

tidy a konjunktivitidy. Velmi často napadají urogenitální trakt, zvláště člověka.

Nejdéle studovanou je shora zmíněná species *Asterococcus mycoides*, na němž lze objasnit morfologii a zásady kultivační, charakteristické pro tuto celou skupinu.

Při pleuropneumonii hovězího dobytka patologické produkty, zejména pleuritický exsudát v nativním i centrifugovaném stavu, barven běžnými metodami, neukáže zpravidla nic, co by připomínalo kteréhokoliv známého, formovaného vyvolavatele onemocnění. Exsudátem a jeho filtrátem je choroba lehce přenosná, takže se myslelo, že agens je filtrovatelným virem. Jestliže se však naočkuje sediment z exsudátu na vysoce výživný agar, zvláště zlepšený výtažkem z kvasnic, k němuž se přidá 30% nativního koňského sera, tu se vyvinou v rozmezí 2–6 dnů na této půdě velmi jemné kolonie, sotva viditelné, v průměru 60–800 μ , vnořené z největší části do kultivační půdy. Preparát z kultury v časném stadiu (zbarvený Giemsou) ukáže konglomerát nesmírně pleomorfních elementů, mezi nimiž jsou především drobná, kokobacilární tělíska na hranicích viditelnosti (200–250 $m\mu$), která nazýváme tělísky elementárními. Velmi nápadným zjevem jsou jemná, někdy značně dlouhá vlákénka, často se rozvětřující až i na mycelium. Mezi nimi jsou uloženy nejbizarnější útvary (obvykle špatně barvitelné), buď prstencovité, nebo trojúhelníkovité, čtyřúhelníkovité, jindy útvary amoebovité s četnými rhizoidy. Tato pleomorfie, u běžných schizomycet nevidaná, byla dlouho záhadou. Teprve podrobné studium kolonií, fixovaných in toto, a to v nejruznějším stadiu vývoje, a dále elektronoptické studie přinesly částečné objasnění významu těchto jednotlivých útvarů, pozorovaných v kultuře.

Drobná, kulatá tělíska jsou obecně považována za nejmenší reprodukční jednotku, za opravdová elementární tělíska, analogická některým velkým virům (jsou též filtrovatelná a schopná ve filtrátu přenést chorobu). Ta se mohou množit jednak prostým dělením, jednak se některá protahují v drobné tyčinky, které na konci duří a pozvolna se tak mění ve velká, kulatá tělíska s chromatinovými, dobře se barvicími hmotami. Tato velká, kulatá tělíska mají velmi jemnou stěnu, kterou lze po plasmolyse vidět v elektronovém mikroskopu. V barvených preparátech se jeví jako shora zmíněné pleomorfní útvary. V dalším vývoji lze vidět, jak na velkém, kulatém tělísku začnou na jednom nebo více místech pučeti delší nebo kratší výrůstky, do nichž přechází i část chromatinové substance. Tyto výrůstky se zanořují do půdy a rozpadají se v několik dceřinných, elementárních tělísek. V tomto stadiu právě vypadá velké kulaté tělísko podle typu výběžků buď jako amoeba, malina, nebo hvězdička, odtud název *Asterococcus*. Někteří se domnívají, že se elementární tělíska nemusí napřed změnit ve vlákna, nýbrž že přímo mohou zduřeti ve velká, kulatá tělíska.

O koloniích na pevných půdách bylo řečeno, že se liší svým složením od normálních bakteriálních kolonií. Jsou-li fixovány in toto (t. j. i s částičkou

576.858.74

Borrelomycetaceae a L-organismy.

Dr. FRANTIŠEK PATOČKA - Dr. MILADA SUCHANOVÁ:

Ústav pro lékařskou mikrobiologii a imunologii Karlovy university, Praha II, U Botanického ústavu 7.

Do této skupiny zahrnujeme mikroorganismy, jež ve svém vývojovém cyklu mají filtrovatelné stadium, rostou na umělých kultivačních půdách ve formě charakteristických, drobounkých kolonií, zcela odlišných od bakteriálních kolonií, a jako infekční agens jsou zčásti intracelulárními parazity. Růstem na umělých kultivačních půdách jsou blízké bakteriím, svým filtrovatelným stadiem a biotropismem in vivo rickettsiím a skupině t. zv. největších virů; proto je zatím řadíme v systematicce někdy mezi schizomycety na jedné, rickettsie a viry na druhé straně.

Prototypem jich je *Asterococcus mycoides*, objevený Borrelem a spol., vyvolavatel pleuropneumonie hovězího dobytka, vysoce to kontagiosního onemocnění, charakterizovaného pleuritidou a atelektatickými ložisky v plicích. *Asterococcus mycoides* a organismy jsou příbuzné, izolované z koz, krys, myši nebo člověka, jsou, jak se zdá, intracelulárními parazity buněk, zejména mesenchymálních, vyvolávají pleuritidy, intracelulární pneumonie, arthri-

kultivační půdy) a pak probarveny neutrálními barvivami, ukáže se, že jsou složeny z masivního centra, jemně bradavčitého vzezření, které proniká nad kultivační půdu. Ostatní zbytek kolonie je vnořen do agaru. Hutné centrum je složeno z velkých, kulatých tělísek, nabitých chromatinem, kdežto na periferii tato tělíška duří, vakuolisují a vypadají jako prázdný puchýř. Mezi nimi a uvnitř nich jsou patrna svrhu zmíněná granulka, částečně i neurčitě konturovaná vlákénka a tyčinky bizarních tvarů. Celá kolonie, pozorovaná malým zvětšením, má jakoby pěnovitou strukturu. V tekutých půdách (bouillon s 30% sera nebo ascitu, nebo kousky sterilních orgánů) někdy se u dna objeví jemný zákal, někdy granulka, ale často není žádných makroskopických symptomů růstu. V sedimentu vyrostlé kultury se dají (obtěžně) mikroskopicky zjistiti kokovité útvary, jemná vlákénka či prstencovité útvary.

Popsaná růstová charakteristika jsou více méně analogická u všech mikroorganismů, patřících do této skupiny. *Asterococcus mycoides* patří mezi nejlépe rostoucí, morfologicky nejdokonaleji charakterizované a nejtypičtější *Borrelomycety*. Některé mikroorganismy z této skupiny (mimo shora zmíněné půdy serové nebo ascitové) lze pěstovati na chorioallantois živých nebo chladem umrcených kuřecích zárodků.

Kmeny mikroorganismu pleuropneumonie hověziho dobytka jsou rozpustné ve žluči a fermentují řadu cukrů, antigenně jsou jednotnou skupinou, zcela odlišnou od ostatních *Borrelomycet*. Jejich pathogenní činnost je omezena na sudokopytníky a nelze jimi vyvolat onemocnění žádného laboratorního zvířete.

Podobným, ale jemněji rostoucím a rovněž velmi infekčním organismem je t. zv. *Borrelomyces agalactiae*, jenž u koz a ovcí vyvolává onemocnění se zachvácením kloubů a očí, u zvířat v laktaci i vemene. Je rovněž zcela specificky antigenním a nepřenositelným na běžná laboratorní zvířata.

Species *Asterococcus canis* byl ve dvou typech vypěstován ze psa; není jisto, zda má choroboplodné vlastnosti.

Další skupina *Asterokoků* byla vypěstována z krys. Je to zejména druh *L₃*, vypěstovaný z chronických plicních abscesů těchto zvířat, který při experimentální inokulaci se ukázal nepathogenní pro krysy, je však někdy pathogenní pro myš. Druh *L₄*, antigenně distinktní od předcházejícího, byl vypěstován rovněž z plicních abscesů krys, ale též z jejich spontánní polyarthritidy. Pro opice a vyšší laboratorní hlodavce je neinfekční, u krys a myši vyvolává experimentálně arthritidy.

Velmi známých je 5 typů pleuropneumonických organismů, vypěstovaných z myši (A—E). Typy B—E jsou antigenně distinktní, byly izolovány z nozder a mozků myších a experimentálně u těchto zvířat vyvolávají ankyloující arthritidy. Nejzajímavější je typ A, vypěstovaný z plic, mozku a konjunktivy myšek. Produkuje toxin, prokazatelný i v bouillenových kulturách, který u myši po intracerebrálním vstříknutí vyvolává degenerativní

změny v mozečku, vedoucí k choreiformním pohybům (t. zv. tančivé myši). Z myších purulentních otitid byl vypěstován t. zv. *Nelsonův organism*, antigenně i některými kultivačními drobnostmi odlišný od předešlých. (Někdy bývá řazen mimo běžné *L-organismy*.)

Pleuropneumonické organismy, vypěstované z neinfikovaných kuřecích embryí ukázaly se pathogenními při intrapulmonální infekci pro bavníkové krysy, a to patrně produkcí thermostabilní, neantigenní látky neznámého charakteru. Vyvolávají též haemaglutinaci erythrocytů, podobnou Hirstově reakci. Tuto reakci lze specificky inhibovati homologním, hyperimunním králičím serem a do značně vysokého titru i serem slepic ze stejného chovu, odkud pocházela vajíčka.

Nejzajímavější jsou pro nás primární, pleurpneumonii podobné, čili t. zv. *L-organismy*, vypěstované z člověka, a to nejčastěji z cervix uteri (podle sestavy L. Dienesova z r. 1948 z 26%). Vypěstovány byly vzácněji z žen klinicky zdravých, kde snad tvoří součást epifytické flory, ale hlavně u žen, trpících chronickými afekcemi genitálu, a to zejména při exacerbaci infekce. Tehdy byly *L-organismy* vypěstovány prý několikrát i v čisté kultuře. Při kapavčitých onemocněních byly opětovně izolovány spolu s *Neis. Go.* ve dvou případech i po jejím vymizení.

U mužů byly ve 12% případů vypěstovány z moče, urethrálního nebo prostatického sekretu při nespecifických urethritidách a cystitidách, avšak nikdy nebyly nalezeny u mužů klinicky zdravých, což značně podporuje domněnku, že jsou skutečně pathogenními pro urogenitální trakt. Sestava Harknesova udává větší procento pozitivních kultur u mužů při nespecifických urethritidách (38%), je však porížena z poměrně malého počtu případů, takže čísla Dienesova se nám zdají přesvědčivější.

Klinické příznaky u případů Dienesových byly různě silně vyjádřeny od pouhých dysurických potíží až k haemorrhagickým cystitidám. Jakmile tyto vymizely, vymizely i *L-organismy* z pathologických sekretů a moče. V několika případech byly *L-organismy* vypěstovány v čisté kultuře, jindy ve směsi s několika koloniemi diphteroidů, bílých stafylokoků, *b. coli* a pod.

Zdá se, že jejich afinita k mezenchymu je vyjádřena i u člověka, neboť byly *L-organismy* vypěstovány v 9 z 11 případů t. zv. Reiterova syndromu (urethritis nebo cystitis, arthritis, conjunctivitis, vzácněji iritis), a to z prostatického sekretu, 2× i z kloubního punktátu. V jednom případě se podařilo *L-organismy* zachytiti vždy za ataky choroby, v klidových mezidobích vymizely z prostatického sekretu.

Postižením kloubů trpělo 27 z 58 mužů, pozitivních na *L-organismy* v urogenitálním traktu. Tyto arthritidy probíhaly především akutně jako migrující polyarthritidy se zarudnutím, zduřením a bolestivostí kloubů. U dvou pacientů se zároveň objevil makulopapulosní raš. V jednom případě byl vesikulosní raš, jednou došlo zároveň k balanitidě. Protože celkový stav pacientů byl alterován (horečka,

mrazení, zvýšená sedimentace), předpokládá Dienes, že infekce L-organismy, alespoň některými, je celková, při níž jsou predilekčně zachvacovány urogenitální trakt a mezenchymové tkáně. U těchto akutních arthritid měla synoviální tekutina jiné složení, co se týče elementů, mucinu a cukru, než při banálních bakteriálních infekcích, i jiné než u postinfekčních polyarthritid. Při chronických arthritidách, souvisících s nálezem L-organismů, byly klouby jen lehce zduřelé, pobolívaly a pomalu se v nich ztrácela pohyblivost. V těchto případech infekce genitálního traktu předcházela začátek arthritidy.

U žen současné postižení genitálního traktu L-organismy a rozvoj kloubního onemocnění nebylo tak nápadné. Ze však i tu je snad podobný vztah, svědčí případ jedné ženy, u níž se ataka akutní arthritidy dostavila 2 týdny po svatbě. Její manžel onemocněl arthritidou 8 týdnů po svatbě a zároveň byly nalezeny L-organismy v jeho prostatickém sekretu.

Herschberger a spolupracovníci referují o jednom případě subakutní bakteriální endocarditidy, způsobené prý agens, příbuzným L-organismům.

Při hodnocení pathogenního účinku L-organismů si musíme uvědomit, že snad jde o četná species i genera, jež se nám jeví morfologicky i kultivačně velmi podobná, takže rozlišení mezi nimi lze zatím provádět relativně hrubě jen serologicky. Studium jejich biochemických vlastností je teprve v počátcích pro jejich nesnadný přenos v subkulturách.

Jednotlivá species jsou tak adaptována na svého hostitele, že přenos na laboratorní zvířata je pravidelně nemožný, což ztěžuje zejména studium lidských infekcí.

Therapie je stále obtížná. Penicilin i sulfonamidy jsou bez účinku jak na zvířecí, tak i na lidské L-organismy. U zvířat byly zaznamenány úspěchy arsenovými preparáty, u lidských infekcí byl zkoušen streptomycin, který in vitro inhibuje L-organismy již v koncentraci 20 gama na 1 cm. V některých případech cystitid vymizely po něm L-organismy i povolily příznaky. U arthritid po streptomycinové léčbě vymizely v některých případech L-organismy, příznaky však povolily jen během léčby, po ní v mírnější formě trvaly dál, i sedimentace zůstala zvýšená; s různým úspěchem byly zkoušeny i preparáty zlata.

Zajímavou kapitolou jsou L-organismům příbuzné t. zv. bakteriální L-formy, vypěstované z čistých kultur nejrůznějších mikrobů. Z nich je nejproslulejší nejdříve objevený L₁, izolovaný z kultur *Streptobacillus moniliformis*. O morfologii a kultivačních vlastnostech ostatních L-variant platí zhruba totéž, co o lidských a zvířecích primárních L-organismech. Z některých bakteriálních kultur jsou odštěpovány stále a pravidelně (*Streptobacillus moniliformis*, *Spherophorus funduliformis*), u jiných pod vlivem spontánních nebo uměle navozených degenerativních či autolytických procesů. Z látek, které jsou schopny vyvolat tvorbu L-variant, jsou nejdříve penicilin a karboxymethoxylamin. Tak se podařilo docílit L-forem u gono-

koka, *Salmonella typhi* abdom., *Esch. coli*, *Flavobacterium*, *Haemophilus infl.*, *Proteus vulg.*, ale též u některých sporulujících gr⁺ tyčinek.

Tyto L-varianty bývají někdy resistantnější nežli sám mikrob, z něhož byly odštěpeny (u streptobacila) nikdy nejsou citlivé na penicilin a mají s původním mikrobem jen částečně podobný antigen. Domněnky o jejich genesi jsou dvě:

1. Jsou parasitem bakterií, který vyvolává jejich autolysu (Klienebergerová).

2. Jsou řetězem ve vývojovém mikrobiálním cyklu, a to tak, že bacterium za určitých podmínek přechází do A fáze L-formy (zvlášť nepatrné kolonie); z této pak do B-fáze (větší kolonie), z nichž opět vyklíčí normální forma mikroba. Vývoj L-formy z mikroba se děje tak, že při počínající autolyse nebo aktinickém prohrátí (viz *Proteus*) některé bacterium zduří ve velké kulaté tělísko (u některých mikrobů anaerobních — *Spherophorus funduliformis* — je tvorba kulovitých útvarů absolutně pravidelnou součástí kultury). Z něho pak vyklíčí L-kolonie, v níž vznikají opět velká, kulatá tělíska. Uvnitř těchto se formují elementární tělíska, jež buď dávají vznik dalším L-koloniím, nebo se v nich vytvoří bakteriální tyčinky, jež vyrostou v stejného mikroba, jako na počátku cyklu (Dienes). Druhý výklad se nám zdá pravděpodobnějším.

Význam tohoto zvláštního mikrobiálního cyklu není zcela jasný. Jsou náznaky toho, že jej určité produkty mikrobiálního metabolismu samy navozují. Tak byla tvorba L-varianty pozorována na styčné čáře dvou různých kmenů protea. Ovšem zdaleka není prokázáno, že všechny mikroby vůbec mohou, nebo dokonce musí procházet tímto cyklem. Kdyby tomu tak vskutku bylo, vyložilo by to mnoho záhad chronicity infekcí, obtíže imunitní terapie i antibiotiky i epidemiologických nejasností, a to alespoň u bakteriálních druhů, vyvolávajících lidské infekční choroby.

Vzhledem k pravděpodobné pathogenní roli některých primárních L-organismů pro člověka, zejména však proto, že je četnými autory tušen význam bakteriálních L-forem pro vývojový cyklus schizomycet obecně, rozhodli jsme se prostudovat otázku L-organismů také na našem materiálu. Předložená část naší práce zachycuje pouze počáteční stadia našeho výzkumu a obírá se zejména metodikou, která je odlišná od běžné techniky bakteriálních kultur a často i velmi obtížná. Teprve po překonání těchto nesnází přistupujeme k další části výzkumu, t. j. studiu četnosti výskytu primárních L-organismů v nejrůznějším lidském materiálu u nás. Nakonec hodláme podrobněji studovat biochemická, antigenní a metabolická charakteristika těchto stále ještě nejasných organismů.

Začali jsme nejdříve s kultivací z cervikálního sekretu žen s chronickou kapavkou. Kultivovali jsme jen 8 případů, L-organismy se nám nepodařilo izolovat. Současně jsme kultivovali výtěry z cervixu žen, trpících rozmanitými chronickými afekcemi genitálu. Výtěry na kultivaci jsme získávali z nemocných, přicházejících do naší autovakcinové laboratoře, jednak nám byly vhodné případy posí-

lány z II. kožní a I. gynekologické kliniky, jimž tímto děkujeme za spolupráci.

Gynekologických případů jsme sledovali celkem 71, z toho L-organismy byly vypěstovány 7×. Kmen 107 se nám podařilo 5× pasážovat na tuhých půdách, kmen 112 3× v čisté kultuře. Ostatní kmeny vyrostly jen na první tuhé půdě.

Mimo to jsme naočkovali 7 močových sedimentů a prostatických sekretů z případů nespecifických urethritid. Z nich pouze jedenkrát vyrostla jedna kolonie makroskopicky, připomínající L-kolonii. Po přeočkování již nevyrostla.

Reiterův syndrom jsme vyšetřovali jednou u muže, kde bylo již delší dobu léčeno a příznaky byly na ústupu, a jedenkrát u ženy, která trpěla manifestním fluorem pochvy s erosemi, arthritidou a konjunktivitidou. Tento druhý případ nebyl v okamžiku odběru materiálu léčen. Z muže se nám nepodařilo ani z prostatického sekretu, ani z konjunktivy, ani z moče vypěstovat L-organismy. Naproti tomu u ženy bez nesnázi opětovaně vyrostly typické primární L-organismy, a to na tuhých půdách bez penicilinu a thalia, naočkováných přímo vaginálním sekretem. Pochopitelně mimo L-organismy byla izolována běžná vaginální flora aerobní i anaerobní. Zdařilá kultivace na půdách bez inhibičních prostředků svědčí o tom, že skutečně šlo o primární, lidské, pleuropneumonii podobné L-organismy, a nikoliv pouze o L-formy různých vaginálních bakteroidů. Tento případ bude popsán zvláště in extenso.

Dosud nepopsanou zvláštností byla zdařilá kultivace primárních L-organismů z mozkového abscesu vepře, očkovaného virem obrny intracerebrálně. Na plotně s 10% králičí krve za mikroaerofilních podmínek vyrostla kromě pyogenního stafylokoka řada drobných, do půdy vnořených kolonií, které se při mikroskopickém zpracování ukázaly jako L. Subkultura se již nepodařila. Vzhledem k tomu, že nebylo použito inhibičních prostředků, šlo nesporně o primární L-organismy z vepře (inokulovaná suspense viru byla rovněž z homologního zvířecího druhu), jež, pokud je nám z dostupné literatury známo, nebyly dosud nikým prokázány.

Methodika: Materiál jsme očkovali vždy na 2 kvasnicové a 2 ascitové tekuté půdy a do měkkého, 0,3% kvasnicového agarů, nalitého vysoko ve zkumavkách. Protože z materiálu v měkkém agaru L-kultury nikdy nevyrostly a pro relativní obtížnost očkování (zároveň do několika zkumavek, podobně jako se očkuje Veillonova půda pro kultivaci anaerobů), jsme tuto metodu později opustili. Rovněž nikdy, až na jednu výjimku, jsme neměli úspěchu při přímém očkování materiálu na tuhé půdy. Z tekutých půd jsme očkovali na jednu pevnou kvasnicovou půdu, jednu agarovou plotnu s ascitem, krevní plotnu a 2 tekuté půdy jako při primokultuře. Polovinu tuhé ascitové i kvasnicové plotny jsme potřeli penicilínem a kultivovali anaerobně Fortnerovou metodou. Plotny jsme prohlíželi každý pátý den lupou. Jestliže se nám některé kolonie jevily makroskopicky podezřelé, dělali jsme z nich preparát a přeočkovávali je na další tuhé i te-

uté půdy vyříznutým agarovým blokem. Protože růst L-organismů v tekutých půdách je tak nepatrný (zejména v primokultuře), že se půda nezdá makroskopicky změněna, bylo nutno z tekutých půd vždy vyočkovávat na tuhé půdy, kde jedině je diagnosa možná. Pakliže první tuhá půda neobsahovala L-kolonie, dělali jsme vždy další slepé pasáže v tekutých půdách a z nich jsme znovu vyočkovávali na tuhé půdy. Měli jsme totiž zkušenost s kmenem 107, že z mikrokultury v tekuté půdě vyrostlo na první tuhé půdě jen několik L-kolonií, po vyočkování z druhé pasáže tekutou půdou byl růst na tuhé půdě dosti bohatý. Pokud jsme měli L-organismy v tekutých půdách v čisté kultuře, nedocílili jsme u nich nikdy makroskopicky viditelného růstu, až někdy na zcela nepatrný, jemný sediment.

Kvasnicová půda: Základem je infuse z čerstvých hovězích srdečí o pH 8, obohacená 1% dobrého peptonu. Před očkováním se k ní přidá 20% čerstvého, koňského, inaktivovaného sterilního sera a 10% kvasnicového extraktu, který se zhotoví povařením 50 g pivovarských kvasnic ve 200 ccm dest. vody a filtrací. Základní půda může být v zásobě v lednici 4–6 týdnů, kvasnicový extrakt vydrží týden. Tuhá půda se zhotoví přidáním 2% agarů k tekuté. Jako bakteriostatikum přidáváme Ta aceticum v konc. 1:8000 a penicilin (0,1 ccm 10.000 j. roztoku v dest. vodě na 10 ccm půdy). Na povrchu tuhých půd se rozetře kapka 1000 j. roztoku.

Ascitová půda je obdobou Martinova bouillonu. K tomuto základnímu bouillonu se přidají 2% koňských krvinek a zcela krátce povaří. Před upotřebením se přidá 25% ascitu a 15% pepticky natráveného, čerstvého vepřového žaludku. Jako bakteriostatikum se přidá též Ta aceticum a penicilin jako u půd kvasnicových. Tuhé půdy se připraví podobně tím, že se krvinky přidají k živnému 2% agaru o pH 7,8 a krátce povaří. Ascites a natrávenina se přidá před naočkováním v témže množství jako u tekuté půdy.

Natrávením zhotovíme tak, že na rozemletý vepřový žaludek se nechá působit zředěná HCl asi po 10 hod. při teplotě 50° C. Pak po přefiltrování se pH upraví na 7,8 a přidá K_2HPO_4 jako nárazník. Sterilise se filtrací Seitzovým filtrem.

Protože kvasnicové půdy jsou svou přípravou jednodušší a čirější, takže se v nich kolonie lépe hledají, a protože růst na obou půdách byl stejně dobrý, zavedli jsme později jen kvasnicové půdy.

Preparát jsme zhotovovali otiskovou metodou podle Edwarda, již jsme poněkud modifikovali podle vlastních zkušeností. Z tuhé plotny jsme vyřezali agarový blok s koloniemi a položili kulturou na čisté, tuku zbavené krycí skličko. Blok jsme zlixovali několika kapkami Bouinovy tekutiny, kterou jsme nechali působiti přes noc ve vlhké komoře v thermostatu. Píští den jsme opatrně sloupili agarový blok tak, abychom nepoškodili nejvyšší vrstvičku s koloniemi, která zůstala lpěti na skličku. Skličko jsme vložili na 30 mm. do 70% alkoholu a po opláchnutí dest. vodou jsme preparát barvili Giemsou ve zředění 1:20 po 4 hodiny. Obar-

vené preparáty jsme montovali za vlhka do glycerin-želatiny a oblepovali parafinem. Preparát lze po fixaci barvit i Gramem, kolonie jsou gr-, probarvení však není tak přesné jako u Giemsoy. Jinak lze preparáty dělati také tak, že se do zasychající kapky alkoholového roztoku methylenové modře otiskne agarový blok, obsahující kolonie, nebo že se tence seříznutý agarový blok celý probarvuje 1% roztokem methylenové modře v ascitu, aby se zabránilo vzniku sraženin v agaru (podle Dienese). Nám se nejlépe osvědčila první z popsaných metod. Preparáty z tekutých půd jsme barvili též Giemsou, obvyklou methodou po fixaci methylalkoholem.

Kmen 105 z případu torpidního fluoru vyrostl na první tuhé kvasnicové plotně v několika poměrně velkých (asi 0,5 mm v průměru), plochých, pěnovitých koloniích, svou periferií částečně vrostlých do agaru. Další pasáže se jak z této tuhé, tak i z dalších tekutých půd nepodařily, pravděpodobně pro rychlou a v době přeočkování již značně pokročilou vakuolisaci. V preparátu při malém zvětšení se jevily jako shluk bílých, puchýřkovitých útvarů, v centru tmavších, směrem k periferii světlejších, při čemž nebylo tak ostré hranice mezi centrem a periferií, jak tomu bývá v mladším vývojovém stadiu kolonie. Při prohlížení kolonie imersí jsme shledali, že centrum tvoří velká, kulatá tělíska, která obsahují ještě trochu chromatinové substance, ale v nichž se již tvořily drobné vakuolky. Periferie obsahovala velká, kulatá tělíska, již značně vakuolisovaná, takže místy téměř prázdné tělísko bylo vyplněno jen protoplasmatickou pavučinkovou sítí, jindy bylo přeměněno v zcela prázdný puchýřek se zřetelnou stěnou, ale bez viditelného obsahu. Mezi velkými kulatými tělisky bylo množství drobných, poměrně dobře se barvících zrnitých elementárních tělísek. Obvod kolonie byl nerovný, ale nikde jsme z něho neviděli vybíhat vláčenka, jak bývá popsáno v literatuře. Jelikož v půdách bylo použito penicilinu a na krevní plotně při anaerobní kultivaci vyrostly spolu s kokovitými mikroby i tyčinkové gr-bakteroidy, nelze říci, zda šlo o primární L-organismy, čili bakteriální L-formu. Znovu však podotýkáme, že pro tuto první etapu naší práce nebylo toto rozlišení naším cílem, nýbrž že jsme se snažili o zachycení jakékoliv L-formy z materiálu, abychom si ověřili správnost své metody.

Kmen 107, vypěstovaný z případu chronické adnexitidy (z cervikálního výtěru), vyrostl na první tuhé plotně v hojných, drobných koloniích, nahlučelých těsně na sebe v místě inokula, s vyvýšeným, bradavčítým, hutnějším centrem a pěnivitou periferií. Na plotně vyrostly mimo tyto L-kolonie ještě ojedinelé kolonie streptokoka faecalis, který nebyl potlačen ani thaliem, ani penicilinem. V další pasáži jsme dostali čistou kulturu L-organismů. V očkovacích čárách vyrostly velmi četné, drobné kolonie, jejichž centrum se kuželovitě zvedalo poměrně dosti vysoko nad agarový blok, bylo poměrně hladké, lesklé. Nerovná, plochá periferie, vrostlá do agaru, byla velmi úzká, takže ji lupou nebylo dobře

vidět. Nápadně dobrý růst a pak atypický vzhled kolonií při prohlížení lupou nám působil rozpaky, zda jde skutečně o L-formu. Teprve otiskový preparát ukázal uspořádání typické pro L-kolonie, jak se popisuje v literatuře, kde jsme našli podobné obrazy. V centru byla uložena velká, kulatá tělíska, nabitá chromatinem, uložena tak těsně vedle sebe a na sobě, že v preparátu vypadala celá tato část jako téměř homogenní tmavá masa, přesně okrouhlá, podobná knoflíku. Právě tato část prominovala nad kultivační půdu a při otiskovém preparátu se často z kolonie vytrhla, takže po ní zbylo přesně okrouhlé, prázdné místo. Periferní část kolonie, podobná krajovině, obsahovala též velká kulatá tělíska, ale již v různém stupni vakuolisace a byla různě široká podle vývojového stadia kolonie, v mladších užší, ve starších širší, nebo v některých tvořila větší část kolonie. Hranice mezi oběma partemi kolonie byla ostrá, přesně okrouhlá, jak je dobře vidět na fotografii č. 1. Vakuolisace nebyla ve všech tělískách stejně silně vyvinuta, viděli jsme přechody od jemně pěnivité protoplasmky až do zcela prázdných puchýřků. Mezi těmito velkými kulatými byla uložena zrnka elementárních tělísek. Místy, zejména na okraji kolonie, jsme zastihli ojedinelé vláknité útvary, ale celkem málo četné (obr. č. 2).

Když jsme plotny kultivovali další 3 dny, viděli jsme, že se některé kolonie stávají plošší, v preparátě byly světlejší, vakuolisované periferie přibývalo, centrální hutná část byla ještě někde zachována, jinde byla již zredukována na několik málo velkých, kulatých tělísek, stále však byla patrna poměrně ostrá hranice mezi centrem a periferií. V některých koloniích pak centrální, silně barvitelná část téměř vymizela. Tyto kolonie byly pak zcela bílé, skládající se většinou z tělísek velikými vakuolami.

Popsané obrazy jsou pro L-formy charakteristické a naprosto se liší od uspořádání mikrobů v normální bakteriální kolonii. Pro srovnání uvádíme obraz stejně velké kolonie streptococcus faecalis (obr. č. 3). V tomto případě je na periferii kolonie dobře vidět normální mikrobiální jedince, s dobře barvitelnou protoplasmou, uložené ve dvojicích nebo krátkých řetězích. Mezi nimi je zřetelně prázdný prostor. Směrem ke středu mikrobů stejnoměrně přibývá, jak se kolonie centrálně, mírně obloukovitě zvedá. Poměrně daleko k centru lze však stále sledovat normální koky, zachovávající přesně svůj tvar i barvitelnost. Není tu žádné hranice mezi centrem a periferií ani nějakého rozdílu mezi jedinci, centrálně a periferně uloženými.

Právě popsaný kmen 107 vyrostl stejně dobře na kvasnicových pudách jako na ascitových, podařilo se u něho docílit 5 pasáží, jak shora zmíněno. V tekutých půdách ani po pasážování nebyl růst makroskopicky patrný, v preparátu, barveném Giemsou obvyklým způsobem, jsme viděli rozmanité zrnité útvary a kratinká vlákna, nikoliv však zřetelná velká, kulatá tělíska. Ze 4. pasáže na pevné kvasnicové půdě jsme naočkovali agarovým blokem 5 kuřečích zárodků. Jiné bloky s koloniemi

jsme položili na skarifikovanou rohovku králíka. Přenos na embrya se nepodařil, také rohovka zůstala proti kontrole beze změny.

Kmen 110 rovněž z případu chronické adnexitidy stejně jako kmene ostatní vyrostl na tuhé kvasnicové půdě v místě inokulace v nápadně nepatrných koloniích v čisté kultuře. Pasážovat se ho nepodařilo. Mikroskopický obraz byl zas charakteristický, kolonie se skládaly většinou ze značně vakuolisovaných tělísek.

Kmen 112 vyrostl ve velmi četných koloniích v čisté kultuře, morfologicky se zcela podobal kmenu 107, třikrát jsme ho pasážovali, v jedné pasáži vyrostl i na dobré, obyčejné krevní plotně, aerobně kultivované, ale zalepené, aby se zabránilo vyschnutí.

Kmen 134 vyrostl z materiálu, naočkovaného přímo na normální krevní plotnu, kultivovanou anaerobně Fortnerovou methodou snad proto, že tato půda byla bohatší krví a pH bylo spíše vyšší. V očkovacích čarách mezi koloniemi normálních mikrobů (vaginální mikrokoky, bakteroidy, jež nebyly blíže identifikovány), vyrostlo velké množství drobných kolonií, lpících na agaru, které v mikroskopickém obraze měly typické uspořádání, t. j. hutné, tmavé centrum, ostře odlišené od krajovitě periferie. Kolonie jsme opětovaně agarovým blokem přeočkovali na tekuté a pevné kvasnicové půdy, nikdy však v subkulturách nám nevyrostly. Snad tu šlo o bakteriální L-formu, a to kolonie typu B podle koncepce Dienesovy, z nichž vyrůstá přímo původní mikrob, jehož vzrůst v našem případě byl potlačen buď penicilinem, nebo thaliem.

Kmeny 150 a 181 vyrostly pouze na první a tuhé kvasnicové půdě v několika málo plochých, dosti vakuolisovaných koloniích, subkultury se nezdařily.

Všechny naše kmene rostly stejně dobře jak na penicilinované, tak i nepenicilinované polovině plotny.

Ač se naše kmene jevíly všechny morfologicky podobné, a pokud jsme popisovali rozdíly, byly způsobeny pravděpodobně spíše vývojovým stadiem kolonie než odlišností kmenů, pozorovali jsme přece rozdíly v růstových schopnostech. Většina kmenů vyrostla až na naší speciální kvasnicové půdě, ale některé (kmen 112 a 134) i na obyčejném dobrém krevním agaru, a to kmen 112 dokonce i při aerobní kultivaci. Též schopnost pasážování byla různá a máme dojem, že nezávisela jen na vývojovém stupni, ve kterém kolonie byla právě při přeočkování. Největší byla zřejmě u kmene 107, který vyrůstal velmi bohatě a kde se podařila pasáž i koloniemi dosti vakuolisovanými. Rovněž rychlost vakuolisace byla u různých kmenů různá. Soudíme tak proto, že plotny byly prohlíženy každý pátý den, a přesto jsme zastihli L-kolonie u různých kmenů v podstatně různých, vývojových stadiích.

Podáváme tuto zprávu o zachycení L-organismů z patologických sekretů pacientek, trpících negonorrhoidními, chronickými afekcemi genitálu jako předběžné sdělení v předpokladu, že tyto zvláštní, velmi nespodně kultivovatelné mikrobiální formy

budou zajímat širší lékařskou veřejnost nejen se stanoviska mikrobiologické systematiky, ale též jako pravděpodobné aetiologické agens chronických afekcí ženského i mužského genitálu a snad i některých kloubních onemocnění.

S o u h r n :

Bylo zevrubněji popsáno 7 různých kmenů L-organismů, izolovaných z 71 vyšetřovaných případů negonorrhoidních afekcí ženského genitálního traktu. L-organismy byly hledány v go fluoru 8 žen bez pozitivního výsledku.

Dále byl naočkován urethrální ev. prostatický sekret a močový sediment v 7 případech t. zv. nespecifických uretritid mužů, rovněž bez pozitivního výsledku až snad na 1 případ, kdy vyrostla jediná kolonie, pod lupou velmi podobná L-koloniím, která však po přeočkování nevyrostla, nebylo ji tedy možno s určitostí identifikovati.

Ze dvou vyšetřovaných případů Reiterova syndromu izolovány L-kultury z genitálu pouze jednou, druhý případ byl patrně proto neúspěšný, že byl vyšetřován již po řadě léčebných zákroků.

Jako zcela ojedinělý je nutno hodnotiti nález L-organismů v mozgovém abscesu vepře.

V práci je dále popsán význam L-organismů jako primárních, pathogenních činitelů u zvířat a snad i člověka i smysl t. zv. L-forem bakteriálních, jakožto pravděpodobného vývojového stadia některých mikrobů. U posledních upozorněno na jejich možný význam pro chronický průběh onemocnění, vyvolaného mikroby, z nichž vznikly, na jejich vzdornost proti antibiotikům a změněný jejich imunologický charakter.

Zhodnocena taxonomie primárních L-organismů, pokud je to dosud vůbec možno.

Podrobněji popsána příprava půd pro L-organismy, metoda jejich kultivačního zachycení a morfologická diagnostika. Upozorněno na obtíže při zakládání subkultur, které se prozatím autorům nepodařilo překonat.

Práce je úvodním článkem širěji koncipované problematiky, již autoři hodlají přispěti k vyřešení záhad těchto vysoce zajímavých mikroorganismů, které alespoň ve své primární formě se zdají snad jakýmsi přechodným článkem mezi ordo Schizomycetales a nižšími formami života, jako jsou ku příkladu ordo Rickettsiales.

Резюме.

В своей статье авторы подробно описали 7 разных культур L-организмов взятых из 71 исследованных случаев негонорройных аффекций полового тракта женщины. Они искали L-организмы в гонорройных выделениях 8 женщин без положительных результатов. Далее был ими сделан посев выделений уретры (простаты) и мочевого седимента в 7 случаях так называемых неспецифических уретритов мужчин; тоже без положительного результата за исключением одного случая, когда образовалась одна колония, которая была под лупой очень похожая на L-колонию, но которая после пересева не развилась, следовательно и нельзя было её определённо идентифицировать.

На двух исследованных случаях синдрома Райтера были изолированы L-культуры из генитала только в одном случае; во втором случае не был получен положительный результат возможно потому, что исследование было произведено лишь после нескольких лечебных мероприятий.

Открытие L-организма в мозговом абсцессе борова было исключением.

Далее в статье описано значение L-организмов как примарных патогенных деятелей у животных и вероятно тоже у человека и значение так называемых L-форм бактериальных как возможной эволюционной стадии некоторых микробов. У последних было подчеркнуто их возможное значение для хронического развития заболеваний вызванных микробами, из которых L-формы возникли, их устойчивость против антибиотических веществ и их измененный иммунитетный характер.

Насколько было возможно, была оценена таксономия примарных L-организмов.

Подробно было авторами описано приготовление питательных сред для L-организмов, методика их культивирования и морфологическая диагностика. Было обращено внимание на затруднения при посевах субкультур, которые авторам пока не удалось преодолеть.

Статья является введением в проблематику, при чем авторы стараются содействовать в решении возникших вопросов этих интересных микроорганизмов. Эти микроорганизмы являются в своей примарной форме по видимому переходной формой от *ordo Eubacteriales* к низшим формам жизни, как например *ordo Rickettsiales*.

Summary.

7 cultures of L-organisms (pleuropneumonia-like) from 71 cases of various inflammatory processes of the female genital tract are described concisely. Similar organisms were successfully isolated from the genito-urinary tract in the male only once out of 7 cases and once in 2 cases of Reiter's syndrome.

The authors mention the previously undescribed successful isolation of L-organisms from a brain abscess in a pig.

The properties of pleuropneumonia-like organisms, their possible pathogenicity in man and probable role in the evolutionary cycle of some bacteria are briefly discussed.

Some of the most successful methods used by the authors for isolation and identification of L-organisms are described.

The authors suggest the possibility of an intermediate taxonomic position of pleuropneumonia-like organisms between the *Ordo Eubacteriales* and *Rickettsiales*.

Přemnickvi.

1. Borrel, Du'ardin-Beaumont, Jeantet, Jonan: A. Inst. Past. 24, 168, 1910. — 2. Klieneberger, Steabbe: J. of Hyg. (Brit.) XXXVII, 113, 1937. — 3. Klieneberger: J. of Hyg. (Brit.) XXXVIII, 457, 1938. — 4. Dienes: J. Inf. Dis., 65, 24—26, 1939. — 5. Dienes: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 44, 468—469, 1940. — 6. Report of Proceedings III. Intern. Congress of Microbiology New York 1940. — 7. Partridge, Klieneberger: J. Path. Bact., LII, 219, 1941. — 8. Dienes: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 50, 99—101, 1942. — 9. Peškov, M. A.: Mikrobiologia, XV, 363, 1946. — 10. Edward: J. of Path.

Bact., 216, 1947. — 11. Edward: J. of Gen. Microbiol., 1, 238—243, 1947. — 12. Dienes: Spring Harbor Symp. on Quantit. Biol. XI, 51—59, 1947. — 13. Dienes: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 61, 166—168, 1947. — 14. Sabin: L-organisms. V knize Dubose: Bacterial and Mycotic Infections of Man, 1948. — 15. Dienes, Smith, Madoff, Bauer: New J. of Med., 238, 509—515, 1948. — 16. Harkness, Henderson: Brit. J. of Ven. Dis., 24, 50—58, 1948, Abst. — 17. Dienes: J. of Bact. 56, 445, 1948. — 18. Dienes: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 68, 589, 1948. — 19. Smith, Stuart, Mudd, Hillier: J. of Bact. 56, Nr. 5, 1948. — 20. Nelson: J. of Int. Dis., 82, 169, 1948. — 21. Smith, Hillier, Mudd: J. of Bact. 56, 589, 1948. — 22. Klieneberger, Nobel: Schw. Zeitschrift f. Path. Bakt. XII, 336, 1948. — 23. Tulasne: Comp. Rend. Soc. de Biol., Nr. 3—4, 1949. — 24. Dienes: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 71, 30—33, 1949. — 25. Dienes: J. of Bact. 57, 529—545, 1949.