques (dans cette catégorie, il range les affections causées par le bacille tétanique et botulinique).

2. Les infections provoquées par les anaérobies toxiques et virulents à la fois (à ce groupe appartiennent les microbes qui provoquent des traumatisations de plaies de guerre et quelques anaérobies sporogènes putrides).

3. Celles des microbes asporogènes qui sont, par rapport aux microbes précités, adaptés plus étroitement à la vie parasitaire du corps humain, mais qui ne sont pourtant qu'occasionnellement agents de processus pathogènes chez l'homme (p. e. bac. fragilis, bac. Buday, le bac. fusiforme et les plus divers léptotriches, spirilles et streptocoques anaérobies).

Dans la suite de son travail, l'auteur recommande la mise en pratique des méthodes standardisées de culture des germes anaérobies. Il donne une description détaillée de ces méthodes et des symptômes de culture caractéristiques qu'il a pu constater au cours de plusieurs années d'observations personnelles.

### Literatura.

1. **William W. Ford:** Text --Boock of bakteriology, Philadelphia and London 1927. — 2. **M. Weinberg et B. Ginsbourg:** Données récentes sur les microbes anaerobies. Masson, Paris 1927. — 3. **Kolle-Kraus-Uhlenhuth:** Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Band IV. 1928. Band X. 1929. — 4. **L. Nattan-Larrier:** Traité de micro-

biologie. Paris 1931. — 5. H. A. Gins: Einführung in die Bakteriologie. München 1933. — 6. Löhr: Über den heutigen Stand der Anaerobenforschung. Arch. für Chirurgie 1928, 152. — M. Weinberg: Infections à microbs anaerobies et leur traitement sérique. Schweizerische Medizinische Wochenschrift 1930, 34. — 8. Nathan: Buday Sepsis. Zentralblatt für innere Medizin. 1932, 753. — 9. Stolzová-Sutorisová a Kratochvíl: O sepsi způsobené striktním anaerobem bac. ramosem. Časopis lékařů českých 1932, 1528. — 10. Richou-Kissl: Septicémie a b. fragilis. (Presse méd. 1934, 632. — 11. Zeissler: Infektionen durch anaerobe Bazillen. Klin. Wochenschrift 1934, 1528.

---