

Z ústavu pro lékařskou mikrobiologii a immunologii lék. fakulty
Karlovych university v Praze.

Dr František Patočka – Dr Milada Suchanová:

Bakteriální cyklus t. zv. L-forem mikrobů.

Podrobné studium t. zv. primárních L-organismů t. j. mikroorganismů, jejichž prototypem jest *Asterococcus mycoides* a které jsou vyvolavateli kontagiosních chorob zvířecích, nebo alespoň komensály zatím ne zcela určitého významu u zvířat i u člověka, jde ruku v ruce se studiem snad ještě zajímavějších t. zv. L-forem bakteriálních. O těchto lze prozatím těžko říci, zda jsou normální fází životního cyklu mikrobů, u nichž byly prokázány, nebo zda snad jsou adaptací vzniklými variantami, náhodnými a nepravidelně se vyskytujícími. Tolik je o nich jistو, že stavbou i morfologií svých kolonií, vzrůstem v tekutých půdách, kultivačními nároky, morfologií svých jednotlivých elementů i relativní necitlivostí na antibiotika, jsou téměř k nerozeznání podobné primárním L neboli pleuropneumonickým organismům, jež jsou určitě zvláštní skupinou mikroorganismů, snad samostatnější nežli řády Schizomycet. Jsou-li v typickém stadiu adaptovány po několik pasáží na kultivačních půdách, nelze je dosavadními metodami s jistotou poznat od skupiny primární; lze je však snadno diagnostikovati, sledujeme-li jejich vznik z určitého bakteria a pak, jsou-li schopny (což jak se zdá, není absolutně nutným pravidlem), zpětného přechodu do mikroba, z něhož vznikly. Věříme, že toto stadium našich rozpoznávacích potíží je pouze přechodné, neboť ani primární Asterokoky, ani z mikrobů vzniklé L-formy nemohly být dosud pro metodické potíže (zejména malé kvantum získaného materiálu) studovány co do svého metabolismu i do jemného rozboru antigenního

spektra dostatečně hluboce, aby rozdíly mezi oběma skupinami byly již urychlenou diagnostickou procedurou zřetelně patrný.

Ve své první práci v Časopise Lékařů českých č. 52 roč. 1950 jsme zhodnotili stručně i tuto otázku. Pokud můžeme sledovat od této doby odbornou literaturu se zdá, že náhled o L-formách mikrobiálních jakožto parazitech mikrobů, které ničí jejich strukturu a dokonce je i rozpouštějí, byl úplně opuštěn. Zbývá tedy pro jejich výklad jedině supozice vývojového cyklu, o kterém pochopitelně není zatím známo:

1. zda je obligatorní za určitých okolností u všech Schizomycet zejména u ordo Eubacterales,

2. pokud jsou L-formy parasyti vyšších organismů, zejména člověka, zda cyklus může být navozen pouze uměle (zákrokem poněkud násilným – penicilin), nebo zda je schopen spontánně probíhati uvnitř parazitovaného makroorganismu.

Kdyby právě tato okolnost se ukázala pravdivou, byly by podstatnou měrou rozšířeny – i když pouze se strany infekčního činitele, neboť pochopitelně se tím nedotýkáme choroby jakožto celku – naše vědomosti o zvratu některých bakteriálních infekcí do chronického nebo subklinicky probíhajícího stadia, o jejich náhlém vzplanutí v akutní stav a obtížnosti jejich léčení ku př. penicilinem, ale snad i specifickým imunitním zákokrem.

Musíme si tudíž uvědomiti, že L-formy bakterií, i když jsou vzniklé velmi náročné, neboť vyžadují vždy velkého kvanta nativního séra a to ještě jen některých druhů živočišných, většinou také relativně anaerobních podmínek života a pevný substrát, který by podpíral formování jejich kolonií a tedy jsou po této stránce tříš adaptovatelné na kultivační půdy než bakterie, z nichž vznikly, jsou opět na druhé straně v ledacems resistentnější. Tak na př. vesměs jsou necitlivé na penicilin, na streptomycin jsou většinou citlivé, i když ve velmi nestejném rozmezí, ale již dihydrostreptomycin na ně nepůsobí; aureomycin, chloromycetin na některé z nich v menších dávkách působí téměř jako vzniklé faktory a teprve jejich velmi vysoké koncentrace (právě takové, jichž hladiny lze ještě dosáhnouti v lidském organizmu) na ně působí škodlivě. Stejně tak na ně nepůsobí specifické protilátky, jež vznikly antigenním účinkem mikroba, který se v L-formu proměnil, naopak in vitro lze u Salmonell, ale i jiných mikrobů, protilátkou s komplementem dosáhnouti poměrně snadno L-variant. Tomu, že by L-formy bakterií mohly být součástí biologického vývojového cyklu bakterií snad dokonce i in vivo by nasvědčovalo to, že jejich vznik je podporován nejen vlivy fyzikálními, antibiotiky, nebo látkami antiseptického účinku, nýbrž i aminokyselinou glycinem a jak shora řečeno, přirozenými protilátkami.

V souvislosti s L-formami bakterií nelze nevzpomenouti starých, fotografiemi preparátů z kultur doložených prací Kuhnových, i novějších a ovšem více teoretisujících prací Hadleyových, po jejichž opětovné rekapitulaci se

nemůžeme zbavit dojmu, že se oba tito a patrně ještě jiní autoři před nimi s bakteriálními L-formami již setkali. Zvláště první z nich ve změti extrémních bakteriálních variant i involučních forem předkládá útvary, které se nesporně podobají velkým chromatinovým těliskům, filtrovatelným granulím, puchýřovitým formám i vakuolisovaným útvarem v L-koloniích. Bude úkolem jednoho z nás, aby si ověřil, do jaké míry vlastně tito autoři sledovali skutečnou přeměnu bakterií do L-forem.

Pokusili jsme se o vyvolání bakteriálních L-forem u rodu *Hemophilus*. Do pokusu jsme zařadili celkem sedm kmenů a to čtyři kmeny *H. hemolyticus*, dva kmeny *H. suis* a jeden kmen *H. influenzae*. K volbě tohoto rodu přivedly nás první kmen hemolytického hemofila (kmen Sf), isolovaný na jaře 1950 z epidemie nasopharyngitid, který spontánně v primokulturách vytvářel velké sferoidní útvary, připomínající velká kulatá tělska, jak je známe z kultur lidských primárních L-organismů.

Všechny tyto kmeny hemolytického hemofila, jež byly v této sezóně pravidelným nálezem u lidí trpících horečnatým onemocněním horních cest dýchacích chřipkového rázu, byly přesně identifikovány co do svých biologických vlastností. Nalezeno, že odpovídají Hemofilum svými obligatorními nároky na DPN i hematin a nikdy nechybějící redukcí nitrátů. Indol většinou kmenů nebyl produkován, fermentace cukrů variabilní. Nejlépe rostly na čokoládovém agaru a v bujonu s defibrinovanou králičí krví. Jejich morfologie v primokulturách byla nesmírně bizarní, neboť primokultura většinou sestávala ze sleti vláken a sferoidů, které rozměry a bizarností daleko překračovaly meze variability, jež jsou u Hemofilů z pathologických produktů obvyklé. Jejich nápadnou vlastností byla extrémní citlivost na penicilin, v experimentu na zvířeti pouze jeden kmen usmrcoval myšku intraperitoneálně. Kmeny *H. suis* byly isolovány z případů t. zv. vepřové chřipky a celkem odpovídaly běžnému popisu. I tyto byly citlivé, byť i méně, na penicilin.

Měkký, čokoládový agar o pH 7,8 s 20% koňského inaktivovaného sera a s 10% kvasnicového výtažku jsme masivně naočkovali zkoušenými kmeny, uprostřed plotny kolmo k očkovacím čarám jsme vedli mělkou rýhu a do ní vkláli 2 – 3 kapky 2000 j. roztoku penicilinu. Plotny jsme inkubovali anaerobně Fortnerovou metodou při 37° C a otvírali po 24 hod., 48 hod., pak třetí, čtvrtý až devátý den (metoda Dienesova).

Všechny kmeny byly citlivé na tuto koncentraci penicilinu, inhibiční zóna byla však různě široká. Nejšířší byla u hemolytických kmenů. Mezi zonou úplné inhibice a zonou normálních kolonií bylo přechodné pásmo, tvořené zcela drobnými koloniemi. Toto pásmo bylo též u různých kmenů různě široké, u *H. influenzae* úplně chybělo, takže hranice mezi zonou úplné inhibice a normálními koloniemi byla ostrá. Při každém otevření plotny jsme z této přechodné zony dělali otiskové preparáty a místa s koloniemi, makroskopicky nejvíce připomínající L-kolonií, jsme vyříznutým agarovým

blokem přeočkovali na další plotnu, podobně upravenou jako plotna výchozí.

V otiskovém preparátu z přechodné zony jsme viděli často kolonie, kde kromě normálních tyčinek hemofila byla již i velká kulatá tělíska (obr. 3). Několikrát u kmene Sf (hemophilus hemolyticky z jarní epidemie) a u kmene č. 14 (*H. suis*) jsme pozorovali kolonie složené ze samých velkých kulatých tělisek, tedy L-kolonie a to již po 24 hod. inkubace, které však neměly typické hutné centrum (obr. 4). Kolonie ze sousedních míst a podobného vzhledu jsme přeočkovali agarovým blokem na další plotny. Pasáž se nám podařila z kmene Sf až z plotny čtyři a šest dní staré a takto získané L-kolonie, označené jako Sf 4 a Sf 6 měly již typický střed, jak jej popisujeme u primárních L-organismů (obr. 4, 5).

Tyto kolonie se však přece trochu lišily od kolonií našich kmén lidských primárních L organismů tím, že střed nikdy nebyl tak hutný, jakoby bez struktury, jak to vídáme u primárních L-organismů, ani jeho hranice proti periferii tak ostrá. Tento rozdíl vynikl zejména později v pasážích při srovnávání 48 hod. kultur primárních L-organismů a bakteriální L-formy. Kolonie samy se však skládaly z týchž elementů jako u primárních L-organismů t. j. z velkých kulatých tělisek s různým obsahem chromatinu a v různém stupni vakuolisace a drobných kokobacilárních granul.

Nepřímým průkazem chromatinového substrátu methodou kyselé hydrolyzy s následným dobarvením Giemsou jsme zjistili dosti četná drobná kokobacilární tělíska na hranici viditelnosti dobrým mikroskopem jak ve sféroidech, vytvářených tímto kménem spontánně, tak i ve velkých kulatých těliskách jeho L-formy, ale i ve velkých kulatých těliskách našich kmén primárních L-organismů a to podobně uložená. Zdá se, že i drobná kokobacilární tělíska volně uložená mimo velké elementy se skládají většinou z nukleoproteinů, jež jsou typické pro jaderný chromatin. Pokus budeme opakovat ve větších rozměrech tak, aby závěry z něj plynoucí objasnily vztah mezi desoxyribonukleinovou kyselinou a filtrovatelnými elementárními tělisky, jež jsou nejmenší reprodukční jednotkou těchto zvláštních mikrobiálních forem.

Oba L-kmeny (Sf 4 i Sf 6) se nám podařilo pasážovat na tuhých i tekutých půdách a to kmen Sf 6 12krát, kmen Sf 4 20krát. Rostly dobře, v tekutých půdách neviditelně, výjimečně ve formě jemných granulek na stěnách zkumavky, ale zvratu v normální hemofilové tyčinky se nám nepodařilo docílit ani po zavedení nejrozmanitějších modifikací v úpravě půd snad proto, že seriových pasáží tekutými půdami bylo poměrně málo. Velmi pravděpodobně šlo o t. zv. A typ bakteriální L-formy, který je jemnější, tvorí mnohem menší kolonie a je po všech stránkách mnohem blíže primárním pleuropneumonickým organismům. Jeho zvrat na mikroba, z něhož vznikl, se daří buď jen po velmi dlouhé řadě pasáží nebo vůbec ne.

Mohutnější rostoucí typ B, zhusta přicházející u transformovaných Sal.

monell, ale též u Protea, má daleko blíže k mikrobu, z nějž vzešel, může odštěpovat kolonie A typu, ale sám je udržován v L-fázi více méně jenom násilím, neboť jakmile je přeočkován na půdu bez penicilinu, vrací se prý již po jedné generaci do výchozí baciární formy. Toto je tvrzení Dienesovo, které my nepovažujeme za dokázанé. Nám se spíše zdá, že to, co citovaný autor uvádí jako typ B, jsou asi přechodné nehotové L-kolonie, které obsahují obojí elementy t. j. ony charakteristické pro L-formu i pro mikroba, z něhož vznikají i když poslední elementy jsou zřetelně na ústupu. Tyto intermediérní transformační fáze, jak se i nám podařilo u našich Hemofilů prokázati, se mění na půdách bez penicilinu ihned na typické bakteriální kolonie.

U kmene *H. suis* čís. 14 se nám podařilo touto metodou získat bakteriální L-formu a pasážovat ji. Tento kmen spontánně netvořil sferoidní útvary, avšak vlivem penicilinu se počaly objevovat v normálních koloniích i v kulturách v tekutých půdách. Kolonie na výchozí plotně měly podobný vzhled jako u kmenů Sf 4 a Sf 6, podařilo se nám je pasážovat z plotny šest dní staré na tuhých půdách, ale jen dvakrát. V první pasáži jsme použili penicilinu, ve druhé vyrostly na půdě bez penicilinu ve zvláště jemných koloniích (asi 0,05 mm) plochých, stále bez typického centra, skládajících se z velkých kulatých tělisek značně vakuolisovaných. Vyrůstaly později než kmeny Sf (za šest dní). Další pasáž se nepodařila.

Změna normálních bakteriálních jedinců v L-formu záleží, jak se zatím zdá, jak na koncentraci penicilinu t. j. vzdálenosti od zdroje, tak i na čase, neboť jsme viděli již za 24 hodin i kolonie smíšené i čisté L-kolonie, které byly uloženy zpravidla blíže rýhy s penicilinem. Přeočkovat se nám však podařilo vždy až kolonie starší (čtyř a šestidenní).

U ostatních kmenů se nám nepodařilo docílit L-form. Nepozorovali jsme u nich také tvorbu sferoidních útvarů ani spontánně, ani vlivem penicilinu.

V další práci budeme se snažit získat L-formy ze zástupců nejrůznějších čeledí a sledovat jejich eventuelní morfologické a růstové odlišnosti od primárních L-organismů. Podaří-li se nám získat lepší a zejména difusní růst v tekutých půdách, pokusíme se o výzkum jejich antigenních vztahů jednak k mateřskému organismu jednak k ostatním bakteriálním L-formám navzájem a k primárním L-organismům.

Souhrn.

Autoři popisují přeměnu dvou kmenů hemolytického hemofila a jednoho kmena *H. suis* na t. zv. bakteriální L-varianty a to vlivem penicilinu.

Transformace byla docílena na čokoládovém agaru, v němž z centrálního šlábku difundoval do hemofilem naočkováné plotny zředěný penicilin. Na přechodu mezi sterilní zonou a pásmem normálního růstu bakterií

vyrůstly po několika dnech kolonie, v nichž postupně zastíženy jednotlivé přechodní fáze od kolonií hemofila přes smíšené kolonie, obsahující ještě typické hemofily ale i elementy charakteristické pro L-formy, až k zcela čistým L-koloním.

Typické L-kolonie po ještě jedné pasáži na půdě s penicilinem se ukázaly být i na optimálním čokoládovém agaru (bez antibiotika) stálou a neměnnou variantou, jež mohla být udržována až i v dvaceti pasážích.

Spontánní zvrat na hemofila u námi pozorovaných mikrobů nenastal. *H. haemolyticus*, jež mohl být nejsnáze transformován na v našich poměrech neměnnou variantu, byl primárně stigmatisován tím, že primokultura obsahovala velké množství zduřenin v průběhu bakteriálních vláken i samostatných sferoidů. Zdá se, že takové kmeny bakteriální jsou zvláště vhodné a patrně i schopné přeměny v L-varianty.

V práci se diskutuje možný význam L-variant v průběhu infekce in vivo.

Заключение.

Авторы описывают превращение двух штаммов *Haemophilus haemolyticus* и одного штамма *H. suis* под влиянием пенициллина в так называемые бактериальные Л-варианты.

Трансформации добились авторы на шоколадном агаре, в котором из центрального желобка дифундировал разжиженный пенициллин в питательную среду с посевом культуры *Haemophilus*. На переходе между стерильной зоной и нормальной зоной роста бактерий выросли, несколько дней спустя, колонии, в которых были постепенно обнаружены отдельные переходные фазы: колонии *Haemophilus*, смешанные колонии, содержащие еще типические культуры *Haemophilus*, но тоже элементы характеристические для Л-форм, и совсем чистые Л-колонии.

Типические Л-колонии после одного пересева на питательную среду с пенициллином оказались тоже на оптимальном шоколадном агаре (без антибиотиков) постоянным, неизменчивым вариантом, который мог сохраняться и в двадцати пересевах.

Спонтанное превращение в культуру *Haemophilus* не было у нами исследованных микробов обнаружено. *Haemophilus haemolyticus* который самым легким образом трансформировался в постоянный вариант при этих условиях, был примарно стигматизирован тем, что примокультура содержала большое количество опухolej v hodu bakteriálních vláken i samostojatelných sferoidov. Kajetse, cto bakteriálníe štammy etogo roda osobenně podchodyt, i cto oni otvetidvo способni k spontanní peremene v L-variantu.

В реферате рассматривается возможное значение L-вариантов в ходу инфекции *in vivo*.

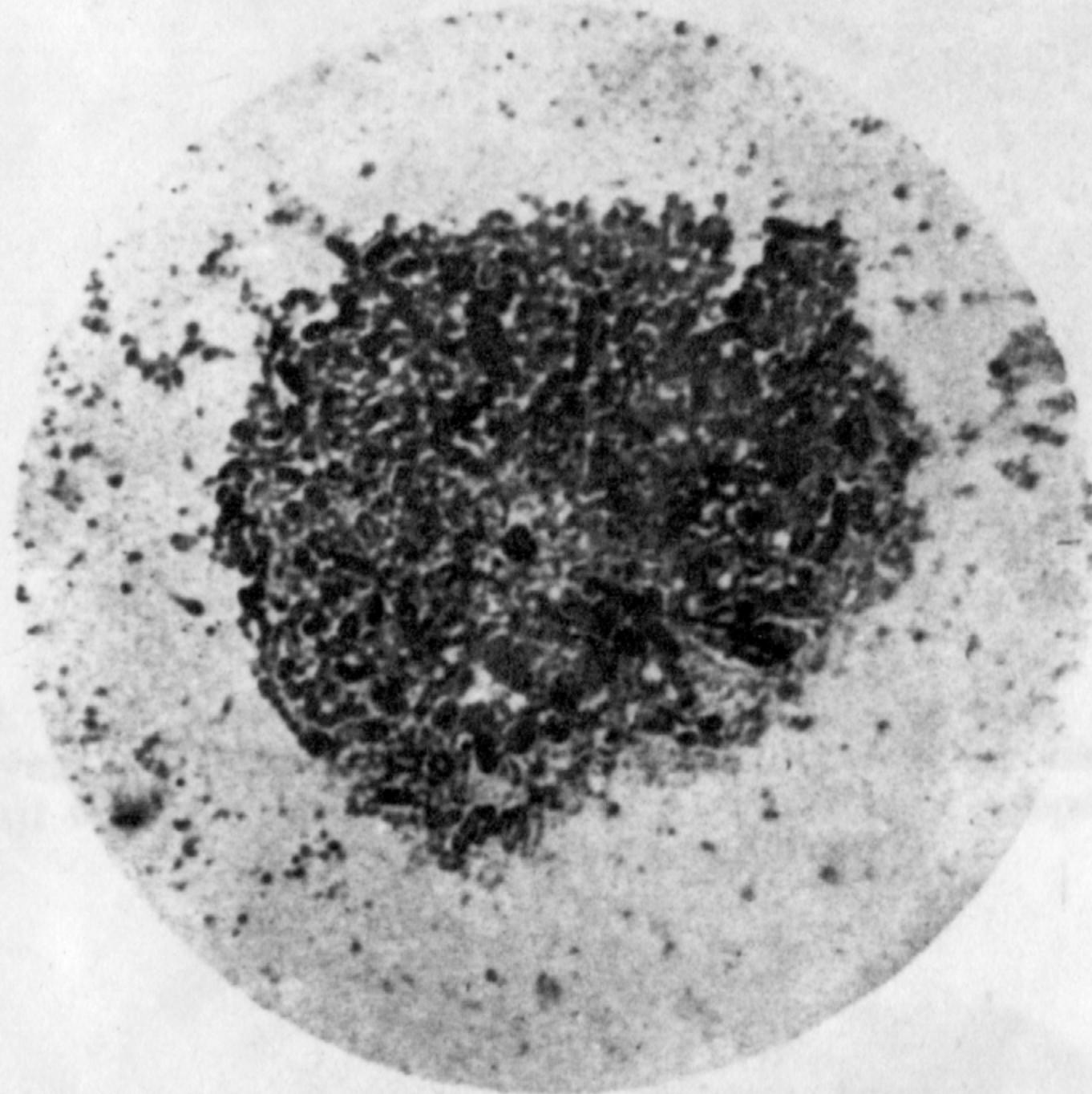
Dr František Patočka — Dr Milada Suchanová:

Bakteriální cyklus t. zv. L-forem mikrobů.



Obr. 1. Normální preparát z kultury *Hemophila*, barvený Gramem. Mimo tyčinkovité normální tvary jsou na obrázku patrný velké sytě zbarvené sferoidní útvary, spontánně vytvořené. (Zvětšeno $1050\times$.)

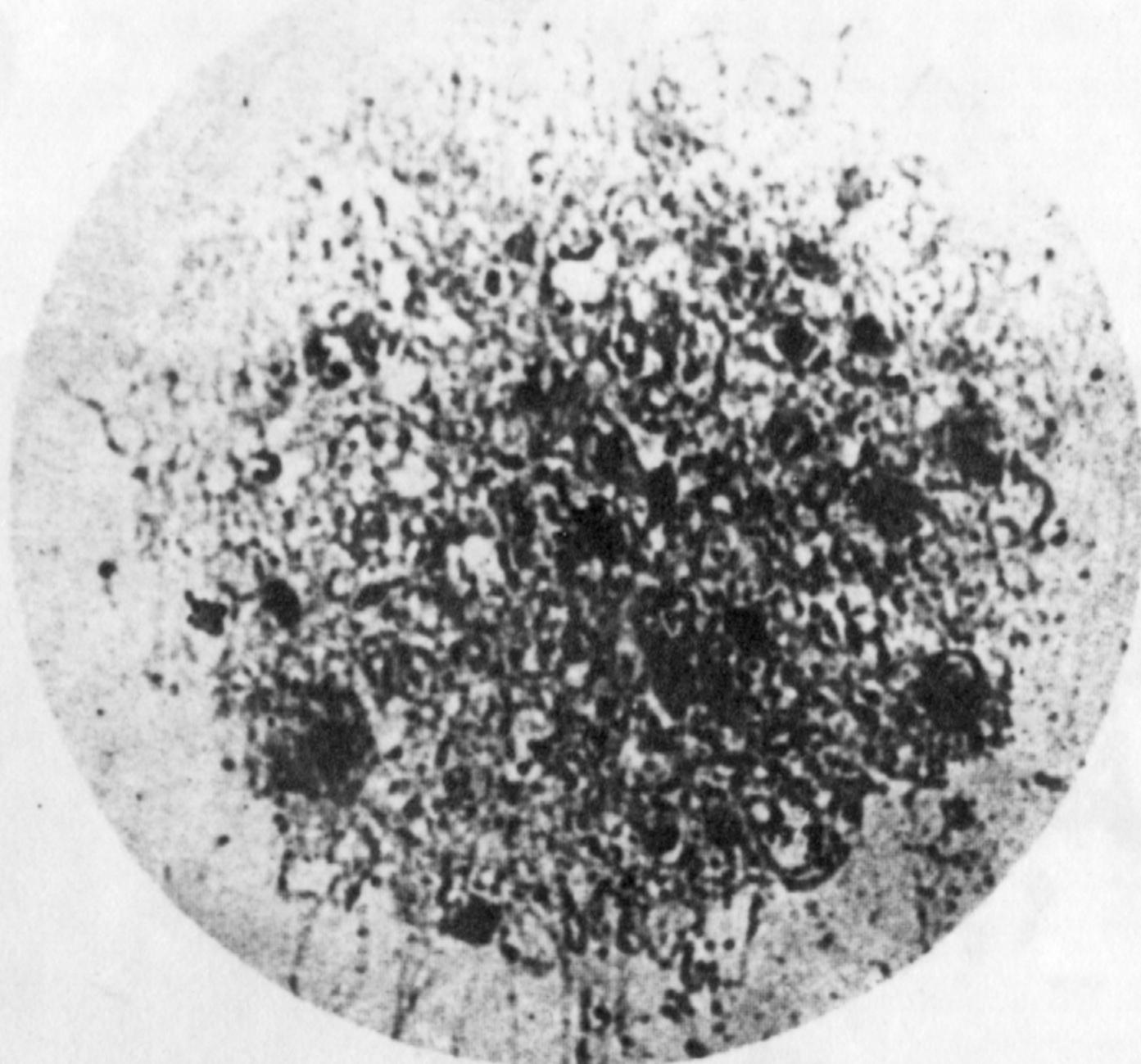
Dr František Patočka — Dr Milada Suchanová:
Bakteriální cyklus t. zv. L-forem mikrobů.



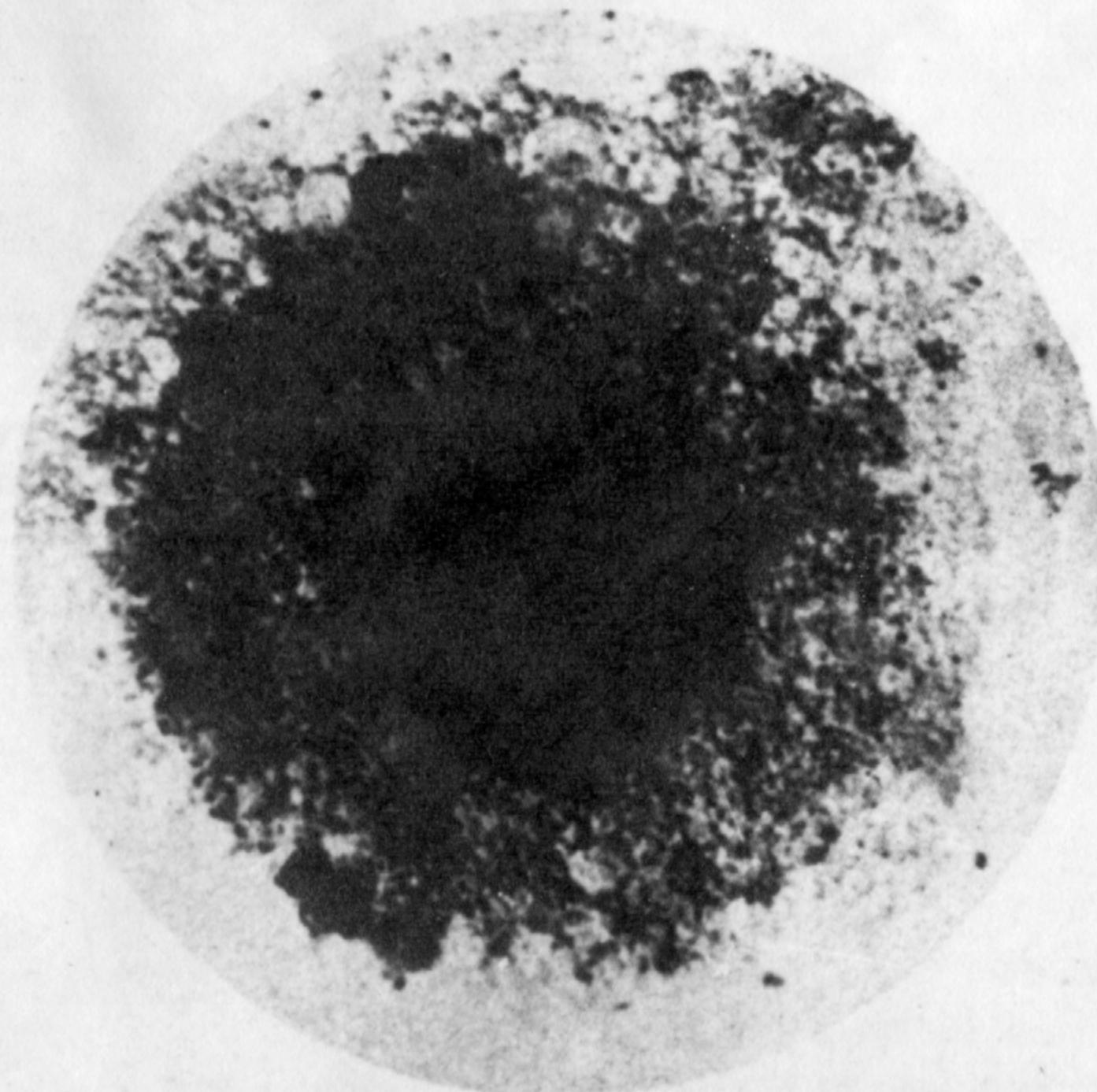
Obr. 3. Přechodná forma mezi normální bakteriální kolonií a bakteriální L formou Hemophila z obr. 1, kde mezi normálními tyčinkami vidíme větší množství velkých kulatých tělisek, místy s dobře se barvícími chromatinovými hmotami. (Otiskový preparát barvený Giemsou, zvětšeno 500×.)

Dr František Patočka — Dr Milada Suchanová:

Bakteriální cyklus t. zv. L-formem mikrobů.



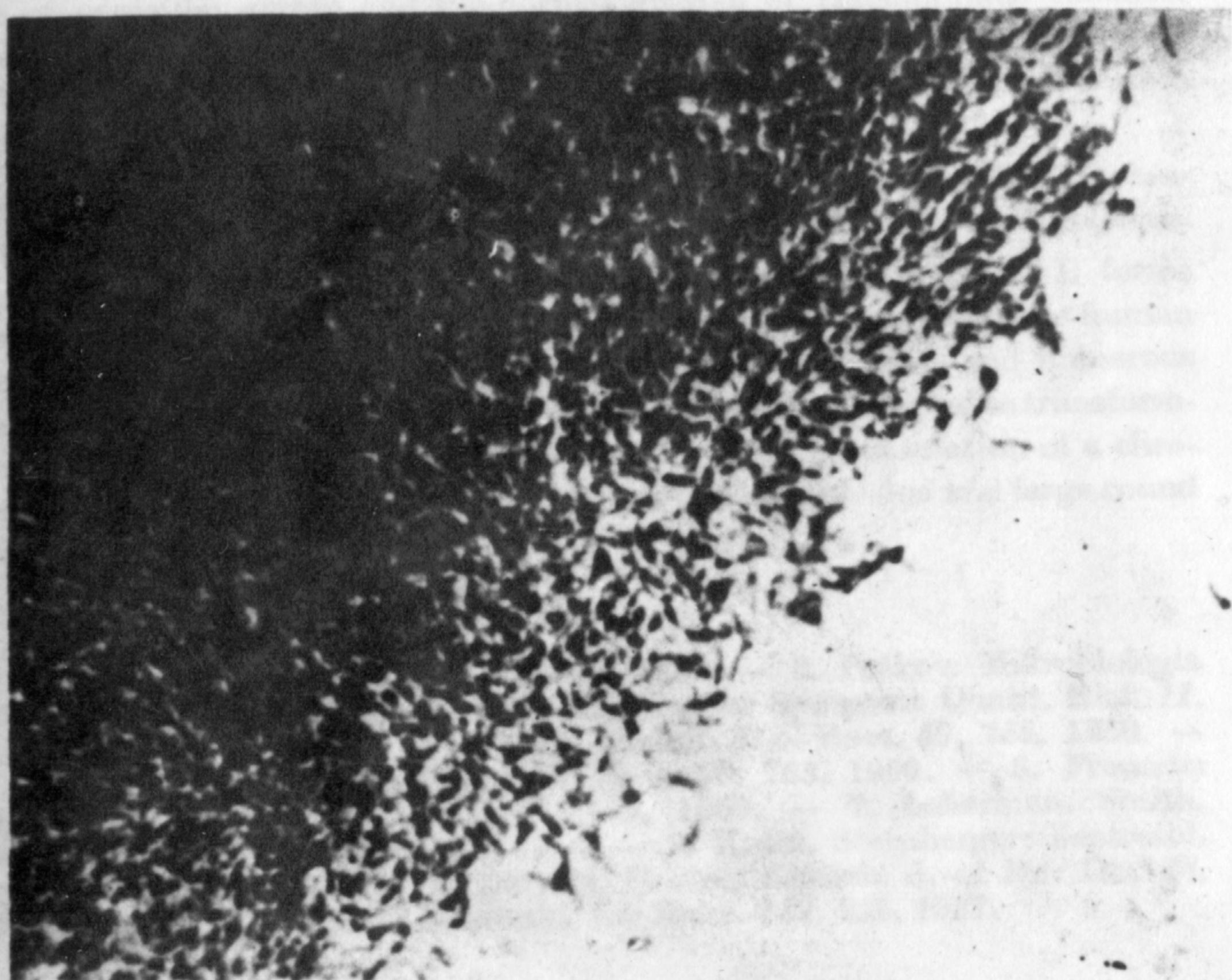
Obr. 4. L kolonie odvozená z Hemophila z obr. 1, skládající se pouze z velkých kulatých tělisek, většinou hodně vakuolisovaných. Jen některá obsahují větší množství chromatinu. (Otiskový preparát barvený Giemsou, zvětšeno $500\times$.)



Obr. 5. Typická bakteriální L kolonie s hutným centrem a krajkovitou periferií, vzniklá přeočkováním kolonie z předchozího obrázku. (Otiskový preparát barvený Giemsou, zvětšeno $500\times$.)

Dr František Patočka — Dr Milada Suchanová:

Bakteriální cyklus t. zv. L-formem mikrobů.



Obr. 2. Otiskový preparát normální kolonie téhož Hemophila, barvený Giemsou. Tu a tam lze viděti spontánně vytvořené velké sferoidní útvary.
(Zvětšeno 1050×.)

Summary.

The authors describe the production of L forms by 2 strains of *Haemophilus haemolyticus* and one strain of *Haemophilus suis* in the presence of penicillin.

The production of L type colonies occurred on chocolate agar plates with a central hole for penicillin. L forms grew on the border of the sterile zone of penicillin action and the normal growth of *Haemophilus* colonies. It could be shown by the method of wet stained preparations that among the L forms all stages of transition from mixed colonies to pure L forms were present.

Typical L form colonies were completely stable in subculture for 20 passages. The original bacterial colonies were never regained from the L colonies.

All strains of *Haemophilus haemolyticus* which produced L forms most easily had a peculiar appearance on primary isolation from the human throat: between the bacillary forms were atypical threads and numerous spheroids. It seems that such cultures are exceedingly disposed to transformation into L forms. Robinow's method showed an accumulation of a chromatin-like substance in both, i. e. spheroids of *Haemophilae* and large round bodies of L forms.

Písemnictví:

1. Patočka, Suchanová: ČLČ č. 52, 1950. — 2. Peškov: Mikrobiologia XV, 363, 1946. — 3. Dienes: Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 11, 51—59, 1946. — 4. Dienes, Weiberger, Madoff: J. of Bact. 59, 755, 1950. — 5. Weinberger, Madoff, Dienes: J. of Bact. 59, 765, 1950. — 6. Freundt: Acta Pathologica Scandinavica 27, 159, 1950. — 7. Leberman, Smith, Morton: J. of Urology 64, No 1, 1950. — 8. Kuhn, Sternberger: Zentralbl. für Bakt. 21, 113, 1931. — 9. Hadley, Delves, Klimek: J. of Inf. Dis. 48, 1—159, 1931. — 10. Preisz: Zentralbl. für Bakt. 139, 225, 1937.