

Československá hygiena, epidemiologie, mikrobiologie

ROČNÍK II.

ŘÍJEN 1953

ČÍSLO 5

PŮVODNÍ PRÁCE

(Z ústavu pro lékařskou mikrobiologii a imunologii lékařské fakulty
Karlových varů)

LISTERIOVÉ INFEKCE NOVOROZENCŮ

DR PATOČKA — DR BENDA za spolupráce J. STÁRKY

Listeria monocytogenes, vyvolavatel enzootických a epizootických zvířecích infektů, je podrobně prostudována a klasifikována jako samostatný druh přibližně od r. 1926 (Murray, Webb, Swann). (1) Tito autoři ji isolovali jako nahodilou infekci u králíků a hned při té příležitosti zaznamenali její zvláštní schopnost, vyvolávat při přirozené i umělé infekci význačnou monocytosu.

Krátce nato provedl Pirie (2) její definitivní pojmenování a provisorní zařazení, takže dnes ji podle Bergeyovy soustavy vedena jako zvláštní rod Listeria z čeledi Corynebacterium. Krasilnikov (3) jasně cíti její odlišnost od korynebakterií (podle našeho názoru zejména přítomnost bičíků a tím i flagelárního antigenu ji od těchto odlišuje) a klade ji provisorně do skupiny bakterií, jejichž klasifikace je prozatím nemožná. Málek (4) podle všeho uznává podobnost listerie s korynebakteriemi, ale uvádí, že je nutno s týmž ji pokládat za zvláštní rod v řádu Actinomycetales. Topley a Wilson považují Listeria a Erysipelothonix za týž rod — to však lze podle našich zkušeností ztěží potvrdit. Podle našeho názoru je definitivní taxonomie listerie otázkou dalšího prohloubeného studia, ale potvrzujeme, že její podobnost s korynebakteriemi je na první pohled velmi nápadná, takže méně zkušení mikrobiologové ji při prvném nálezu diagnostikují pravidelně jako Corynebacterium (etiologický činitel ze dvou prvních případů novorozeneckých listerios v Československu byl na dvou pracovištích nezávisle na sobě prima vista diagnostikován jako atypické Corynebacterium pyogenes).

Během jednoho desíletí (od roku 1926) se ukázalo, že Listeria monocytogenes je velmi rozšířeným zvířecím parazitem, postihujícím nejenom hlodavce, nýbrž i větší zvířata, zvláště ovce, kozy, hovězí dobytek, vepřový brav, fretky, také však i domestikované a divoce žijící ptactvo.

Není možno v této práci ani přibližně zhodnotit dosavadní ohromnou literaturu o pathogenní roli listerií u zvířat, je však pouze jisté, že se

v některých zemích listeriosy užitkových zvířat čas od času stávají důležitým národní hospodářským problémem.

U nás nověji upozornil na možnost zvířecích infekcí listerii Koppel, Nižnansky a Stricker (5), v jejichž přehledném článku najde čtenář také velmi úplnou literaturu. Chudá osobní zkušenost autorů (průkaz listeriové infekce u dvou slepic) však téměř nepochopitelně kontrastuje svou nečetností s našimi poměrně hojnými nálezy u lidí.

Pro naše thema je velmi závažná práce Olsonova (6), který jasně prokázal vztah listeriové infekce u ovce a skotu ke genitálnímu traktu samic tím, že ji v několika případech vyisoloval v čisté kultuře z blan fetů a z očistků.

Podle všeho se zdá, že u větších a dospělých zvířat — kromě zmíněných infekcí gravidního uteru — vyvolává *Listeria* nejčastěji meningoencephalitidy. Naproti tomu u malých zvířat, zejména u hlodavců, mláďat nebo novorozených domestikovaných ssavců, dochází k septikemii s tvorbou hojných miliárních nekros nebo abscesů, a to hlavně v játrech, v myokardu a nadledvinkách.

Nejúplnejší přehled listeriových infekcií u zvířat je podán v monografii Sacharova a Gudkové (7), kteří rozeznávají tři hlavní formy spontánních infekcií zvířat divoce žijících, domestikovaných i laboratorních hlodavců:

1. Formy akutní, vyskytující se v epizootiích většinou septikemického charakteru.
2. Subakutní, které probíhají buď jako meningoencephalitidy, nebo metritidy vedoucí k abortům nebo i sterilitě samic.
3. Formy chronické, klinicky patrné většinou jako forma druhá.

Poměrně často uvádějí autoři chronické subklinické infekce, vyskytující se většinou jako ohniskové nákazy a zachvacující mimo jiné divoké myši a vodní krysy, které jsou snad přirodním reservoárem listerii. K infekci domácích zvířat dochází podle autorů většinou kontaktem s divokými zvířaty a nákazy lidské jsou podle nich pravidelně zoonosami. Autori naznačují možnost přenosu listerii krev sajícím hmyzem, zejména klíšťaty, z nichž se podařilo listerie izolovat.

Naše vědomosti o listeriosách lidských až do nedávna ukazovaly hlavně dvě skupiny infektů:

Prvá zahrnovala nesporně zoonotické infekce, často profesionálního charakteru. Klinicky se projevují většinou jako meningitidy nebo meningoencephalitidy, vzácněji hnisavé otitidy a rhinitidy. Z oněch zejména meningoencephalitidy bývají následek poranění (Sacharov a Gudkova, Julianelle [8]). Dnes již několik desítek takových případů bylo ve světové literatuře popsáno a rozebráno.

Zvláštní pozornosti si zaslouží případy popsané Pletněvou a Stiksovou (9), které klinicky probíhaly k nerozeznání podobně okuloglandulární formě tularemie.

V druhé skupině lidských infekcí není prozatím jasno, zda je *Listeria* primárním ethiologickým činitelem nebo synergisticky spolupůsobícím mikrobem, vyvolávajícím v symbiose s blíže neznámým virusem teprve charakteristický a úplný klinický obraz. Tím miníme (dosud zčásti záhadný) obraz t. zv. infekční lidské mononukleosy. Zdá se, že to byl Nyfeldt (10), který ukázal na listerii jakožto možné ethiologické agens uvedené nemoci. Zvláště těžkou formou septické anginy listeriové ethiologie, klinicky upomínající na skvrnivku a tvorící jakýsi přechod k banální formě listeriové mononukleosy, jsou případy popsané Bilibinem (11). Z našich autorů sdílí Nyfeldtův názor Málek (12) na základě vlastního a jistě sugestivního

případu. Řada cizích autorů potvrzuje uvedené názory, většina však uvádí negativní nález a tvrdí, že infekční mononukleosa je virovou chorobou.

Důležitou a problém shrnující je práce Stanleyova (13), která na základě pečlivého vyšetření dvaceti případů infekční mononukleosy potvrzuje, že je pouze část jich listeriového původu a ty lze dobře prokázat aglutinační reakcí s listerií. Další část případů infekční mononukleosy je působena pravděpodobně virusem bez spoluúčinku listerie. Konečně třetí skupina této nemoci zůstává ethiologicky zcela neznámou. Velkým kladem Stanleyových experimentů je to, že se mu podařilo z těl *Listeria monocytogenes* extrahovat chloroformem lipoidní výtažek (MIP), který resuspendován ve fysiologickém roztoku a vstříknut králikovi intravenosně vyvolává význačnou monocytosu, analogickou té, která je způsobena subletální infekcí téhož zvířete listerií. Tento lipoid není jedovatý a nemá antigenní vlastnosti. V těle mikroba je nepochybně vázán na jedovatou polysacharidovou frakci a svým účinkem na hematopoetické orgány je podobný fosfatidům z těl Kochových bacilů (sám o sobě tento nález znamenitě potvrzuje příbuznost listerií s mykobakteriemi, a tedy i jejich zařazení bliže k aktinomycetám).

K těmto dvěma dosavadním nutno dále a s definitivní platností připojit třetí skupinu listeriových infekcí, kterou je patrně možno označit za relativně nejčastější. Sem patří z největší části smrtelná onemocnění předčasně narozených lidských plodů nebo infekce novorozenců, jejichž pathogenese není zcela jasná, ale podle všeho je prenatálního původu, nepravděpodobněji hematogenní cestou z matky. Společným charakteristikem této skupiny je záludnost procesu, neboť předcházející infekce matek je jen v ojedinělých případech prokázána, většinou jde u nich o nákazy minimální, subklinické, nebo dokonce inaparentní. Přesto, že pravděpodobná infekce matky je tak lehkého rázu, že ve většině případů zůstává nepovšimnuta a ani porodním aktem se pravidelně nehorší, je lidský plod postižen velmi těžce, obvykle generalisovanou infekcí septického rázu, výrazně se projevující granulomatosními abscesy v játrech, někdy i ve slezině a v nadledvinkách. Při masivní kontaminaci plodových vod dochází i ke kožní erupci (jeden z našich případů), k ložiskům pneumonickým a nekrotisujícím enteritidám (snad z napolykané plodové vody). Komplikace meningitické a meningoencefalitické jsou zde vzácnější, ale byly prokázány. Předčasná odumrť plodu a potrat je běžným zjevem. V určité části případů však se rodí dítě úplně donošené a umírá v několika málo hodinách nebo dnech po narození. Na základě jednoho vlastního případu nevylučujeme, že se může narodit dítě s tak mírnou formou infekce, že je lze včasným léčebným zákrokem zachránit.

Je téměř neuvěřitelnou, že tento nápadný kontrast mezi mitigovanou nebo zcela inaparentní infekcí matky a smrtelným postižením plodu zůstal až do dneška pathogeneticky nevyjasněn, tím spíše, že prvé případy tohoto druhu (jak lze ex post s pravděpodobností dedukovat z tehdejších nedokonalých bakteriologických popisů) byly publikovány již začátkem tohoto století. Dnes lze již těžko prověřit celou literaturu o tomto thematu, zdá se však, že prvé dva případy novorozenecké smrtelné listeriosy, kde autor nejen jako etiologické agens prokázal a označil *Listerellu* a pátral po jejím původu v genitálním traktu a na ostatních sliznicích matky, nýbrž vědomě se pokusil i o epidemiologický průzkum v rodině postižené rodičky, a dokonce hledal u matky protilátkovou odezvu, byly podány Burnem 1935. (14)

Zdá se, že závažnost případu a celé této otázky zůstala nedoceněna, až nověji 1950 Reiss, Krebs, Potel (15) nejprve v ústním, rok potom v písemném a hned nato Seeliger, Jung, Linzenmeier a Odenthal (16) a konečně Leineweber (17) popsali více než dvacet případů podobných, ověřených bakteriologicky, částečně i epidemiologicky. První z německých autorů ovšem z počátku považovali vyvolavatele smrtelných dětských granulomatos za zvláštní agens, které nazvali *Corynebacterium infantisepicum*. Dodatečně však, zejména asi pod vlivem odborné diskuse (Ztrbl. f. Bact. 158, 1952 (18)), uznali svůj omyl a identifikovali všechny dříve uveřejněné i další případy jako listeriosy.

Náš první případ byl zachycen Dr Vackem z I. patholog. anatomického ústavu a jako ethiologické agens určena námi (nezávisle na německých autorech a v té době bez znalosti jejich práce) na podzim 1951 *Listeria monocytogenes*. Zároveň s námi pozorován analogický případ v Brně (19), jehož bakteriologická diagnosa byla učiněna dodatečně pod vlivem našeho nálezu. O případu referováno na jaře a v létě 1952, při čemž i ověřeno, že existenci tří dalších podobných (Dr Benešová) lze pravděpodobně potvrdit mikroskopickou cestou. Do konce roku 1952 zachyceno a komplexně zpracováno celkem 10 případů, jak uvedeny podrobně v následujícím přehledu. Kvůli úplnosti pøidotýkáme, že byly v roce 1953 zjištěny dodnes pouze dvě novorozenecké listeriosy, jejichž rozbor prozatím nepodáváme.

Případ 1. Náhlé úmrtí novorozence tří hodiny po narození. Dítě bylo nedonošené, osmiměsíční, matka (manželka učitele) měla předtím dvě zdravé děti. Poslední těhotenství snášela proti dřívějším těžce, byla malátná a měla silnější výtok. Zvýšené teploty popírá. Sama udává, že pohyby plodu při poslední graviditě byly velmi slabé, taž se často obávala, žežda plod neodumřel. Vylučuje styk s domácími zvířaty. Dítě porozeno na II. porodnické klinice (Dr Štark), pitváno Dr Vackem z I. pathologie. Hlavním nálezem byly pseudotuberkulosní granulomy na játrech. Placenta nebyla zachycena. Z uzlíků založena v laboratériu pathologického ústavu kultura, která nám byla předána k identifikaci. Kromě několika zárodků druhotně infikujících byla námi jako etiologické agens určena *Listeria monocytogenes*. Biologické vlastnosti mikroba jsou spolu s ostatními uvedeny ve zvláštní tabulce. Asi 7 týdnů po porodu jsme se pokusili ex post podchytit zdroj infekce. Kultivace vaginálního sekretu z matky byla na listerii negativní stejně jako sekret z nosohltanu a tonsil. Stejně negativní byl výtěr z tonsil u starších sourozenců a u otce dítěte. U posledního kultivován ještě též sekret prostatický a urethrální, který byl rovněž negativní.

Kmen *Listeria* vypěstovaný z případu 1 byl porovnán co do biologických a později i serologických vlastností s kmenem ze slepice, který nám laskavě přenechal Dr Nižnánsky. Nebylo nalezeno žádných podstatných rozdílů.

Vzhledem k tomu, že pátrání po listerii u matky a v rodině bylo negativní, zkusili jsme si dodatečně ověřit serologickou cestou námi předpokládanou subklinickou infekci matky, neboť bylo možno podle pathologicko anatomického nálezu a rychlé smrti dítěte předpokládat pouze intrauterinní infekci plodu z matky, a to nejspíše hematogenní cestou.

Orientační aglutinace nám nedala uspokojivé výsledky, proto jsme použili v tomto i všech dalších případech reakce fixací komplementu s několika druhy antigenu, jak o nich bude níže zmínka. Fixace byla pozitivní do zředění sera 1:32++ k 1:64++ s nejlépe fungujícím antigenem. Na proti tomu serum u manžela bylo pozitivní pouze 1:8++. V té době jsme samozřejmě ještě neměli zkušenosti s tím, jaký titr sera možno považovat za specificky pozitivní a jaký za podezřelý nebo negativní, ačkoli 20 ser kontrolních dávalo s týmiž antigeny výsledky buď zcela negativní, nebo daleko nižší (asi jako u manžela). Proto jsme seroreakce u matky opakovali ještě jednou po době 3 měsíců po porodu, kdy se ukázalo, že za prakticky stejných podmínek výše titru klesla na polovinu. Z tohoto povolného snižování titru usuzujeme s velikou pravděpodobností, že námi zachycená serologická odezva byla specifická a svědčila o proběhlé infekci matky.

Případ 2. Donošený plod mužského pohlaví zemřel náhle po narození. Ošetřen Dr Trojanovou z Ústavu pro péči o matku a dítě. Pitval Dr Vacek. Maximum změn bylo v plicích, z ložisek isolována listerie v prakticky čisté kultuře. U matky K., dělnice ze Slap, je styk s domácími zvířaty pravděpodobný. Epidemiologicky nezjištěno nic závažného, krev k serologickému vyšetření nedodána.

Případ 3. Náhly porod nedonošeného plodu ženského pohlaví, 2500 g těžkého. Dítě zemřelo 4 dny po narození s klinickou diagnosou bronchopneumonia adnata. Matka P. z Kamenice, v domácnosti, udává těžší průběh konce těhotenství (edémy). V téže době, t. j. asi 2 měsíce před porodem, přestala chřipkové onemocnění s rýmou a bronchitidou, herpesem a teplotou až 39° C. Porod nastal v Krči na odd. prim. Dr France, pitvu provedla Dr Benešová, která našla hlavní změny na játrech podobně jako v případě 1. Z jater vypěstována listerie v čisté kultuře. Styk s domácími zvířaty byl u matky velmi pravděpodobný, po epidemiologické stránce nezjištěno nic závažného. Krev k serologickému vyšetření nedodána.

Případ 4. Uvádíme pouze kvůli úplnosti, ač podle našeho názoru nepatří mezi prenatální infekce listeriemi. Šlo o spontánní porod nedonošeného dítěte (v Krči na odd. prim. France), 2500 g těžkého, matky H z Prahy. Dítě se po narození zdálo zdravé; po několika dnech onemocnělo, zemřelo 10. den. Pitvu zjištěna Dr Benešovou hnisavá meningoencephalitis. Z mozkové suspense vypěstována listerie v čisté kultuře. Matka po úmrtí dítěte vyšetřována zevrubně bakteriologicky, stejně tak i otec: Listeria v žádném případě nezjištěna. Fixace komplementu z krve odebrané 3. den po porodu s listeriovým antigenem byla negativní. Závažným epidemiologickým momentem byla ta okolnost, že dítě bylo ošetřováno na témž pokoji, kde zemřelo předcházející dítě na listeriosu. Ježto nebylo změn v jiných orgánech dítěte a i epidemiologické vyšetření bylo zcela negativní, jsme téměř přesvědčeni, že šlo o postnatální nosokomiální infekci, k níž došlo pravděpodobně kontaktem s případem 3.

Případ 5. Náhlé úmrtí nedonošeného plodu (1700 g) přibližně 16 hod. po narození. Porod v domácnosti (Kamenný Přívoz), dítě zemřelo krátce po převezení do ÚPMD. Pitvu provedl Dr Vacek, listerie vypěstována v čisté kultuře prakticky ze všech orgánů dítěte, dokonce i z hnisavých kožních pustulek. Případ důkladně vyšetřen epidemiologicky v domácnosti matky L. V očistkách, matčině krvi i výtřech z nosu a nosohltanu listerie neprokázána. Stejně negativní byl nález u babičky, žijící ve společné domácnosti s rodičkou. Starší sourozenci bakteriologicky rovněž negativní. Otec dítěte byl v té době v presenční vojenské službě, proto nevyšetřován. Onemocnění zvířat v okolí rodičky neprokázáno, takže výsledek epidemiologického pátrání zůstal negativní. Krev, odebraná matce za 7 týdnů po

porodu, s homologním i heterologním listeriovým antigenem obsahovala vysoký titr protilátek vážicích komplement až do titru 1:256++.

Případ 6. Tento případ byl zachycen na Kladně na porod. oddělení prim. Dr Chmelfka; zemřelé dítě pitváno Dr Benešovou. Šlo o výjimečně zajímavou záležitost tím, že porozena dvojčata ženského pohlaví, z nichž první, vážící 2150 g zůstalo na živu, druhé vážící 2200 g narozeno asfyktické a zemřelo za necelých 5 hod. po narození. Při pitvě kromě jiných změn nalezena zejména význačná pseudomembranosa kolitida, z níž vypěstována *Listeria monocytogenes*. Epidemiologicky nezjištěno nic podezřelého, výtěr u matky, manžela i babičky negativní. Matka H. popírá jakýkoli kontakt s domácími zvířaty, ale udává, že 3 týdny před porodem měla veliké bolesti v břiše, kříži, silný výtok a zvýšenou temperaturu, která dva dny před porodem dosáhla až 39° C. Vzhledem k tomu, že i přeživší dítě bylo suspektní ze subklinické infekce listerií, zahájena u něho hned léčba penicilinem, dodatečně (po kultivačním zjištění listerie u zemřelého sourozence) i streptomycinem. Léčené dítě zůstalo zdrávo a bez zřetelných chorobných příznaků. Serologické vyšetření matky ukázalo 15 dní po porodu pozitivní kompl. fixační reakci s homologním a heterologním listeriovým antigenem do zředění 1:128+++. 11 týdnů poté serologické reakce opakovány, při čemž titr klesl na zředění sera 1:32+++. Serum přeživšího dítěte vyšetřováno ve stejných intervalech při čemž 1. titr byl pozitivní ve zředění 1:20++, druhý 1:2+++.

Případ 7. Lehce přenošený plod vážící 2700 g porozen spontánně a překotně v porodnickém ústavu v Praze XIX. Po dvou dnech dítě zemřelo; bylo pitváno Dr Vackem. Prakticky ve všech orgánech nalezeny změny. *Listeria monocytogenes* vypěstována z plic a z nadledvinek (ostatní orgány masivně kontaminovány). Matka, úřednice z Prahy, vylučuje jakýkoli kontakt se zvířaty. Udává, že týden před porodem prožila chřipkové onemocnění s teplotou až 38,2° C. Výtěry z matčiných sлизnic a genitálu negativní. Krev odebrána 13. den po porodu, v seru prokázán titr fixačních protilátek do zředění 1:128++.

Případ 8. Porod mrtvě narozeného macerovaného plodu, vážícího 3000 g, na porodnickém oddělení nemocnice v Ml. Boleslaví. Případ, který pitvala Dr Benešová, je pro nás velmi důležitý tím, že zde po první byla zachycena i placenta. Prakticky ze všech pathologicky změněných orgánů plodu i z placenty, v které již makroskopicky byly viditelné drobné abscesy, vypěstována *Listeria m.* Zajímavý byl mikroskopický nález z placenty, v níž kromě typických tyčinek listerií — nalezena gram+ granulka velmi proměnlivých rozměrů až k formám na hranici viditelnosti laboratorním mikroskopem. Zřejmě šlo o rozpadové formy listerie, z nichž určitě některé byly pouze rozměrů velkých filtrovatelných virusů. Z očistek matky odebraných 3. den po porodu vypěstována *Listeria*. Bakteriologické vyšetření rodiny (manžel, babička) negativní. Matka vylučuje jakýkoli kontakt s domácími zvířaty. Serum, odebrané rovněž třetí den po porodu, ukázalo nízký titr protilátek ve zředění 1:16++.

Případ 9. Šlo o potrat mrtvě narozeného, macerovaného plodu, vážícího 900 g, v nemocnici v Příbrami. Pitvu provedla Dr Benešová, která zjistila téměř ve všech orgánech změny, zejména v játrech a plicích. Rovněž zde placenta zachycena. Ze všech tří uvedených orgánů vypěstována *Listeria*. U matky (učitelky), která popírá jakýkoli kontakt se zvířaty, vznikla několik dnů před potratem akutní hnědavá cystopyelitida, která byla v době našeho vyšetřování v regresi po masivní terapii, takže z moči *Listeria* nevypěstována. Bakteriologické vyšetření sliznic matky negativní. Její serum vyšetřované 4. den po porodu ukázalo vysoký titr proti antigenu z listerie ve zředění 1:128++.

Případ 10. Porod klinicky zdravého dítěte, váhy 3400 g, v Krči na odd. prim. Dr France. Úmrtí dítěte 5. den po narození s klinickou diagnosou bronchopneumonie. Pitvala Dr Benešová, která nalezla mimo jiné pneumonické změny na plicích a drobná ložiska nekros na játrech. Listeria zachycena z jater v čisté kultuře. Matka dělnice z Prahy udává z doby několika týdnů před porodem katar horních cest dýchacích; vylučuje kontakt se zvířaty. Kultivace výtěrů z nosohltanu a z očistek matky negativní. Krev odebrána začátkem druhého týdne po porodu, v seru prokázány protilátky do ředění 1:128++.

Z přehledu našich případů je patrné, že ve všech byla jako ethiologické agens prokázána bez nesnáší Listeria monocytogenes. Kultivace tohoto mikroba je celkem snadná a právě tak jeho diagnosa, zejména pokud se na ni myslí. Přehled biologických vlastností všech našich kmenů podáváme v přehledné tabulce, z níž je patrné, že se nejenom lidské kmeny nijak podstatně od sebe neliší, nýbrž že jsou i prakticky shodné s kmenem zvířecím (ze slepice), isolovaným Dr Nižnánským. Pro mikrobiologa, který dosud s listerií nepracoval, zdůrazňujeme nutnost pátrání hlavně po těchto vlastnostech bakteria:

1. Tvar jemného, krátkého korynebakteria, velmi typickým způsobem pohyblivého (přemety a trhavé pohyby, hlavně kolem příčné osy mikroba) v kulturách vyrostlých za chladu.

2. Úzká zona beta-hemolysy, zřetelně se zvětšující a projasňující za přítomnosti redukčních činidel v půdě, nebo za anaerobiosy. Podařil se nám i v tekutém prostředí průkaz rozpustného hemolysinu typu O.

3. Typický vzrůst ve vpichu na půdě agar-želatinové, kde pravidelně vzniká náznak postranních výrůstků kratších a méně pravidelných než u Erysipelothrix. Výrůstky jsou ukončeny tupě, jakoby končící hloubkovou kolonií.

4. Vyvolání hnědavé keratokonjunktividy u králíka nebo morčete vetřením bouillonové kultury do spojivkového vaku.

5. Generalisovaná infekce myší, morčat nebo syrských křečků i. p. nebo i. v. injekcí 24 hod. bouillonové kultury se septickým rozsevem a přítomností typických uzlíčků v játrech a ve slezině, zčásti také pneumonických ložisek v plicích. Titraci kmene VIII na myši zjištěno, že smrtelná dávka, určená přibližně podle Reeda a Muenche, kolísá kolem 200 000 zárodků v inokulační dávce.

6. Význačná monocytosa u králíka po vstříknutí takové letální dávky mikrobů, která usmrťí zvíře za dobu pozdější než 6 dní. Prakticky jsme užívali téměř vždy cesty i. v., při čemž se nám počet monocytů zvýšil z normálního 0—1% až na 30% při současném celkovém zvýšení počtu všech bílých elementů.

Z prozatím neukončených pokusů uvádíme, že se nám u březích morčích samic podařilo letálními dávkami kultury vyvolat potrat masivně infikovaných plodů, po němž teprve následovalo úmrtí matky.

Tabulka I. Biologické vlastnosti zachycených kmenů.

Zkoušené kmeny List. m., z nich I.—X. námi zachycené z jednotlivých případů.

Zkouška	Kmen Nižnanský ze slepice	I. H.	II. K.	III. P.	IV. Ha.	V. L.	VI. Hi.	VII. Hr.	VIII. V.	IX. B.	X. Pr.
Morfologie růst											
Rhamnose	++ 1)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Salicinu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galaktose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Levulose	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Sacharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aeskulinu	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Dextrinti	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Glycerinu	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Skrobu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M R T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Red. metylem. mléka	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Okyselení laktm. mléka	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Růst v želatině s agarem a glukosou (jemné výběžky se ztluštěním na konci)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Grampositivní drobné tyčinky, místy koryneovitého tvaru. Pro List. monocyt. typická pohyblivost studené 24 hod. kultury s přemety. Za 24 hod. na krevním agaru drobné, bělošedé kolonie s nepravidelně širokou zonou beta-hemolyzy, která se zvětší po přidání cysteinu. Všechny údaje o našich kmenech odpovídají S-fázi

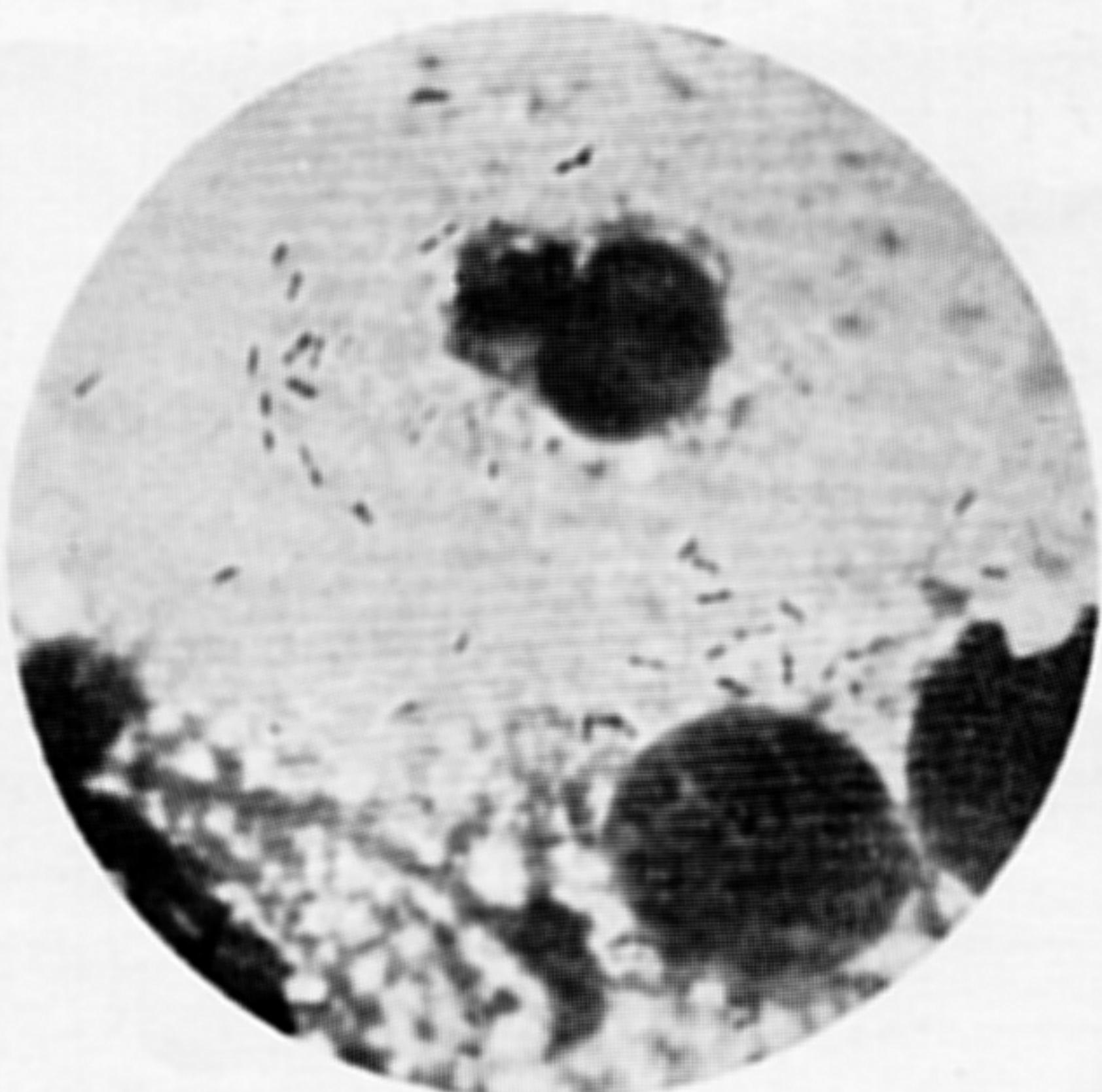
Všechny kmény jsou dobré citlivé na penicilin (kromě kmene Nižnanský), dobré citlivé na streptomycin a středně citlivé na aureomycin, chloromyctin a terramycin (in vitro). — Všechny kmény jsou vysoce patogenní pro bílé myši, morčata, křečky a králíky (septický rozsev s drobnými uzlíky v játrech, slezině, ev. plících). — Všechny kmény vytvárají po vteření kultury do spojivkového vaku králíka nebo morče do 24 hod. akutní hnisavou keratokonjunktividu. — Všechny kmény vytvárají při sublet. dávce králíku (morčeti) manifestní monocytosu.

Poznámka: 1. ++ značí silné okyselení s tvorbou sedimentu, 2. koagulaci mléka asi po 10 dnech, ~ 3. tvorba kyselin v xylose, rafinose, manitu, arabinose, sorbitu, dulcitu, inositu, adonitu negativní. Také tvorba indolu, H₂S,

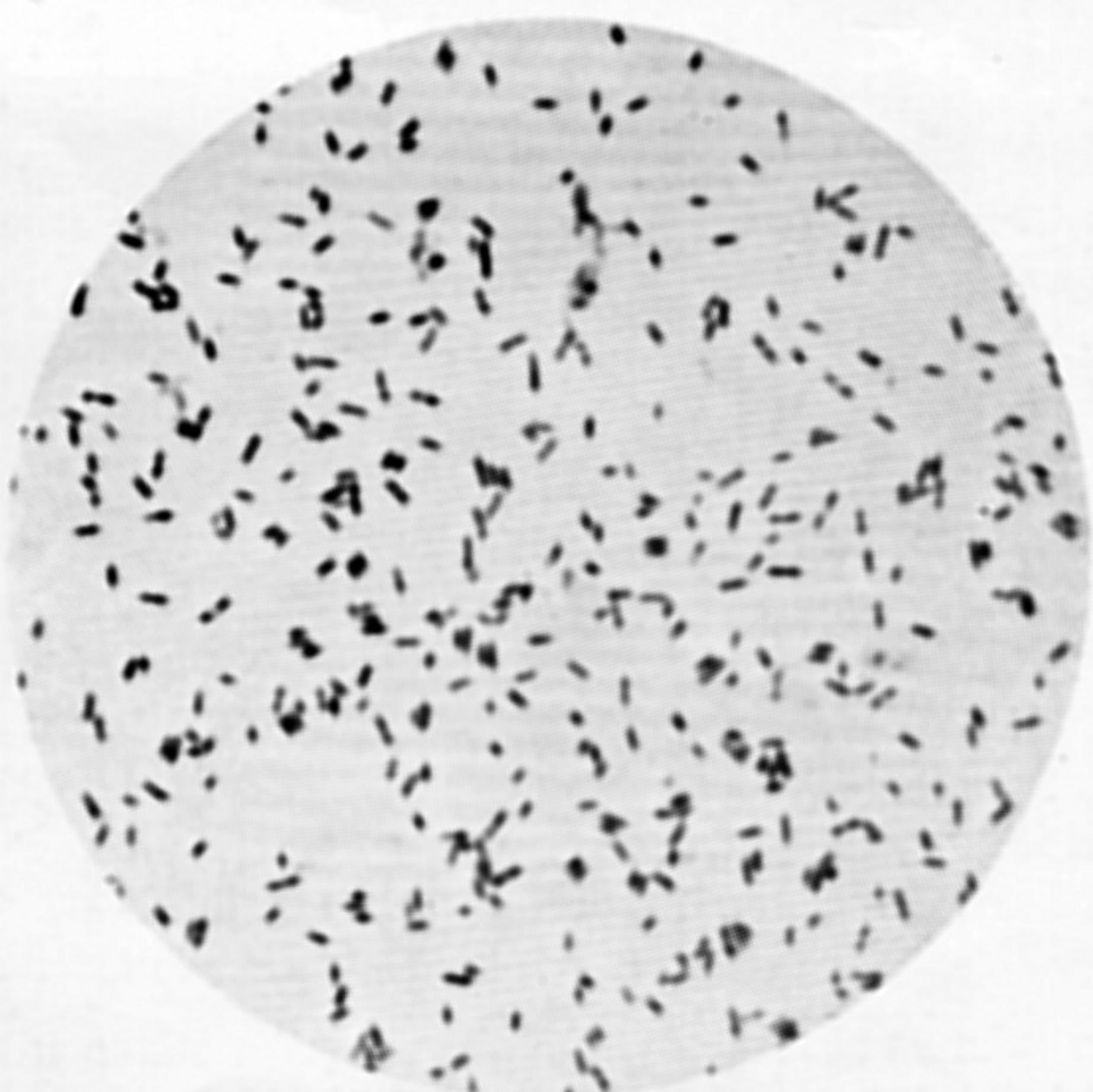
PV zkouška, rozklad urey, redukce nitrátů negativní.

DR PATOČKA — DR BENDA — J. STÁREK

Listeriové infekce novorozenců



Obr. 1. *Listeria monocytogenes* v játrech myši. (Foto Jiruška.)



Obr. 2. *Listeria monocytogenes* v suspensi z agarové kultury.

Z předcházející části lze vidět, že jsme se vždy snažili (kromě případu 2 a 3) ověřit pravděpodobnost listeriové infekce i u matek serologickou cestou. Ze souborného přehledu literatury, zejména novější (Seeliger), je patrné, že byly činěny pokusy o zjištění této skutečnosti hlavně použitím aglutinační reakce. Tato má nesporně výhodu při typaci kmenů listerie, neboť není těžkým úkolem vyrobit antiserum proti H a O-antigenu listerie a použít ji ke stanovení typové příslušnosti. Serologicky identifikované kmeny listerie mohou objasnit epidemiologickou depistáž, ačkoliv pravděpodobnost nějakého zvláštního zisku je poměrně malá. Ukázalo se totiž nověji, že pravděpodobně existují pouze 2 antigenní typy proti dříve uváděným 4. Pro průkaz protilátek u člověka se však zdá aglutinační reakce podle dosavadních zkušeností poměrně málo vhodná; také my jsme s ní neměli žádného zřetelného úspěchu.

Proto jsme se hned z počátku snažili propracovat metodiku fixace komplementu, jejíž výsledky (i s kontrolami) uvádíme ještě zvláště v přehledné tabulce. Jako antigenu jsme používali nejdříve suspense živých bakteriálních těl, pak suspensi usmrcených teplem. Jako nejlepší antigen se nám však osvědčila suspense živých bakterií, částečně rozbitých střídavým mražením a roztáváním (asi 10krát opakováno). Při několika titračních pokusech se ukázalo, že velmi vhodným a nejspecifitějším antigenním substrátem je tekutina zbývající po odcentrifugování (12 000 obr./min.) mražením a roztáváním rozbitých bakteriálních těl.

Naše vzorky antigenů byly titrovány proti hyperimmunnímu králičímu seru, které bylo vyrobeno imunisací zvířat nejprve usmrcenými kulturnami (inokulovanými s. k. a i. p.), později živými bakteriemi vstřikovanými i. v., a to za použití jednak kmene zvířecí listerie, jednak lidského kmene I. Titr hyperimmunního sera byl v obou případech 1 : 1280++. Zkříženým vysycením obou imunních ser zmíněnými antigeny nenalezeny mezi nimi patrné antigenní rozdíly.

Vazby komplementu s lidskými sery byly prováděny vesměs jemnými metodami běžně užívanými ve virologii, t. j. s předběžným vytitrováním optimálního kvanta antigenu proti specifickému seru.

Porovnáme-li titry komplementfixačních reakcí u matek našich případů s kontrolami, cítíme se oprávněni k tvrzení, že většina rodiček našich případů měla v seru v určité době po porodu protilátky v takovém titru, že jasně svědčí o recentně proběhlé listeriové infekci. Přitom dosavadní zkušenosť ukazuje, že s naším antigenem a při naší pracovní metodice můžeme považovat za suspektní titr ředění sera 1 : 32 až 1 : 64. Za specificky výrazný titr zředění sera od 1 : 128. Z našeho přehledu je však patrná ještě jiná zajímavá okolnost, a to nutnost či možnost podchycení dynamiky reakce. Sami jsme většinou byli schopni podchytit pouze fázi ubývání protilátek, ale považujeme za pravděpodobné, že by

Tabulka 2. Přehled serologických výsledků.

Materiál	Počet ser dosahujících pozitivního titru KF na + + +							
	do 1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
7 ser našich pacientek (z případu 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10)	0	0	1	1	1	3	1	0
7 ser pacientů s monocytární anginou	4	1	1	1	0	0	0	0
4 sera Lu posit.	3	0	1	0	0	0	0	0
3 sera pacientů s lymfoblastic-kou leukemii	3	0	0	0	0	0	0	0
16 ser pacientů s různými diagnosami	14	1	1	0	0	0	0	0
20 ser těhotných žen (většinou 7.-10. měsíc)	7	3	4	5	1	0	0	0
42 ser matek po časném a norm. probíhajícím porodu	17	12	5	6	2	0	0	0
15 ser matek po předčas. porodu nebo potratu	2	3	7	3	0	0	0	0

? - 5. měsíc těhotenství, od 4. měs. teploty 39,1°C, rýma, kašel

se systematickým sledováním ser těhotných daly zachytit i vzestupné fáze protilátek a vyvodit z toho praktické závěry, vedoucí včasným léčením matky k záchrane plodu. Z tabulky je ovšem rovněž patno, že i nespecificky pozitivní reakce (zejména v nízkých a suspektních titrech) nejsou výjimkou, hlavně ovšem u těhotných. Právě zde však nelze prozatím říci, kolik z nich spadá přece jen navrub latentního promoření populace listerií.

Naše případy nám poskytly příležitost k ověření účinnosti therapie lidských listerios antibiotiky. Některé zkušenosti s penicilinovou léčbou u případů lidských meningoencephalitid nejsou právě povzbuzující. Streptomycin, zkoušen u zvířecích přirozených infekcí, prý namnoze úplně selhal.²¹⁾ Podle našeho názoru je však tento náhled příliš pesi-

mystický a náš případ přežití dvojčete při intensivní terapii nám ukazuje pravděpodobnost úspěchu. Jsme přesvědčeni, že kdyby bylo lze odkrýt lehké nebo inaparentní infekce matek dostatečně včas, bylo by možno většinu lidských plodů zachránit vydatným léčením matek antibiotiky.

Náš přehled novorozeneckých listerios není a nemůže být úplný bez důkladného pathologicko anatomického propracování. Studie tohoto druhu je ovšem tak obsáhlá, že se vymyká z rámce přítomného sdělení a bude publikována jako zvláštní pojednání pathologicko anatomické ve spolupráci s jedním z nás.

DISKUSE.

Věříme, že se nám výpočtem uvedených 10 případů podařilo ukázat na vážnost problému novorozeneckých listerios. Zdá se nám, že je tím více pozoruhodný, že se právě nyní problematice kojenecké a novorozenecké úmrtnosti a jejímu snížení na minimum věnuje i u nás největší péče. Jsme ostatně přesvědčeni, že naše případy nejsou ani náhodné, ani ojedinělé, stejně jako nejsou novem v odborné literatuře. Prostudujeme-li pozorně řadu velmi pečlivě zpracovaných případů t. zv. novorozeneckých pseudotuberkulos, ukáže se s velmi vysokou pravděpodobností, že i zde byla ethiologickým činitelem *Listeria*, která ovšem v té době jako samostatné genus vyhraněných patogenních vlastností nebyla známa. Tak byl pravděpodobně listeriosou již Henleův případ z minulého století, kde byl činitel diagnostikován pouze mikroskopicky. Zcela určitě je nutno zařadit mezi listeriosy novorozenců případ Wredeův z r. 1902,²²⁾ kde popis kultury vypěstovaného mikroba v želatině, jeho morfologie, zvláštní pohyblivost a pathogenita pro experimentální zvířata jasně ukazují na *Listeria monocytogenes*. I méně zkušený mikrobiolog rozpozná listerii v případu Fränkelově z r. 1924²³⁾ podle jejích morfologických vlastností, slabé beta-hemolytické zony kolem kolonií na krevním agaru i experimentální pathogenity pro laboratorní hlodavce. Mezi listeriosy nutno zařadit i o rok později případ Schwarzův,²⁴⁾ který si patrně první všiml význačné vlastnosti mikroba, jež až dodnes zůstává nedoceněna, t. j. jeho tendenci k intracelulárnímu parazitismu uvnitř jaterních buněk, čímž nám živě připomíná *Past. tularensis*, *brucelly*, či dokonce obligatorně biotropní buněčné parasyty, jako jsou rickettsie.

Pozoruhodné je nahromadění případů analogických s našimi (přibližně ve stejné době) v Německu. Vypočtených deset případů pochází z druhé poloviny r. 1951 a z r. 1952. Připočteme-li k tomuto jeden případ brněnský a 3 případy diagnostikované bakterioskopicky, musíme počítati se 14 prokázanými případy novorozeneckých listerios, zachycených na malém areálu naší vlasti během 1 a ½ roku. Uvážíme-li, kolik novorozeneckých úmrtí vůbec uniká pitevnímu zpracování a kolik pitvaných případů nebylo bakteriologicky diagnostikováno, máme jistě právo soudit, že skutečný počet novorozeneckých úmrtí na listeriosu u nás za poslední

léta může být ve skutečnosti tak pozoruhodný, že si zaslouží zvláštní pozornosti jak ve výzkumu, tak pokusem o prevenci.

Problematika novorozenecnických listerios, jak my ji cítíme, je v podstatě dvojí: Především jde o to zjistit, zda je nutno ve všech případech pátrat po zvířecím zdroji listerií, čili jsou-li listeriová úmrtí novorozenců svou podstatou zoonosami. Naše dosavadní zkušenosti v tom směru jsou kusé a nedávají jasnou odpověď. Ve většině našich případů nebyl potvrzen kontakt s onemocnělým zvířetem. Bohužel se zdá, že jsou kusé i zkušenosti našich veterinárních mikrobiologů; i tyto bude nutno prohloubit a rozšířit, aby mohl být v základě podchycen snad zvířecí původ novorozenecnických listerios. Pakliže se tyto lidské listeriové infekce neprokáží jako zoonosy, bude nutno uvažovat o listerii jakožto příležitostném epifytu nebo parazitu lidském a prostudovat eventuální zákonitosti interhumánní kontaktní infekce a z ní pak vyvodit důsledky profylaktické.

Druhá část problému je v základě ještě zajímavější a týká se výkladu pathogenesy onemocnění lidských plodů. Zde musí spolupracovat mikrobiolog a epidemiolog co nejúzeji s patholog. anatomem a klinikem (porodníkem i pediatrem). Jako pomocná vyšetřovací metoda by mohla posloužit serologická depistáž, jejíž možnosti naznačuje naše práce. Jsme ovšem — podobně jako dosud všichni cizí autoři — pouze na počátku své práce a bude nutno zdokonalit nejen methodiku serologické, ale i bakteriologické diagnostiky listerie při jejím event. epifickém nebo komensálním usídlení na sliznicích dýchacího, zažívacího, nebo snad i genitálního traktu.

Tím se již přímo dospěje k nejzáhadnějšímu a nejzajímavějšímu bodu celé věci. Jeho vyšetření nám snad objasní záhadu, proč a za jakých okolností *Listeria* vyvolává jen neurčité, málo charakteristické, nebo vůbec inaparentní infekce matek, přitom však je schopna tak masivního přechodu na plod, že jej záhy usmrnuje generalisovaným rozsevem. Podle našeho soudu to tkví v některých biolog. zvláštnostech listerie, jimiž se podobá mikroorganismům nebuněčným, jako jsou filtrovatelné virusy (viz analogie s Rubellou).

U zvířat chronicky nemocných listerií (viz úvod) bývají zhusta pozorovány metritidy vedoucí k potratům. Podle našich případů se zdá, že u člověka bud' vůbec nedochází k metritidám, anebo musí jít u něho o onemocnění uteru velmi lehké, nebo pouze přechodného rázu. Jak je z výčtu našich případů patrno, ani v jediném z nich nedošlo k diagnostikovatelnému onemocnění matky po porodu masivně infikovaného plodu, ba dokonce se zdá, že ani šestinedělí nebylo nikdy protrahováno. Do jisté míry by to bylo možno vyložit mezitím nastavší imunitou matky, která je jistě dokumentována vzestupem titru protilátek.

Nutno však uvažovat i o jiné možnosti. Nahodilá a přechodná infekce matky listerií snad dává vzniknout drobným a patrně i filtry procházejícím formám tohoto bakteria, které pak z oběhu krevního proni-

kají přes uterus a placentu do plodu, v němž se jakožto tkáni embryonální a zvláště vhodné pro růst těchto podbuněčných forem množí a vyvolávají onemocnění překvapující svými smrtícími následky. Prokázat existenci těchto případných vývojových fází listerie bude jistě nesmírně zajímavým úkolem mikrobiologa, snažícího se do důsledku řešit otázku bakteriální variability. Některé naše orientační pokusy (ostatně zcela v začátcích) i mikroskopický nález v hnisu z placenty, zdá se, ukazují, že takové drobné formy listerie skutečně existují.

SOUHRN

1. Autoři popisují deset případů náhlého úmrtí novorozenců (donošených i nedonošených), ke kterým došlo několik hodin po narození. Jako příčina smrti ve všech případech byla zjištěna *Listeria monocytogenes*, která vyvolala většinou masivní generalisovanou infekci s přítomností pseudotuberkulosních ložisek v játrech, slezině, někdy i v plicích a ve střevě, v jednom případě též meningoencefalitu.

2. Vypěstované kmeny listerií měly všechna biologická i pathogenní charakteristika typické *Listeria monocytogenes*, navzájem se od sebe téměř nelišily a byly v podstatě biologicky a antigenně shodné s kmenem téhož mikroba, který byl krátce předtím vypěstován na Slovensku ze slepice.

3. Ve dvou z popisovaných případů vypěstována listerie též z placent a jednou z očistek. Zvláště zajímavý je případ dvojčat, z nichž jedno zemřelo na listeriovou infekci několik hodin po narození, druhé, jež porozeno v poměrně dobrém zdravotním stavu a podrobeno hned terapii penicilinem a dodatečně streptomycinem, zůstalo na živu.

4. Všechny matky i okoli (rodiče, manželé) byly podrobeny v různých intervalech po porodu bakteriologickému vyšetření na event. nosičství listerie. Všechny zkoušky byly zcela negativní stejně jako epidemiologické pátrání po možném zoonotickém původu infekce.

5. Některé z matek udávaly v různých obdobích před porodem krátké horečnaté onemocnění, většinou chřipkového rázu. Žádná však nebyla vážněji chorá, takže vztah této matčiny chorobné příhody k těžké infekci plodu je pochybný nebo nejasný. Poporodní průběh u všech matek byl prakticky normální. Podle pitevních nálezů u plodů a z toho, že v žádném případě nezachyceno zřetelnější onemocnění matčina genitálu, lze s největší pravděpodobností soudit, že infekce u dětí vznikla asi hematogenní cestou přes relativně intaktní uterus, a to po nahodilé subklinické, či dokonce inaparentní infekci matky listerií.

6. Okolnost, že matky tuto nediagnostikovanou nebo inaparentní infekci skutečně prožily, byla potvrzena reakcí fixace komplementu s materšskými sery, která byla za použití homologních i heterologních antigenů z listerií většinou pozitivní do titrů, jež autoři — při porovnání s kontrolami — považují za specifické.

7. Autoři zdůrazňují možný širší význam listeriových infekcí novorozenců a navrhují prohloubení výzkumu této otázky, aby byly četné záhady tohoto problému vyjašněny. Ukazují důležitost zjištění, zda i tyto záladné lidské listeriosy jsou opravdu zoonosami, a podtrhují analogii novorozeneckých smrtí na listerii s některými chorobami virusovými (Rubella). Závěrem je nadhozena otázka možnosti vzniku filtrovatelných forem *Listeria monocytogenes* a tím i možnosti jejich přechodu celkem in-

taktními orgány i dodatečného dorůstání a množení listerie v citlivé embryonální tkáni.

РЕЗЮМЕ

Авторы описывают десять случаев скоропостижной смерти новорожденных детей (доношенных и недоношенных), наставшей несколько часов или дней после рождения. Причиной смерти во всех случаях была установлена *Listeria monocytogenes*, вызвавшая в большинстве случаев массивную генерализованную инфекцию с образованием псевдотуберкулезных очагов в печени, селезенке, иногда и в легких и в кишках, а в одном случае также менингоэнцефалит.

2. Выделенные штаммы листерий имели все биологические и патогенные характеристические свойства типичной *Listeria monocytogenes*, взаимно между собой почти не отличались и в сущности были биологически и антигенно схожи с штаммом того же микробы, который был незадолго до того выделен в Словакии из курицы.

3. В двух из описываемых случаев была выделена листерия также из плаценты, а один раз из очистка. Особенно интересным является случай двойни, из которой один ребенок умер от листерийной инфекции спустя несколько часов после рождения, а другой, родившийся в сравнительно хорошем состоянии здоровья, был немедленно лечен пенициллином и дополнительно стрептомицином и остался в живых.

4. У всех матерей и членов семьи (родители, супруги) было произведено в разных интервалах после родов бактериологическое исследование предполагаемого носительства листерии. Все пробы были вполне отрицательны, так же как и эпидемиологическое исследование предполагаемого зоонотического происхождения инфекции.

5. Некоторые из матерей сообщили, что в разное время перед родами они заболели коротковременной лихорадкой, в большинстве случаев гриппозного характера. Однако ни у одной из матерей заболевание не носило серьезный характер, так что связь этой материнской болезни с тяжелой инфекцией плода является сомнительной или неясной. Послеродовое течение у всех матерей было практически нормальное. На основании данных вскрытия плодов и того, что ни в одном случае не было обнаружено ясного заболевания женских половых органов, можно с полной уверенностью судить, что инфекция детей была вызвана гематогенным путем через относительно интактную матку, а именно после случайной субклинической или даже инапарентной инфекции матери листерией.

6. Обстоятельство, что у матерей действительно была эта недиагностицированная или инапарентная инфекция, было подтверждено реакцией связывания комплемента с сыворотками матерей, имевших, при применении гомологичных и гетерологичных антигенов из листерий, в большинстве случаев положительный титр, который авторы, при сравнении с контрольным, считают специфическим.

7. Авторы подчеркивают более широкое значение листерийных инфекций новорожденных и вносят предложение углубить исследование этого вопроса для выяснения многих загадок этой проблемы. Указывают они на необходимость установления, являются ли действительно эти обманчивые листерионы человека зооносами, и подчеркивают аналогию смертных исходов новорожденных от листерий с некоторыми заболеваниями вирусного происхождения (краснуха). В заключение был затронут вопрос о возможности возникновения фильтрующихся форм *Listeria monocytogenes*, а тем самым и возможности их прохождения через вполне интактные органы и дополнительного дозрания и размножения листерии в чувствительной эмбриональной ткани.

Мп.

SUMMARY

1. The authors describe ten cases of sudden death of new born infants (mature and immature), which occurred several hours and even days after birth. As the infectious agent in all cases was identified *Listeria monocytogenes*, which in most cases provoked a massive generalised infection with the presence of pseudotubercles in the liver, spleen, sometimes even in the lungs and the intestine, recording also a case of meningoencephalitis.

2. All isolated strains of *listeria* had usual biologic and pathogenic characteristics of genus *Listeria monocytogenes*. The strains differed from each other neither within their biologic properties and antigenic structure, nor from the animal strain recently isolated in Slovakia.

3. In two of the cases *listeria* was isolated also from placenta and once from lochia. A case of particular interest is that of the twins, one of whose died on *listeria* infections several hours after birth, the second one who was born on relatively good conditions and was immediately taken to undergo a penicillin and streptomycin therapy, remained alive.

4. The bacteriological findings of all mothers and their relatives in different intervals after delivery proved to be negative for the presence of *listeria*, as well as the epidemiologic searching for an occasional zoonotic origin of the infection.

5. Some of the mothers stated in different periods before delivery minor febril (mostly influenza like) illness. But none of them got gravely ill, so that the relation of mother's illness to the mortal infection of the fetus remains obscure. Practically all the mothers had a normal post-delivery course. According to the pathological findings in the fetus and owing to the fact, that there was not recorded any markable illness of the mother's genital-tract, we can most probably state, that the infection of infants was of hematogenous origin through the relatively intact uterus from inapparently ill mother.

6. Occasion, that the mothers really underwent this uncharacteristic or even inaparent infection, was confirmed by the complement fixation reaction between mothers serums and homologous or heterologous antigens from *listeria* which were mostly positive in high titres.

7. Authors emphasise a possible general importance of *listeria*'s infections of new born infants and propose a deep searching in this question for explaining several problems. They show the importance of finding whether even these new born cases of *listeria* infection are really zoonotic and stress the analogy of death of the new born infants on the listeriosis with some virus diseases (rubella). Finally there's thrown up the question of a possible source of filtrable forms of *Listeria monocystogenes* within the possibilities of its passing through totally intact organs and effective growth and development of *listeria* in a sensitive embryonic tissue.

LITERATURA.

1. Murray, Webb, Schwann: J. Path. a. Bact. 29, 407, 1926. — 2. Pirie: Nature 145, 261, 1940. — 3. Krasilnikov: Opredělitel baktérij i aktinomycetov, Moskva, Leningrad 1949. — 4. Málek: Obecná mikrobiologie lékařská, Praha 1953. — 5. Kopel, Nižnánský, Stricker: Veter. časopis 4, r. 1, 1951. — 6. Olson: Skand. Veterinärtidsk., 35, 273, 1945. — 7. Sacharov Gudkova: Listerellesnaja infekcija, AMN SSSR, 1950. — 8. Julianelle: Am. Int. Med. 14, 608—620, 1940. — 9. Pletněva, Stiksova: Věstn. Ophtalm. 29, 4, 17—21, 1950. — 10. Nyfeldt: Compt. R. Soc. Biol. 101, 590, 1929. —

11. Bilibin: Klinič. Med. 27, 48, 1949. — 12. Málek, Šonková: ČLČ LXXXV,
27, 925—9, 1946. — 13. Stanley: Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. XXVII,
123, Part I, Part II, 1949. — 14. Burn: Am. J. Path. 12, 341, 12 p., 1936.
— 15. Reiss, Krebs, Potel: A. Z. Inn. Med., Bd II, 15, 1952. — 16. Seeliger,
Jung, Linzenmeier, Odenthal: Dtsch. med. Wschr. 583, 1952. — 17. See-
liger, Leineweber: Münch. Wschr., Sp. 2317, 1952. — 18. Potel: Zbl. Baßkt.,
P., I., H., 159, 86—87, 1952. — 19. Mušil, Vaněček: Lékařské listy 305,
1952. — 20. Drew: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 61, 30—33, 1946. — 21.
Gray, Stafsweth, Thorp: J. Am. Vet. Ass., 115/870, 171—173, 1949. —
22. Wrede, Ziegler, Betr: Pat. An. allg. Path., 32 (B), 1902. — 23. Fraenkel:
Ztschr. Hyg. Inf., B. 101, 1924. — 24. Schwarz: Virch. Arch. B. 255, 1920.