

## Lidské varianty *Corynebakteria pyogenes*

Dr. FR. PATOČKA

Příspěvek k poznání jejich pathogenních schopností pro člověka. Produkce hemolysinu a toxinu

### Část I.

Pathogenní účinek silně hemolysujících korynebakterií pro člověka a to těch, jež jsou se vši pravděpodobností příbuzné s *Corynebacterium pyogenes* (Gripps-Poles), byl dosud jen vzácně popsán. Podle našich nálezů jsou však u člověka častěji přítomny, nežli se běžně soudí.

Ve své práci předkládáme popis 12 kmenů tohoto bakterie, izolovaných během posledních let z lidských patologických produktů. Většina z nich byla sftelně pathogenní pro morče i králíka. Jejich význam pro lidskou infekci se zdá nesporný. Studium hemolysinu, jakož i pokus o izolaci toxinu nejtoxičtějšího z nich (kmen 9231) doplňuje naši práci. V závěru se snažíme vyjasnit taxonomickou posici lidských hemolytických korynebakterií s pokusem o rozhodnutí, zda jde při jejich z ištění pouze o náhodný přenos těchto bakterií z nemocných zvířat, či zda snad nejsou i tyto korynebakterie druhem člověku vlastním.

Popis kvasných a biochemických vlastností i pathogenita pro experimentální zvíře jsou podány většinou tak, jak byly nalezeny u kmenů čerstvě izolovaných. Ješto jsme neměli dlouho příležitost kmény lyofilizovat, udržovali jsme je v chladu, a to vyrostlé za anaerobních podmínek. Přesto se jejich biologické vlastnosti měnily a zejména se pathogenita většiny kmenů rychle ztrácela kromě už uvedeného kmene 9231. I u tohoto zůstal však pouze zlomek původní toxicity.

Popis kmenů a jejich původ:

Kmen S: Isolován post mortem ze sleziny asi 60 r. starého člověka, zemřelého na diseminovanou miliární tuberkulosu. Ješto byl vzhled sleziny poněkud odlišný od běžného obrazu general. tuberkulosy, založena mimo kulturu na BK také kultura za aerobních i anaerobních podmínek na Fortnerově plotně s 10% králičí krve. Mimo zcela ojedinělé kolonie *E. coli* vyrostly za anaerobních podmínek velmi četné kolonie se širokým a jasným  $\beta$  hemolytickým dvorcem, jež, jak se ukázalo, byly mikroskopicky složeny z jemných gramlabilních korynebakterií. Dodatečně kultivačně potvrzena diagnosa tuberkulosy, takže hemolytické korynebakterium bylo nutno považovat pouze za druhotnou infekci, podle velikého počtu kolonií ovšem velmi mohutnou.

Morfologický obraz u čerstvě izolovaného kmene nápadně odpovídal delším a štíhlým formám *Corynebacterium diphtheriae*, byl s ním shodný v gramlabilitě, uspořádání tyčinek i nehomogenitě plasmatu. Metachromatická granula byla vzácnější. V subkulturách se dodatečně ukázal nápadný pleomorfismus. Jednou nacházeny bakterie velmi podobné nopathogenním pseudodifteriím, t. j. krátké, širší a člunkovité formy, značně homogenně se barvící, po delší době opět zjištěny nápadně jemné, štíhlé a krátké tyčinky, nebo kultura obsahovala směs popsaných tvarů.

Bakterie z počátku rostly rychleji a lépe za anaerobních podmínek, později byl vzrůst na plotně s králičí krví stejný na vzduchu jako za anaerobiosy,  $\beta$  hemolysa zůstala však stále mohutnější za anaerobiosy. Význačná byla serofilie bakterie. Z počátku byl vzrůst možný pouze na krevním nebo serovém agaru, po dlouhé době se podařila adaptace i na obyčejný agar, ale mikrob zde stále rostl pomaleji a vytvářel zřetelně menší kolonie.

Hemolysa na krevní plotně byla z počátku typu  $\alpha$ , do 3—5 dnů se však proměnila v dokonalou, velmi širokou beta hemolysu. Krvinky přidané k naočkované kultuře v bouillonu hemolysovaly rychleji — často už během prvních 14—24 hod. růstu kultury. Kolonie na krevním agaru byly světle nažloutlé, matné, s lehkým perleťovým leskem, a byly částečně podobny vzrůstu přechodného charakteru mezi typus *gravis* a *intermedius* *Corynebacterium diphtheriae*. Na Loefflerově seru se tvořil perleťový povlak, pŭda zůstala beze změny.

Vzrůst v bouillonu se serem byl zprvu pomalý, lepší v bouillonu s játry a serem. Tvořila se jemná granulka, hromadící se u spodku zkumavky, částečně na stěnách. Na povrchu bouillonu se vytvořil lehký prstenec. Želatína s kousky jater zkapalněla do 4 dnů, želatína bez jater během týdne až 10 dnů. Mléko s játry koagulováno do 3 dnů, mléko bez jater do 1 týdne až 10 dnů. Na půdách s kaliumtelluritem nepozorován do 5 dnů žádný vzrůst, pak sotva viditelné kolonie. Ostatní biologické vlastnosti jsou uvedeny v přehledné tabulce.

Pathogenita pro experimentální zvířata:

Myš subkutánně 0,2 ml 48 hod. staré bouillonové kultury. Do 24 hod. v místě injekce tuhý edém, do 4 dnů mizí. — 0,5 ml téže kultury: edém, pak nekrosa, zvíře zůstalo na živu.





Morče subkutánně: vstříknut 1 ml 48 hod. staré bouillonové kultury. Do 24 hod. zánětlivý edém, podobný difterickému. Do 48 hod. na vrchu edému naznačena nekrosa s hemoragickým lemem. Třetího dne morče zašlo. Při sekci nalezen v místě injekce fibrinosní absces s malým množstvím sanguinolentní tekutiny, podkožní vazivo silně překrveno, s drobnými hemoragiemi. Břišní útroby silně překrvené, slezina malá, nadledvinky trochu zvětšené. *Corynebacterium* vypěstováno pouze z místa inokulace.

Ježto sekční obraz svědčil nejspíše o toxické smrti, byly 4 ml stejně staré bouillonové kultury zcentrifugovány a sediment resuspendován ve sterilnímu bouillonu. Centrifugace a resuspense opakovány 2krát, aby byly mikroby zbaveny toxických látek, produkovanych při inkubaci v bouillonové kultuře.

Promytá suspence o přibližně 4násobném množství mikrobů vstříknuta morčeti stejné váhy, rovněž subkutánně. U tohoto zvířete se vyvinul pouze lehký edém, bledý a bez tendence k nekrose. Do 5 dnů edém zcela vymizel, morče zůstalo zdravo. Tento pokus nás utvrdil v přesvědčení, že u pathogenity mikroba hraje důležitou roli toxická látka, produkovávaná hlavně v bouillonových kulturách.

Králík (asi 2 kg): Vstříknuty 2 ccm 48 hod. staré bouillonové kultury podkožně. V místě injekce edém, do 3 dnů nekrotická demarkace, do 10 dnů smrt. Pitevní obraz podobný jako u morčete, slezina malá, zvíře nápadně vyhublé. Kultura pozitivní z místa injekce. — Králík intravenosně 2 ml. Smrt do 2 dnů, útroby překrveny, slezina nezvětšena.

U některých morčat došlo k provalení nekrosy a spontánnímu vyprázdnění edému do 48 hod. V těchto případech se nekrosa změnila v rozsáhlý, pomalu se hojící vřed, ale zvířata většinou zůstala na živu.

Kmeny 21, 23, 24, M izolovány během několika měsíců ze 4 pacientů z otolaryngologické kliniky. U všech šlo o karcinom laryngu, který zprvu léčen ozařováním roentg. paprsky. Dodatečně provedena laryngektomie, a porážka operována v terénu, poškozeném paprsky X. rány nekrotisovaly.

Vzhledem k charakteru nekrosy kultivovalo také anaerobně. Aerobní půdy vesměs přerostly *B. proteum*. Anaerobně, kromě alfa streptokoků a ojedinělých stafylokoků, vypěstovány 2 druhy gramnegat. bakteroidů, vesměs nepathogenních pro zvíře; jeden z nich, *Ristella melaninogenica*, ve značném množství. Kromě uvedených bakterií zjištěny různé, četné, silně hemolysující kolonie korynebakterií, jejichž morfologické a kultivační vlastnosti se ukázaly podobné mikrobu shora popsánému.

Růstové, fermentační a ostatní biologické vlastnosti těchto 4 kmenů byly popsány Blahou a Dvořáčkem a jsou zachyceny v téže tabulce jako kmen S.

Kmeny 21, 23, 24 a M se lehce lišily v kvašení cukrů, v intenzitě schopnosti koagulovat mléko a zkapalňovat želatinu (hlavně dobou, jež je nutná k pozitivní reakci). Význačně se ode všech lišil kmen M primárním nedostatkem toxicity. Všechny tyto vlastnosti, jak jsme se dalším studiem přesvědčili, jsou však variabilní a zejména se toxicita u kmenů, uchovávaných předčkováním na pudách, velmi rychle ztrácela.

Základní vlastnosti byly u všech velmi podobné: význačná serofilie čerstvých kmenů, neschopnost vzrůstu v primokultuře na telluritových pudách, alfa hemolýza, která se rychle mění ve zřetelnou a mohutnou beta hemolýsu, zejména za anaerobních podmínek.

Ježto ve všech 4 případech byl nutný rychlý léčebný zákrok, zkoušena citlivost na penicilin. Všechny 4 kmeny byly na penicilin extrémně citlivé asi jako vysoce citlivé kmeny  $\beta$  hemolytických pyogenních streptokoků z A skupiny.

Kmen 8907: Isolován z chronické otitis media u dítěte. Současně vypěstován *Pseudomonas aeruginosa*. Morfologicky byl velmi podobný kmenu S, se značnou variabilitou podle starší kultury a druhu použité půdy. Kolonie na krevní pudě, hned z počátku trochu větší nežli u kmenů předchozích, upomínaly na *Corynebacterium diphtheriae* typu mitis. Serofilie význačná, vzrůst na telluritových pudách sotva viditelný a až po 6 dnech. Želatina pomalu a neúplně zkapalněna. Mléko do 6 dnů koagulováno. I čerstvě izolovaný kmen byl pro morče prakticky netoxický.

Kmen B: Vypěstován z vaginálního výtoky asi 25leté ženy, současně s velkým množstvím *Streptococcus zymogenes* a několika koloniemi anaerobních bakteroidů. Pacientka nebyla naší krajankou, těsně před vyšetřením přišla z jihozápadní části Evropy. Bouillonová kultura tohoto mikroba se lišila od ostatních tendencí k tvorbě lehké blanky a růstem v zrníčkách i v lehkém zákalu, i bez sera. Želatina zřetelně zkapalňována, mléko rychle koagulováno. Pro zvířata byl kmen B zcela netoxický.

Kmen 9231: Jediný ze všech izolován v čisté kultuře z hnisavé osteomyelitidy u dítěte. Vypěstován bez obtíží ve velkém počtu kolonií na krevní plotně za aerobních podmínek. Jeho vzrůstové vlastnosti se velmi podobaly kmeni 8907 až na to, že jediný ze všech kmenů rostl zřetelněji na telluritových pudách, vytvářející po 5—7 dnech vzrůstu malé, černavé kolonie, asi typu *Corynebact. diphtheriae intermedium*, ale menší. Z cukrů zkvašoval glukosu, maltosu a laktosu, slabě sacharosu. Produkoval stopy  $\text{NH}_3$  a indolu. Acetylmethylcarbinol a red. nitrátů jako u ostatních negativní. Proteolýza želatiny byla slabá, stejně tak koagulace mléka, koagulované serum, jako u ostatních, nezměněno. Byl ze všech námi vypěstovaných mikrobů nejtoxičtější pro zvířata a část jeho toxicity zůstala zachována i po roce subkultur bez lyofilisace.

Kmeny 8907, B a 9231 byly stejně citlivé na penicilin jako předcházející.

V posledních 4 letech byly v našich laboratořích izolovány ještě další 4 kmeny, s předcházejícími velmi podobných korynebakterií, a zcela recentně zaslán k identifikaci poslední z kolínského OHES (Dr. Rakušanová), který je nyní předmětem podrobného studia.

Všech 5 kmenů mělo stejnou toxicitu jako prvý kmen S. Jejich biologické vlastnosti, kterými se (v mezích u nich obvyklé variability) celkem nelišily od předcházejících, jsou seřazeny v přehledné tabulce. Historie jejich nálezu je tato:

Kmen H vypěstován opětovaně z tonsil zdravé ošetřovatelky, která spolu s jinými byla poslána na

zjištění event. množství  $\beta$  hemolytických streptokoků. Neměla nejmenších příznaků infekční choroby a *Corynebacterium* u ní zjištěno celkem 3krát ve 14denních intervalech. Při anamnestickém pátrání nezjištěn u ní jakýkoli kontakt se zvířaty. Soudíme, že právě v tomto případě šlo o velmi pravděpodobně o humánní variantu pyogenního korynebakteria, zjištěného t. č. epifyticky na lidských tonsilách a schopného dalšího přenosu na jiné lidské individuum.

Kmen 6345 byl vypěstován z píštěle po laparotomii. Sekret, kromě několika kolonií enterokoku a anaerobních bakteroidů, neobsahoval jiné flory.

Kmen Sýk byl zjištěn téměř v čisté kultuře (kromě zbytků Döderleinaova bacila, vaginalních pseudodifterií a netoxických mikrokoků) při mohutném hlenohnisavém vaginalním fluoru. Jeho množství ve vagině bylo mnohem hojnější nežli kmene B za podobných okolností a kromě toho šlo o kmen zřetelně toxický.

Konečně kmen 963 vyrostl v čisté kultuře z malého kožního abscesu, jinak v dobře zahojené operační ráně. Podle lokalizace infekce nelze vyloučit původ tohoto korynebakteria, podobně jako kmene 6345, z intestinálního traktu.

Posledně zmíněný kmen R, jenž nebyl vypěstován u nás, pocházel z arteriosklerotické nekrosy distální končetiny. Jeho popis bude předmětem zvláštní práce.

Souhrnem možno říci, že všech 12 kmenů rostlo na krvi v podobných koloniích se silnějším  $\beta$  hemolytickým dvorcem. Všechny byly v primokulturách serofilní a zřetelně mikroaerofilní. U všech byl vzrůst na půdách s kaliumtelluritem špatný nebo vůbec žádný. Všechny zkvašovaly glukosu a maltosu. V bouillonu vždy granulární vzrůst. Zkapalňování želatiny a koagulace mléka u všech alespoň zřetelně naznačena, většinou jasně. Žádný kmen neredukoval nitráty. 9 z 12 kmenů bylo pathogenních pro laboratorní zvířata a usmrcovaly za stejných příznaků. Citlivost na penicilin u všech značná.

Kmeny S 9231 vstříknuty také morčatům, která byla 12—18 hod. před pokusem pasivně imunisována Di-antitoxinem v dávce několikrát set U. A. Ve dvou ze 6 případů jsme měli dojem, že smrt morčat byla oddálena, ale v žádném se nepodařilo zabránit smrti zvířete za typických příznaků.

Šest až sedm dní staré, v serum-bouillonu dobře vyrostlé kmeny korynebakterií zbaveny mikrobů jednak dlouhodobým centrifugováním, jednak filtrací. Dekantáty i filtráty takto získané rovněž hemolysovaly lidské, koňské i králičí krvinky, ovšem za delší dobu a v nižších titrech nežli celá bouillonová kultura. Zejména filtráty byly málo účinné. Přesto však bylo jasno, že hemolysin je rozpustným produktem mikroba.

Lehké odchylky, jak vytčeny v popisu, ukazují značnou tendenci k variabilitě mikroba, ale podle našeho názoru nevybočují z mezí druhu.

Při prvním pokusu o zařazení popsaných korynebakterií jsme ihned vyloučili možnost nápadně hemolytických kmenů bacila difterického. Jak známo z řady prací (Mortonových 194) a Hewitových 1947), gravis a zejména mitis zhusta hemolysojí (prý jen v 3 fázích), nikoli intermedius. V žádném případě však

neprodukují filtrovatelný hemolysin a hemolysa nikdy není tak široká jako u našich kmenů. Rovněž není znám kmen skutečného a typického *Corynebacteria diphtheriae*, který by srážel mléko a zkapalňoval želatinu (o odchylných kmenech Barratových viz později). Odlišná od pravé difterie je mikroaerofilie a serofilie čerstvě izolovaných kmenů. Zejména nápadná je u našich mikrobů neschopnost vzrůstu na telluritových půdách, které jsou selektivní a diagnostické pro Di.

Pokud byly kmeny pathogenní, vyvolávají zcela jiný patologický obraz nežli pravý difterický toxin u kralík — nikoli morče — se zdá nejcitlivějším zvířetem. Také jsme nemohli prokázat skutečnou antigenní shodu mezi toxinem difterickým a předpokladaným toxinem našich bakterií, nehledě k tomu, že toxicita hemolytických kmenů je velmi labilní a slabá, porovnáno se skutečným bacilem Loefflerovým.

Z ostatních korynebakterií, pathogenních pro laboratorní zvířata a příležitostně či pravidelně hemolyzujících, bylo účelno porovnávat naše kmeny pouze se 3 druhy: 1. *Corynebacterium enzymicum* Mellon (1917), 2. *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* (Preisz-Neurcardi), 3. *Corynebacterium pyogenes* Poëls (*Bacillus liquefacicus pyogenes bovis* Lucet).

Mellon popsal v serii 4 prací řadu korynebakterií (první kmen zachycen při hnisavém abscesu plic u člověka, skončivším smrtelně), velmi polymorfních (až enterokokům podobné formy). Některé kmeny koagulují mléko, žádný nezkapalňoval želatinu, zčásti byly serofilní. Kmen 13 a 14 zřetelně hemolysoval, ostatní patrně nikoli. Kultury byly většinou pathogenní pro králíka a morče, vyvolávají abscesy v plicích a suppurat. arthritidu. Ve filtrátu 25 hod. bouillonové kultury předpokládá autor toxin, jenž však nezabíjí králíka, dělá pouze zhubnutí a kachexii. S Mellonovým popisem je velmi těžko naše mikroby srovnávat, neboť je neúplný. Nelze se ubránit dojmu, že Mellon pracoval s různými druhy korynebakterií, z nichž některé asi byly příbuzné, ne-li totožné s našimi kmeny.

*Corynebacterium ovis* (pseudotuberculosis — Preisz-Neurcardi) je mikrob v přírodě velmi rozšířený. Vyvolává pseudotuberkulózní léze u ovcí nebo toxické infekce u vepřů, hovězího dobytka i drůbeže. Z kultivačních schopností uvádíme: Dělá zhusta pelikulu na bouillonu, nekaguluje mléko, podle některých (Bergey 1948) nezkapalňuje želatinu, podle Carna (studie na největším množství kmenů 1939) je želatina při povrchu mělce zkapalněná. Bergey se nezmiňuje o hemolyse, Hall a Stone (1916) a jiní ji nacházejí pravidelně. Carne zjistil, že  $\beta$  hemolysa byla přítomna jen asi u  $\frac{2}{3}$  zkoušených kmenů a pouze kolem některých kolonií v hloubce krevního agaru. Jiné kolonie byly obklopeny zónou  $\alpha$  hemolysy, jiné beze změny. Když přeočkoval  $\beta$  hemolytické kolonie na povrch krevního agaru, jevíly pouze alfa hemolysu.

Většina autorů se shoduje v tvrzení, že *Corynebacterium ovis* produkuje toxin (5—8denní bouillon. kultury) a je velmi nepravidelně pathogenní pro laboratorní zvířata (citlivá jsou zejména morčata, ale také i krysy). Podkožní injekce virulentní kultury morčeti vyvolává edem, lokální nekrosu kůže a smrt

zvířete. Podle Halla a Stona promytá kultura bacila není pro morče pathogenní.

*Corynebacterium pyogenes* (Lowell 1937) je podle údajů nejrozšířenější zvířecí pathogenní korynebakterium. Je nacházeno jako primární vyvolavatel nejrozličnějšího hnisání (mastitis, abscesy v útrokách, polyarthrititis, pneumonia, vaginitis, metritis) u hovězího dobytka, vepřů, kozy, též ovcí; velmi často jako druhotná infekce. Zjištěno bylo i u kočky.

Na všech zvířecích krvích vytváří kolonie se silnou  $\beta$  hemolysou. V bouillonu granulární vzrůst. Počáteční kultury jsou obvykle serofilní a lépe rostou za anaerobních podmínek. Netvoří indol ani  $\text{NH}_3$ , neredukuje nitrity. Je více sacharolytický než Preisz-Nocardův bacil. Během několika dnů zkapalňuje želatinu a koagulované serum. Do 3 dnů srazí mléko, obvykle s druhotnou peptonisací.

Merchants (1935) popisuje slabý vzrůst na koagulovaném seru s 1% kalium telluritu ve formě malých, černých kolonií, klesajících do pudy. Kmeny izolované z pathol. produktů jsou obvykle pathogenní pro laboratorní zvířata. Nejcitlivější je králik intrapleurálně (Lovell 1937), pak morče, nejméně myš. Tvoří serolog. typy prokazatelně aglutinací. Hemolysin je podle Lovella rozpustný a ve filtrátu 48 hod. kultur dosahuje snadno titru 1:200. Týž autor tvrdí, že lysin je asi identický s toxinem, neboť titer hemolysy a toxicity stoupají paralelně. Pět ml filtrátu 48 hod. staré kultury zabíjí králíka za 5 minut, 2 ml za 20 minut. I myš je citlivá na intravenózně vstříknutý lysin. Lysin i toxin jsou antigenní a snadno neutralisovány serem hyperimunizovaných zvířat. Antilytický titer u dobytčat lze hodnotit diagnosticky (Lovell 1939).

Hewit (1947) našel, že lysin *Corynebact. pyogenes* není neutralisován difter. antitoxinem, cystein na něj neúčinkuje, zato cholesterol v suspensi 1 na milion zcela ruší jeho účinnost.

*Corynebacterium pyogenes* tvoří někdy odlišné varianty. Forgeot (1940) našel v lidské infekci variantu zkapalňující želatinu, ale ne serum. Ochi a Zaisen, kromě typického *C. pyogenes* z nemocných zvířat, nacházeli zhusta na normálních sliznicích zdravých zvířat t. zv. *Corynebacterium pseudopyogenes*, jež fermentuje cukry velmi slabě, proteolysuje želatinu, ale nikoli serum. Většinou koaguluje mléko, ale až po dlouhé době, nehemolysuje krvinky všech zvířat a je pouze slabě pathogenní.

Porovnáme-li kmeny námi izolované s předcházejícími 3 druhy korynebakterií, najdeme největší podobnost s genus *Corynebacterium pyogenes*. Shodují se s ním v produkci rozpustného hemolysinu, serofilii a mikroaerofilii čerstvých kultur, koagulaci mléka a želatinolyse i pathogenitě většiny kmenu pro laboratorní zvířata.

Částečně odlišná je sacharolysa, neschopnost peptonisovat mléčné koagulum, neschopnost proteolysy koagulovaného sera, pomalá produkce hemolysinu (4—7 dní proti 48 hodinám u zvířecích kmenů podle Lovella) a nízký titer lysinu ve filtrátech. Rovněž rychlým mizením všech těchto uvedených vlastností, jakož i rychlou ztrátou pathogenity v subkulturách se zdají odlišné od typických zvířecích kmenů. Těžko můžeme posoudit, zda tyto odchylky

jsou pouze projevem variability v rámci druhu. Jestliže ano, podobají se některé naše kmeny maximálně *Corynebacterium pyogenes* podle Ochiho a Zaisena nebo Forgeotově variantě z člověka.

Nemůžeme se však ubránit dojmu, že odchylnost našich kmenů je hlubší, takže až upomíná na bacila Preiszova-Nocardova. Alfa hemolysa, která u většiny kmenů předchází beta hemolysu, a toxická smrt zvířat, infikovaných většinou našich kmenů (tvorba edému s nekrosou), jsou shodné s průběhem infekce *Corynebacterium ovis* podle Barrata. Jak uvedeno, i *Corynebacterium ovis* může být mírně želatino-lytické, je vždy méně sacharolytické než *C. pyogenes*, je schopno beta hemolysy a dělá toxin, kdežto promytá těla živých mikrobů — stejně jako u našich kmenů — nevyvolávají u laboratorních zvířat zřetelnější reakce.

Pro lepší posouzení těchto rozdílů a podobnosti jsme se rozhodli studovat podrobněji toxin a hemolysin lidských kmenů a jako modelu jsme použili kmene 9231, jenž jediný si zachoval zbytek pathogenních vlastností.

## Část II.

Lyofilisovány kmen 9231, oživen několika pasážemi v bouillonu, připraveném ze srdečního svalu. Jakmile docílilo normálního růstu, pěstován pro další pokusné účely v masopeptonovém bouillonu (pH 7,4), k němuž přidány stopy kalciumpantothenátu, tryptofanu a 10% sterilního koňského sera. V této pudě rostlo *Corynebacterium pyog.* optimálně a po přechodném zákalu vytvářelo třetího dne na dně jemný, granulární sediment. Zbytek tekuté pudy zůstal úplně čirý.

Tento čirý dekantát 3—4denních bouillonových kultur, pro jistotu ještě centrifugovaný, byl zkoušen na přítomnost solubilního hemolysinu (filtrát ztrácel velkou část své aktivity).

Vzhledem k tomu, že hemolytický princip byl poměrně slabý, byla většina titračních pokusů vykonána se suspensí králičích erythrocytů, jež jsou nejcitlivější. Zjištěno však, že i krvinky lidské a koňské byly dobře hemolysovány. Pokus zařízen tak, že čirý dekantát bouillonové kultury rozpipetován do malých zkumavek v dvojnásobných ředěních s nárazníkovým fyziologickým roztokem, počínaje od koncentrace 1:2. Pak přidána aa 1% suspence králičích krvinek, inkubováno 1 hodinu ve vodní lázni při 37° C a další 1 hodinu při teplotě laboratoře.

Velká řada pokusu ukázala, že produkce solubilního hemolysinu v bouillonové kultuře je přímo uměrná stáří kultury a optimu jejího vzrůstu. Jeden z nejlepších našich pokusů neprokázal touto metodou rozpustný hemolysin v dekantátu 24hodinovém vůbec. Kultura 48hodinová měla hemolytický titer v konečném zředění 1:4, 72hodinová 1:8 a 4denní 1:16. Po dalších dnech zvýšení produkce hemolysinu nepozorováno.

Dlužno podotknout, že produkce hemolysinu u všech našich kmenů byla poměrně slabá, porovnáno se zvířecími kmeny pyogenních korynebakterií.

\* Experimenty této části vypracovány dílem v bakteriologických laboratorích New York University, College of Medicine N. Y.

U těchto — podle Lovellových údajů — lze dokonce i ve filtrátech bouillonových kultur (48 hod. starých) snadno zjistit hemolytický titer 1 : 200.

Kromě rozpustného hemolysinu produkovaného do bouillonových kultur i princip, vyvolávající aglutinaci erythrocytů. Tento úkaz je asi identický s oním, jenž popsán pro různá saprofytická korynebakteria a nejnověji studován a prakticky hodnocen zejména u *Haemophilus pertussis*. Aglutinační fenomen byl opět nejzřetelnější při použití králičích krvinek, jeho titer byl vždy vyšší nežli titer hemolysinu a projevoval se i tam, kde k uplatnění hemolytických vlastností kultur ještě nedošlo. Dodatečně jsme zjistili zcela bezpečně rozdílnost substrátu, vyvolávajícího aglutinaci a hemolysu, neboť poslední se nám podařilo purifikační procedurou (jež bude níže popsána) nakoncentrovat, kdežto substrát vyvolávající aglutinaci při této proceduře zcela zmizel.

Jak výše uvedeno, obsahovaly dekantáty 4denních bouillonových kultur zhruba nejvyšší dosažitelný titer hemolysinu. Nikdy však nebyly tak toxické, aby i po i. v. podání nejcitlivějším zvířeti — t. j. králičímu — v kvantech 5—6 ccm vyvolaly u něho zřetelné příznaky onemocnění, po případě smrt. Proto jsme zkusili izolovat větší kvanta toxinu rozbitím bakteriálních těl. Při tom se ukázalo, že lze z nich tímto způsobem získat nejenom látku charakteru letálně působícího endotoxinu, nýbrž i veliká kvanta koncentrovaného hemolysinu.

Proto použito centrifugovaného sedimentu 4denních kultur kmene 9231 ve výše popsaném bouillonu. Centrifugací zahuštěná suspence bakteriálních těl byla rozbita sonickými vlnami, přibližně o 9000 kmitech za 1 vteřinu. Takto zpracován sediment z několika i bouillonové kultury. Rozbitá mikrobiální těla odcentrifugována v chlazené centrifuze asi při 10 000 obrát./1 min. Tím získána nažloutlá, fluoreskující tekutina o pH 6,9, již bylo použito k titraci hemolysinu a ke zkouškám toxicity. Paralelně přezkoušeny na event. hemolytickou aktivitu také propláchnuté resuspendované zbytky rozbitých bakteriálních těl.

Titrace na hemolytickou aktivitu provedena stejně, jak shora uvedeno. Řadou opakovaných pokusů zjištěno, že resuspendované zbytky rozbitých bakteriálních těl byly téměř úplně zbaveny hemolytických schopností. Naproti tomu tekutina, uvolněná rozbitím bakterií, měla překvapující titer hemolysinu až do zředění 1 : 256 ++. Z těchto pokusů je zřejmo, že hemolysin pyogenních korynebakterií lze uvolnit v maximálním množství sonickým rozbitím bakteriálních těl.

U takto koncentrovaného hemolysinu lze se již odvážit dalších pokusů, zaměřených k poznání jeho povahy. Týž na prvý pohled připomínal O-streptolysin, a to tím, že  $\beta$ -hemolysa byla nejzřetelnější a nejrychlejší se ukazovala na plotnách kultivovaných za anaerobních podmínek.

O-streptolysin, jak známo, nepůsobí hemolytickou nebo alespoň podstatně ztrácí svoji hemolytickou účinnost za normální tense atmosférického kyslíku. Jeho velmi koncentrované přípravky musí být proto aktivovány buď přidáním cysteinu, nebo kyseliny thioxylové. Zařízen tedy pokus tak, že k hemolytický působícímu principu, získanému rozbitím

bakteriálních těl, který byl uskladněn několik dní v lednici, přidán 5%o neutralizovaný roztok cysteinu a ponechan v kontaktu asi 12 minut. Paralelně zkoušen titrací princip bez této látky. Opětované pokusy předně ukázaly, že ani několikadenní pobyt námi izolované substance za normálních atmosférických podmínek nenesnuje příliš její hemolytickou aktivitu, je-li chována v lednici. Druhým zajímavým faktem bylo, že cystein nejen nezvyšuje hemolytické schopnosti této látky, nýbrž v našem experimentálním zařízení spíše snižuje, i když celkem nepříliš zřetelně (pravidelně o 1 zkumavku). Podle toho by se zdálo, že hemolysin korynebakteria kmene 9231 je patrně odlišný od téže látky ze zvířecích kmenů *Corynebacterium pyogenes*, jejichž schopnost hemolyzovat není cysteinem vůbec dotčena (Hewitt). Zcela určitě je tato látka odlišná od hemolysinu *Coryn. diphtheriae* typu mitis, a to proto, že týž naprosto není látkou solubilní a že již nepatrné kvantum cysteinu zcela zabraňuje jeho tvorbě (týž autor).

Produkce O-streptolysinu je zcela inhibována nepatrnými kvanty cholesterolu (totéž popsal Hewitt i pro zvířecí kmeny *Cor. pyogenes*). Zkusili jsme tedy přidat suspensi cholesterolu (v koncentraci přibližně 1 : 500) i k námi shora izolovanému hemolytickému substrátu. V tomto případě se ukázalo, že hemolytická aktivita je zřetelně snížena, a to přibližně až o 2 zkumavky. Tento pokus byl opakován tak, že cholesterol byl v suspensi přidán přímo ke krevní plotně, na níž rozočkován kmen 9231. Mikrob vyrůstal v koloniích stejně velikých jako na plotně bez cholesterolu a po dobu prvních 48 hodin bez jakýchkoli stop hemolysy. Na kontrolní plotně byl v této době již zřetelný, třebaže úzký, pruh  $\beta$ -hemolysy. Teprve po 72 hodinách počala být hemolysa také na cholesterolovaných plotnách zřetelná, až se konečně 4. či 5. den téměř vyrovnala hemolyse kontrolní.

Nezdá se tedy, že by hemolysin lidského kmene pyogenních korynebakterií byl zcela identický s O-streptolysinem. Nebylo ovšem možno vyloučit domněnku, že se zde prolínají 2 faktory, z nichž jeden by mohl být příbuzný O-streptolysinu, kdežto druhý, jenž by se uplatňoval dodatečně (ku př. na plotnách s cholesterolem), podobný S-streptolysinu. Bernheimer a spol. ukázali, že je produkce S-streptolysinu závislá na některých frakcích ribonukleinových kyselin. Byl tehdy učiněn pokus ovlivnit hemolytickou aktivitu, a tím i konečnou produkci koncentrovaného hemolysinu, přidáním kyseliny ribonukleinové z kvasinek do kultivačních půd (v kvantu 0,5%) tekutých i tuhých. Byla-li tato látka přidána do bouillonu (jak shora popsán), v němž pěstován kmen 9231, aby se konečně získala námi zkoušená látka sonickým rozbitím těl, nebylo lze zaznamenat žádné zřetelné zvýšení hemolytické aktivity. Po přidání ribonukleinové kyseliny do krevních ploten zdály se hemolytické dvorce v některých případech širší. Výsledek však nebyl zcela pravidelný.

Zbývalo ještě zkusit, zda snad (i když to bylo velmi málo pravděpodobné) hemolysin není analogický lecithinase *Clostridium Welchii*. Pokus proveden kvantitativně se suspensí vaječných žloutků, a to metodikou, již se používá k průkazu tohoto

toxin-fermentu in vitro. Opakované pokusy daly vždy zcela negativní výsledek.

Z celé této řady experimentů lze usuzovat s jistotou, že hemolysin lidského kmene pyogenního korynebakteria — kmen 9231 — není lecithinasou a je naprosto odlišný od hemolysinu Corynebacterium diphtheriae, typus mitis. Má některé vlastnosti, kterými se blíží O-streptolysinu (zdržení nebo snížení hemolytické aktivity cholesterolem), pokud bychom vůbec chtěli činit nějaké dedukce z pokusu na krevních plotnách, snad se, byť i vzdáleně, podobá S-streptolysinu. Nejsme ovšem schopni na základě těchto pokusů vyloučit, že jde o 2 nebo více hemolytických faktorů, podobně jako je tomu právě v případě pyogenních streptokoků.

Koncentrovaný hemolytický princip kmene 9231 se ukázal látkou thermolabilní a zahřátí na 55° C po dobu 5 minut irreversibilně zničilo jeho hemolytickou schopnost. Jak níže doložíme, tato námi po prvé pokusně ověřená thermolabilita hemolysinu ukázala ještě další důležitý fakt, t. j., že hemolysin je faktorem zcela odlišným od letálního toxinu téhož mikroba, i když produkce obou látek v kulturách vzrůstá paralelně.

Poslední serie pokusů byla věnována studiu eventuálního, letálně působícího toxinu našich pyogenních korynebakterií. O pravděpodobné existenci této látky jsme se přesvědčili pokusy, uvedenými již v I. části této práce (smrt morčete, jemuž byla vstříknuta 3denní bouillonová kultura bakterií a pouze lehká přechodná reakce po injekci větší dávky živých mikrobů, promytých a resuspendovaných v čerstvém bouillonu).

Silně hemolyticky aktivní tekutina, získaná rozbitím bakteriálních těl, vstříknuta 2 králíkům i. v., a to jednomu v množství 1,5 ml a druhému 2 ml. Ihned po injekci projevovala zvířata příznaky bližícího se šoku, zrychlené dýchání a po 20—30 min. zvýšení rektální teploty. Do 2 hodin nastalo však naprosté uklidnění a obě zvířata se chovala zcela normálně po dobu asi 16 hod. u jednoho a 20 hod. u druhého. Po této době se však u obou počaly rychle vyvíjet příznaky křečových záškubů, pak paresy zadních končetin a za 1—2 hod. smrt. Makroskopický sekční nález u obou zvířat byl negativní.

Z tohoto pokusu bylo jasno, že z rozbitých mikrobiálních těl byl získán nejenom hemolysin, nýbrž i letálně působící toxin v soustředěném stavu. Kdežto hemolysin byl natolik koncentrován, že se ho mohlo použít k titraci in vitro, byla koncentrace smrtící jedovaté látky stále příliš nízká, nežli aby mohla být hodnocena kvantitativně.

Přikročeno tedy k další její koncentraci, a to tak, že sonicky získaná látka precipitována amonium-sulfátem, přidaným až do nasycení. Vytvořil se lehký precipitát, jenž oddělen od ostatní tekutiny 30minutovou centrifugací při 11 000 rpm. Sediment získaný dekantací rozpuštěn v malém kvantu fyziologického roztoku a dialysován přes noc v celofánovém váčku v proudící vodě. Po skončení dialyzy a překontrolování (barium-acetátem), že dialysovaná tekutina neobsahuje již žádný amonium-sulfát, bylo konečného produktu použito ke zkouškám na toxicitu. Šlo o lehkou kalnou tekutinu, opaleskující a

slabě nahnědlé barvy. Koncentrace proti výchozímu produktu byla téměř trojnásobná. Koncentrovaný produkt byl především vyzkoušen na množství hemolysinu. Použito vesměs též metodiky jako ve všech předcházejících případech. Paralelně s koncentrátem zjišťován titer hemolysinu výchozí tekutiny, t. j. té, jež získána přímou sonickou disrupcí korynebakterií. V serii opakovaných pokusů na několika preparátech, připravených z kmene 9231, nalezeno, že koncentrát byl asi dvojnásobně hemolyticky aktivnější nežli onen sonicky připravený extrakt, z něhož byl získán. Z přípravku s nejvyššími námi dosaženými hemolytickými titry (1 : 256 + + +) vyroben amonium-sulfátový koncentrát o titru 1 : 512 + +. Většina sonických extraktů byla ovšem méně hemolytická (1 : 128 + + +), takže v těch případech byly koncentráty účinné přibližně do zředění 1 : 256 + + +.

Vzhledem k tomu, že se králík už v dřívějších pokusech osvědčil jako zvíře velmi citlivé na toxin, vyzkoušen na nich i koncentrovaný preparát. Dvěma zvířatům (váhy kolem 2 kg) vstříknut koncentrovaný toxin i. v., a to jednomu v kvantu 1 ccm a druhému v kvantu 0,5 ccm. Prvé zvíře zašlo asi za 14 hodin po injekci, druhé po 24 hodinách a obě za naprosto stejných symptomů, jak jsme je zaznamenali po vstříknutí sonicky získaného eluátu.

V několika dalších pokusech přezkoušena orientačně thermoresistence letální komponenty toxinu korynebakteria. Bylo již shora popsáno, že krátkodobě zahřátí na 50—55° C zničilo irreversibilně hemolysin, naproti tomu letálně působící toxin zůstal zcela neoslaben. Týž smesl velmi dobře i 15minut. zahřátí na 65° C a teprve teplota 80° C, působící po dobu 5 minut, oslabila poněkud jeho účinek.

Relativní necitlivost letálního principu na teplo, zdá se, ukazuje, že patří velmi pravděpodobně do kategorie komplexních endotoxinů a nikoli mezi t. zv. toxické bakteriální proteiny (toxin difterický, tetanický), které jsou prakticky vždy látky thermolabilní. Podotýkáme, že jsme až do této doby nezískali nikdy tolik purifikovaného preparátu, aby (kromě biologických titrací) vystačil k podrobnějšímu biochemickému rozboru.

Amonium-sulfátem koncentrovaný letální toxin korynebakteria se ukázal také jedovatý pro bílou myš, a to rovněž cestou i. v. Citlivost tohoto zvířete je nesrovnatelně menší — porovnáno s králíkem — ale přesto taková, že lze u ní stanovit přibližné LD<sub>50</sub> purifikátu. Byly titrovány celkem 3krát postupně získané preparáty a propočítáno podle Reeda a Muenche. Průměrná námi nalezená hodnota LD<sub>50</sub> toxinu pro myši, vážící kolem 20 g, i. v. cestou kolísá mezi 0,25—0,3 ml purifikátu. Jako specifický účinek toxinu bylo hodnoceno pouze takové uhynutí, ke kterému docházelo po 7—20 hodinách inkubační doby za příznaků spastických pares až paralyz končetin. Malý počet zvířat zašel též do 20 min. po injekci za projevů akutního šoku, což samozřejmě považováno za nespecifický účinek koncentrátu.

#### D i s k u s e

Pátrali jsme v odborné literatuře po zprávách o prokázanych případech lidské infekce bakteriemi

podobnými našim kmenům korynebakterií. Ku podivu je jich poměrně málo. Habersang popsal r. 1926 furunkulosu veterináře, jež byla vyvolána zvířecím kmenem *Corynebacterium pyogenes*. Popis a identifikace mikroba jsou velmi neúplné.

Forgeot (1940) uvedl případ chronické pneumonie u pastýře, upomínající na aktinomykosu, vedoucí generalisací procesu k smrti. Vypěstované korynebakterium bylo velmi podobno našim kmenům až na to, že postrádalo pathogenních schopností pro laboratorní zvířata. Bližší rozbor hemolysinu nebyl autorem proveden.

Ballard, Upsher, Seely (1947) vypěstovali *Corynebacterium pyogenes* současně s pathogenním stafylokokem z nekrosy po omrzlinách na noze. Choroba měla rovněž chronický charakter. Pyogenní korynebakterie se daly prokázat v pomalu se hojící raně i potom, když z ní stafylokok vymizel, a byly dokonce jednou zachyceny i v krvi pacienta. Isolované korynebakterium koagulovalo mléko, bylo silně hemolytické, ale prakticky nepochybně pro laboratorní zvířata. Bouillonovými kulturami tohoto bakterie byl hyperimunizován králik, jehož serum po skončené imunizaci neutralisovalo *in vitro* hemolysin zvířecího kmene *Corynebacterium pyogenes*, zaslaný k tomu cíli Lovellem.

Zvláštní a zajímavou kapitolou jsou poměrně četnější nálezy atypických korynebakterií na lidských tonsilách. Tato korynebakteria, podobná daleko více druhům známým ze zvířecí pathologie (*C. pyogenes*, *C. ovis* Preisz-Nocardi) nežli lidské difterii, měla někdy jasný vztah k anginosnímu onemocnění, častěji však byla vypěstována náhodně z lidských nosohltanů při masovém odběru výtěrů.

Gilbert a Stewart (1926) popsali celkem 31 atypických kmenů, vypěstovaných z nosohltanů venkovského obyvatelstva, mezi nimiž probíhalo necharakteristické, ale difterii podobné onemocnění. I když v některých z těchto případů byly vypěstované atypické korynebakterie (nazvané autory *Corynebacterium ulcerans*) pouze druhotnou florou vedle skutečného difterického bakterie, pro jiné se zdála jejich etiologická role nesporná. Bakterie byly biologickými vlastnostmi zcela odlišné od *C. diphtheriae*, a to zvláště svou želatinolytickou schopností a nápadnou pathogenitou pro králíka. Průběh experimentální infekce byl preventivně neovlivnitelný difterickým antitoxinem. Autoři nabyli dojmu, že ze známých mikrobů byly jimi vypěstovány kmeny nejpodobnější atypickému Preiszovu-Nocardovu bacilu.

Barrat (1933) vypěstoval z lidských nosohltanů 4 kmeny podobné předcházejícím, a to 1 z nich při klinicky nesporném anginosním onemocnění. Při popisu jejich biologických vlastností zdůraznil opět želatinolytickou schopnost bakterií, potvrdil jejich špatný vzrůst na telluritových půdách a našel, že nejsou serofilní. Vzrůstem v bouillonu připomínaly autorovi bacila Preiszova-Nocardova, s nimiž prý měly nejvíce podobnosti. Obraz experimentální infekce morčete byl úplně stejný jako u námi izolovaných kmenů.

Feierabend a Schubert vypěstovali z případu dětské maligní difterie *Corynebacterium*, které vyvolávalo u morčete nekrotický absces. Vytvoření nekros ne-

bylo lze zabránit difterickým antitoxinem. Podrobné studium těchto kmenů nebylo provedeno, neboť autoři byli toho názoru, že šlo o skutečnou difterii s antigenně odlišným toxinem.

Mair (1928) isoloval z člověka kmen korynebakteria, označený jako č. 2255, který byl dodatečně studován Barratem a o něco později Petriem a Mc. Clearem. Toto zvláštní *Corynebacterium* fermentovalo škrob a zkapalňovalo želatinu. Vstříknuto morčeti s. c., usmrtilo je do 3 dnů. Sekční nález byl velmi podobný difterické intoxikaci. Bylo-li morče před infekcí pasivně imunizováno 1000 j. dift. antitoxinu, zůstalo na živu, ale v místě infekce se přesto vyvinul veliký absces. Dalším rozbořením bylo zjištěno, že Mairovo *Corynebacterium* produkovalo 2 různé toxické látky, z nichž jedna byla neutralizovatelná velkým kvantem difterického antitoxinu, druhá nikoli. Tato poslední složka a podobně i některé z ostatních biologických vlastností bakterie (zejména želatinolýza) je činila podobným *Corynebact. Preisz-Nocardovu*. Autoři byli toho názoru, že Mairův kmen je skutečným přechodem mezi *Corynebacterium ovis* a lidským difterickým korynebakteriem.

Nověji Jebb (1948) prostudoval celkem 26 atypických kmenů, podobných předcházejícímu. Z těchto bylo 24 izolováno z lidského nosohltanu. Všechna tato korynebakteria byla želatinolytická a zřetelně hemolytická (s úzkou zónou  $\beta$ -hemolýsy). Pokud byly studovány morfologické a vzrůstové vlastnosti všech těchto kmenů, nalezeny podobnosti i s *C. ovis* i s *C. diphtheriae* typu *gravis*. Intradermální injekce kultury morčeti vyvolávala absces nebo ulceraci, subkutánní většinou zvířata zabíjela za příznaků, jež bylo možno označit za přechodné mezi symptomy experimentální difterické infekce a obrazem, který u téhož zvířete vyvolává *Corynebacterium ovis* (Preisz-Nocardi). U některých kmenů bylo možno zabránit smrtelnému konci pokusu difterickým antitoxinem, vstříknutým preventivně ve velkých dávkách.

Jako ústní sdělení, které jsme si nemohli ověřit přímo v odborné literatuře, zaznamenáváme, že v Japonsku (při pátrání po difterických nosičích) byla nikoli ojediněle vypěstována korynebakteria nápadně mohutných hemolytických schopností, s více či méně účinným toxinem, jenž není neutralizován difterickým antitoxinem. O výsledcích prohloubeného studia těchto bakterií nejsme informováni. Podle všeho se zdá, že se velmi podobají korynebakteriím z našich případů.

Většina starších prací, a dokonce i některé novější, popisuje atypická korynebakteria, nacházená u člověka, značně neúplně. Velmi často chybí podrobnější popis jejich hemolysinu, někdy dokonce ani neuvedeno, zda vůbec hemolysují. Jindy nejsou rozebrány vlastnosti jejich toxinů a zhusta chybějí údaje o tom, jak rostou na telluritových půdách a zda mění mléko nebo želatinu. Právě těchto 5 uvedených vlastností tvoří nejdůležitější komplex znaků, jimiž možno atypická korynebakteria rozlišit téměř s naprostou jistotou od difterického korynebakteria a ohodnotit jejich skutečnou příbuznost nebo alespoň podobnost s běžnými vyvolavateli zoonos, a to hlavně s *Coryne-*

bacterium pyogenes a Corynebacterium Preisz-Nocardii (ovis).

Celkem však nutno potvrdit, že pathogenní korynebakteria (mimo druhy striktně anaerobní), odchylná od Löfflerova bacila a příbuzná známým druhům pathogenních korynebakterií zvířecích, bývají u člověka častěji, nežli se běžně má za to. Nemyslíme samozřejmě, že by tato korynebakteria vždy projevovala svoje výrazně pathogenní vlastnosti pro genus humanum. Častěji jsou spoluúčastna jako druhotná infekce na pathologickém procesu, primárně vyvolaném jiným agens, nebo se vyskytují na povrchu lidských sliznic (nosohltan, genitál) jako epifytická flora. Jejich schopnosti toxigenní jsou však někdy tak význačné, že jejich přítomnost u člověka znamená vždycky jisté nebezpečí, a proto také jejich výskyt u téhož musí být sledován plynule a jejich pathogenní role studována do podrobností.

Příčinou, proč jsou atypická pathogenní korynebakteria poměrně málo popisována, je podle našeho soudu ta okolnost, že jejich izolace je snadná pouze tam, kde bývají v relativně čisté kultuře a ve velkém množství. Jinou příčinou jejich zdánlivé vzácnosti výskytu je mimo jiné také to, že se pro izolaci korynebakterií z nosohltanu běžně vžilo užívání telluritových půd, na nichž atypické kmeny rostou špatně nebo pomalu, či vůbec nikoli. Naše zkušenost ukázala, že lze nejsnáze zachytit (určitě to platí pro silně hemolysující korynebakteria námi izolovaného typu) tyto bakteriální druhy na krevních plotnách za anaerobních podmínek i tehdy, jsou-li přítomny ojedinele a ve velmi smíšené bakteriální flóře.

Námi izolovaná hemolytická korynebakteria mají, jak se zdá, nejvíce podobnosti se zvířecími kmeny Corynebacterium pyogenes (Poels). V práci jsme ovšem rovněž zdůraznili jejich odchylné vlastnosti, porovnáno s klasickým popisem druhu. Těžko se můžeme vyjádřit, zda nalezené odchylky jsou vyjádřením normální šíře variability zvířecího genus, či zda snad znamenají, že námi vypěstované kmeny korynebakterií jsou skutečně přechodným typem mezi genus C. pyogenes a genus Preisz-Nocardii. Naše nejistota je také důvodem, že jejich přesnou taxonomickou pozici necháme prozatím neuzavřenou. Velmi zajímavá je ta okolnost, že ani u jediného z našich pacientů nebylo lze prokázat intenzivnější kontakt se zvířetem (snad kromě styku s kočkami), a to zejména nemocným. Případ nosičství v nosohltanu a 2 případy infekce ženského genitálu zvláště jasně ukázaly, že je nutno uvažovat i o třetí možnosti, že totiž naše kmeny jsou samostatným genus s vlastnostmi, jimiž se jednak blíží zvířecímu C. pyogenes, jednak C. ovis. Jestliže toto genus skutečně existuje, bylo by podle našeho názoru vlastní už pouze člověku, vzniklo ze zvířecích kmenů plynulou adaptací na téhož, a jsouc fixováno svým nynějším pobytem na nového hostitele, přestalo být činitelem zoonotickým. Epidemio-logickým důsledkem vzniku této varianty by byla možnost jejího přímého přenosu s člověka na člověka.

Podrobné studium hemolysinu kmene 9231, jenž byl pro nás prototypem izolovaných korynebakterií, prokázalo zajímavá fakta. Za prvé se zjistilo, že termolabilní hemolysin je elementem sice filtrovatel-

ným, ale produkovaným tak pomalu do kultivačních půd, jako by se uvolňoval teprve rozpadem bakterií. Na rozdíl od klasických popisů Corynebacterium pyogenes zůstává jeho titer v kulturách stále nízký. Hemolysin sám je jen částečně inaktivován cholesterolem, ale stejně na něj působí i cystein, jenž podle údajů prý nemá vliv na hemolysin zvířecích kmenů. Citlivostí na cystein by se zdály naše kmeny příbuzné lidské difterii, jejichž nesolubilní hemolysin je jím ovšem zase ničen.

Uvedli jsme už, že nevylučujeme u kmene 9231 přítomnost 2 nebo více hemolytických komponent mikroba, které jsou snad podobné streptolysinu O a S. Proti tomu, zdá se, však svědčí ta okolnost, že jsme nemohli vždy prokázat jasné a vydatné zvýšení produkce hemolysinu nukleinovými kyselinami. Kvůli úplnosti zde podotýkáme, že je hemolysin Preisz-Nocardova bacila (pokud byl vůbec sám o sobě studován) ještě mnohem slabší nežli hemolysin našich kmenů a kromě toho je pokládán za látku nesolubilní.

Novinkou naší práce bylo, že jsme ukázali na možnost získání velkých kvant hemolysinu sonickým rozbitím bakteriálních těl a následnou ultracentrifugací. Takto zahuštěný hemolysin (přibližně 10krát účinnější) bylo lze ještě dále koncentrovat precipitací amonium-sulfátem. Stejným postupem a současně s hemolysinem se koncentroval z kultury kmene 9231 thermostabilní a letálně působící princip, patrně charakteru komplexního endotoxinu. Na tento endotoxin je podle všeho nejcitlivějším zvířetem králik, o něco méně morče, nejméně myš. Jedovatost této látky (porovnáno s toxickými bakt. proteiny) je ovšem relativně malá, ale jde nesporně o substrát charakteru toxinu, neboť působí i při i. v. vstříknutí až po zřetelné inkubační době a vyvolává u zvířat premortální spastické paresy, pak paralysy a nakonec je usmrcuje.

V řadě uvedených pokusů jsme prokázali, že endotoxin a hemolysin kmene 9231 jsou 2 zcela odlišné látky.

Schopností vyvolávat lokálně nekrotický absces připomínají naše kmeny opět více C. ovis nebo atypická želatinolytická korynebakteria, izolovaná z člověka různými autory. Na rozdíl od kmene Mair a kmenů izolovaných Jebbem nebylo lze v žádném případě u našich korynebakterií zjistit, byť i sebemenší antigenní příbuznost letální komponenty toxinu s toxinem lidské difterie.

Všechna tato fakta (a zejména v II. části práce, dosud nikde neudávaná), jak se zdá nejspíše podporují domněnku, svědčící o samostatnosti námi nalezených lidských kmenů atypických korynebakterií. Naše kmeny se většinou svých vlastností nesporně více podobají Corynebacteriu pyogenes, ale při podrobném studiu mají znaky považované za typické pro Corynebacterium ovis.

Uznáváme, že našemu názoru o tom, že námi zjištěné kmeny korynebakterií jsou fixními lidskými druhy, chybí zcela objektivní a nesporný epidemiologický podklad. Bude věcí dalšího pátrání a sledování většího množství případů přinést konečný a nesporný důkaz o těchto skutečnostech.

Jestliže však už nyní vřadíme svoje vlastní poznatky do serie těch pozorování, která byla učiněna před námi (viz zejména nález Mairova kmene a kmenů Jebbových), nemůžeme si odpustit tento závěr: pátrání po toxických kmenech atypických korynebakterií, nalezených u člověka, a jejich podrobnému studiu je nutno věnovat prohloubenou pozornost z několika důvodů.

Především není vyloučeno, že právě tato korynebakteria jsou důkazem vysoké možnosti adaptace zvířecích parazitických bakterií na člověka. Tato adaptace mikrobů vede ve svých důsledcích k tomu, že se adaptované bakterium stává samostatným druhem, jenž ztrácí svůj původně zoonotický charakter a mění se v lidského komensála až parazita. Tento se nadále šíří už pouze interhumánním kontaktem a je potenciálně schopný vyvolávat lidská onemocnění, dříve neznámá.

Konečně — a to pokládáme ještě za důležitější — lze očekávat, že dalším podrobným studiem atypických korynebakterií lidských a systematickým sledováním nových případů vyvstane před námi nová řada variant, po případě druhů. Tato pak bude moci být vykládána ve svém celku jako obraz postupného vývoje korynebakterií, a to od zvířecích patogenů až ke korynebakteriu lidské difterie.

#### Z á v ě r

Popsali jsme 12 kmenů hemolytických korynebakterií, izolovaných většinou jako druhotná infekce z nekrotisujících ran, dvakrát z poševního výtoku, jednou z lidské sleziny, jednou z dětské osteomyelitidy v čisté kultuře a jednou z krku ošetřovatelky, která nejevila žádných známek onemocnění.

Kromě produkce rozpustného hemolysinu měly všechny tyto mikroby řadu společných znaků, t. j. byly slabě želatinolytické, koagulovaly mléko, byly mikroaerofilní a serofilní v prvých pasážích, nerostly na půdách s kalium-telluritem a byly velmi citlivé na penicilin. Osm z těchto dvanácti kmenů bylo velmi pathogenních pro laboratorní zvířata, zejména králík a morče.

Podrobné studium morfologických, kultivačních a biologických vlastností ukázalo, že jsou blízce příbuzná zvířecímu *Corynebacterium pyogenes*, že se však přece jen od typických zvířecích kmenů tohoto bakteria výrazně liší jednak tím, že mají znaky blízké zvířecímu *Corynebacterium ovis*, jednak takové, které nebyly dosud u žádného kmene popsány. Jde tedy snad buď o lidské adaptační varianty zvířecího *Cor. pyogenes*, nebo o samostatný genus, přechodný mezi *Cor. pyogenes* a *Cor. ovis*.

Mladé bouillonové kultury i bakterií prosté dekantáty mladých kultur nepatrně aglutinují králičí krvinky. Tento fenomen je vyvinut u kultur, jež ještě buď neobsahují hemolysin, nebo kde je přítomen v malém množství. Aglutinace předchází hemolysu a dosahuje vyššího titru. Její účinný princip není asi shodný s hemolysinem, zdá se podobný látkám nalezeným v některých saprofytických bakteriích a u *Haemophilus pertussis*.

Pro pyogenní korynebakterie typický hemolysin a zároveň endotoxický princip mohl být izolován v koncentrované formě z těl bakterií, jež byly roz-

bity ultrazvukem. Bylo použito tři dny starých odstředěných bouillonových kultur kmene 9231 (osteomyelitis). Další koncentrace hemolysinu t endotoxinu bylo dosaženo precipitací amonium-sulfátem s následnou dialysou.

Proti názoru některých autorů bylo však dokázáno, že je hemolysin úplně odlišný od smrtící součásti toxinu. Hemolysin je thermolabilní a úplně se ničí při 50° C během několika minut; má některé vlastnosti O a S streptolysinu.

Endotoxická komponenta je thermostabilní (snese zahřátí na 80° C po 5 minut). Obsahuje bílkoviny a hubí po nitrožilní aplikaci bílé myšky a králíky po osmi až dvacetihodinové inkubaci. U pokusných zvířat vřestupné obrny, začínající od zadních končetin, předcházely smrt. Endotoxin nebyl zvláště silný, jeho lethální dávka byla přibližně 0,25—0,5 ml pro králíka vážícího asi 2 kg.

Na podkladě těchto rozborů je prodiskutována definitivní taxonomická pozice lidských hemolytických korynebakterií.

Porovnájí-li se mikroby v naší práci s oněmi, jež popsány v literatuře, zjistíme, že byly izolovány z člověka atypické korynebakterie, upomínající jako naše na *Cor. pyogenes*, řada jiných podobných *Cor. ovis*, a konečně ty, jež tvoří přechod mezi *Cor. ovis* a *Corynebacterium diphtheriae*.

Tím se nabízí domněnka, že mezi atypickými korynebakteriemi izolovanými z člověka lze najít varianty zvířecího *Cor. pyogenes* a *Cor. ovis* a řadu přechodných typů, jež, pečlivě porovnány, snad dokumentují vývoj od zvířecích korynebakterií k lidské difterii.

#### В ы в о д ы

##### Ф. П а т о ч к а : Человеческие разновидности *Corynebacteria pyogenes*

Описано двенадцать штаммов гемолитических коринебактерий; в большинстве случаев они были изолированы в качестве вторичной инфекции некротических ран: Два раза из белей, один раз из селезенки человека, из остеомиелита у ребенка (в чистой культуре) и один раз из гортани медсестры, которая явилась совсем здоровой.

Кроме продукции растворимого гемолизина все эти микроорганизмы имели ряд общих черт, т. е. слабо розжиждали желатину, свертывали молоко, явились микроаэрофильными и серофильными в первых пассажах, на питательных средах с теллуридом калия не росли и явились очень чувствительными к пеницилину. Восемь из этих двенадцати штаммов были очень патогенны для лабораторных животных, главным образом для кроликов и морских свинок.

Подробное изучение их морфологических, культивационных и биологических качеств показало, хотя они близко сродны с *Cor. pyogenes* животных, что они явно отличаются от типичных штаммов этой бактерии. С одной стороны у них черты связывающие их с *Cor. ovis*, и с другой стороны у них черты, которые до сих пор не были описаны ни у одного их рода. Итак эти микроорганизмы или адаптированные на че-

ловека варианты *Cor. ovis*, или они составляют самостоятельный род стоящий между *Cor. pyogenes* и *Cor. ovis*.

Молодые культуры в бульоне, даже безбактерийные надсадочные жидкости молодых культур тонко аглютинируют эритроцитов кролика. Этот феномен присущий культурам у которых или отсутствует гемолзин или его находится очень мало. Аглютинация осуществляется перед гемоллизом и достигает высокого титра. Его активное начало вероятно не идентично с гемолизином — кажется, что оно подобно субстанциям, которые находятся у некоторых сапрофитических бактерий и у *Haemophilus pertussis*.

Типическое для пиогенных коринебактерий и одновременно токсическое начало можно было изолировать в концентрированной форме из бактериальных тел разрушенных ультразвуком; применялись три дня старые бульоновые культуры штамма 9231 (остеомиелит). Дальнейшая концентрация произведена преципитацией сульфатом аммония с последующим диализом против водопроводной воде.

В противоположность мнению некоторых авторов можно было доказать, что гемолзин полностью отличается от детальной составной части токена. Гемолзин неустойчив к теплу и полностью уничтожается в течение несколько минут под влиянием 50° C. Тот самый имеет некоторые свойства O и S стрептолизиннов.

Эндотоксический компонент устойчив к теплу (выдержит нагревание на 80° C на 5 минут). Он содержит белки и убивает интравенозным введением мышей и кроликов после 8—20 часового инкубационного периода. Смерть наступала после асцендентного паралича, начиная с задних конечностей. Эндотоксин не является очень сильным; его LD<sub>50</sub> — 0,25—0,5 мл для кролика в 2 кг веса.

На основе этих разборов ведется дискуссия по окончательному таксономическому положению гемолитических коринебактерий человека.

#### Summary

#### F. Patočka: Human Variants of *Corynebacterium Pyogenes*

Twelve strains of haemolytic corynebacteria are described which were mainly isolated from cases of secondary infection of necrotic lesions, twice from a vaginal discharge, once from a human spleen, once from a case of osteomyelitis in a child (in pure culture), and once from a throat of a nurse who otherwise showed no signs of illness.

Besides the production of a soluble haemolysin, all these microbes had certain common characteristics, i. e., they liquefied gelatine to a small degree, clotted milk, were microaerophilic and serophilic in their first passages, did not grow on media with potassium tellurite, and were very sensitive to penicillin. Eight of the twelve strains were very pathogenic to laboratory animals, especially to rabbits and guinea pigs.

Detailed studies of their morphological, cultural and biological properties proved, that although the microbes are closely related to the animal *Corynebacterium pyogenes*, they distinctly differ from the typical animal strains of this bacterium. On the one hand they have certain characteristic that bind them to *Corynebacterium ovis*, on the other they possess such features that hitherto have not been described in any genus.

These microorganisms may either be human variants of animal *Corynebacterium pyogenes*, or may form an independent genus standing between *Cor. pyogenes* and *Cor. ovis*.

Young broth cultures, even bacteria-free supernatant fluids of young cultures, slightly agglutinate rabbit erythrocytes. This phenomenon is present in cultures which do not yet contain haemolysin, or where it is present in small quantities. Agglutination precedes haemolysis and attains a high titre. Its active principle is not probably identical with the haemolysin, it seems to be similar to substances found in some saprophytic bacteria and *Haemophilus pertussis*.

A haemolysin typical of pyogenic corynebacteria and an endotoxic principle could be isolated simultaneously in concentrated form from bacterial bodies disrupted by supersonic waves. Three day old centrifuged broth cultures of strain 9231 (osteomyelitis) were used. Further concentration of the haemolysin and endotoxin was achieved by precipitation with ammonium sulphate followed by dialysis against tap water.

In contradistinction to the opinion of some authors it could be proved, however, that the haemolysin is completely distinct from the lethal component of the toxin. The haemolysin is thermolabile and is completely destroyed within several minutes on 50° C. The same has some properties of the O and S streptolysin.

The endotoxic component is stable to heat (supports heating to 80° C for minutes). It contains proteins and kills by intravenous injection mice and rabbits after an 8 to 20 hour incubation period. The death of experimental animals was preceded by an ascendent paralysis beginning with the hind legs. The endotoxin was not very potent, its LD<sub>50</sub> being 0.25—0.5 ml for a rabbit weighing about 2 kilos.

On the basis of these analyses the definite taxonomic position of human haemolytic corynebacteria is discussed.

When we compare the microbes described in our report with those that are presented in world bibliography we discover that in man there were isolated atypical corynebacteria which (like ours) resemble *Cor. Pyogenes*, a scale of others similar to *Cor. ovis*, and lastly those that stand somewhere halfway between *Cor. ovis* and *Cor. diphtheriae*.

As a result it seems that among the atypical corynebacteria isolated in man there can be found variants of animal *Cor. pyogenes* and *Cor. ovis* and a scale of transitory types which perhaps signify a development of animal corynebacteria into those of human diphtheria.

## Literatura

1. Ballard, D., Upsher, A. and Seely: Am. J. Clin. Path 17 : 209, 1947. — 2. Barrat: J. Path. and Bact. 36 : 369 1933. — 3. Bergey: Manual of Determinative Bacteriology 1948. Balt. W. + W. — 4. Carne: J. Path. and Bact. 49 313, 1939. — 5. Forgeot: Ann. Inst. Pasteur. 65 : 320, 1940 — 6. Habersang: Berl. tierärztl. Wchnschr. 42 : 262, 1926 — 7. Hall-Stone: J. Infect. Dis. 18 : (195, 1916. — 8. Hewitt L. F.: J. Path. and Bact. 59 : 145, 1947. — 9. Jebb, W. H. H. J. Path. and Bact. 60 : 403, 1948. — 10. Lovell, R.: J. Path and Bact. 45 : 339, 1937. — 11. Lovell, R.: J. Path. and Bact. 49 : 329, 1939. — 12. Lovell, R.: J. Path. and Bact 52 : 295, 1941. — 13. Lovell, R.: J. Path. and Bact. 56 525, 1944. — 14. Mellon: J. Bact. 2 : 81, 1917. — 15. Merchants: J. Bact. 30 : 95, 1935. — 16. Morton: Bact. Rev. 3. 1910. — 17. Ochi-Zaizen: J. Japanese Soc. Vet. Sc. 15 : 13. 1936—1937. — 18. Ochi-Zaizen: J. Japanese Soc. Vet. Sc 16 : 8, 1936—1937. — 19. Petrie and McClean: J. Path. and Bact. 39 : 635, 1934. — 20. Todd: J. Path. and Bact. 47 . 423, 1938. — 21. Senthille: Ann. Inst. Pasteur 66 : 78, 1911. — 22. Bláha-Dvořáček: ČLČ LXXXVIII, 561, 1949.