

Ústav pro lék. mikrobiologii a imunologii lék. fak. KU (přednosta prof. Dr F. Patočka)

PRŮZKUM FAKTORŮ OVLIVŇUJÍCÍCH VIRULENCI LISTERIA MONOCYTOGENES*)

FRANTIŠEK PATOČKA a JIŘÍ SCHINDLER

Pokud je nám známo z přístupné literatury, nebyl dosud z genus *Listeria monocytogenes* — s výjimkou zjištění uváděného Stanleyem — izolován ani jasný toxický princip, ani frakce, jež by v relativně čisté formě mohla být považována za faktor virulence tohoto mikroba. S tím kolidují některé nálezy pathologicko-anatomické, zejména jasně vyjádřený názor Flammův, který dokazuje, že u myšek podléhajících infekci listeriemi do 3 dnů vznikají nekrosy jaterního parenchymu přesvědčivě toxibakteriálního charakteru.

Bylo smyslem naší práce pokusit se orientačně o důkaz některého z uváděných faktorů virulence či toxicity listerií.

Celkem bylo málo pravděpodobné, že by podstatným faktorem virulence *Listeria monocytogenes* byl její oxygenlabilní hemolysin, který je filtrovatelný a podobně jako streptolysin O aktivovatelný cysteinem. Jeho existenci jsme prokázali nejen v bujónové kultuře, ale našli jsme, že persistuje v prokazatelných titrech i ve sterilním autolysátu, jehož se užívalo k pokusům níže uvedeným. Kompletní hemolysa 0,25% králičích krvinek nastávala při dávce 0,045 mg autolysátu, v našem případě v titru 1:16. Připomínáme existenci hemolysinu jen kvůli úplnosti, neboť není možno vyloučit jej jako pomocný faktor virulence, jemuž má být v pokusech věnována pozornost.

Jediná, až dosud známá toxická látka, izolovaná z těla listerie, byl polysaccharid popsán Stanleyem v roce 1949. Bylo tedy pochopitelné, že jsme své první pokusy orientovali na izolaci této látky a prověření její toxicity a později eventuálně na zjištění, zda nemá podpurný vliv na infekci. Současně s tím jsme se snažili zachytit i jiné možné toxické produkty, jež citovaný autor ve své práci neuvádí.

Uvedeme zde stručně metodiku našeho preparačního postupu:

48hodinová kultura z glukosového bujónu byla opakovaně zcentrifugována, resuspendována do alkoholéteru a ponechána extrakci přes 48 hod. v lednici. Sušina mleta 24 hodiny na kulovém mlýnku, pak extrahována v destilované vodě po 48 hodin, čímž získána medově žlutá kapalina.

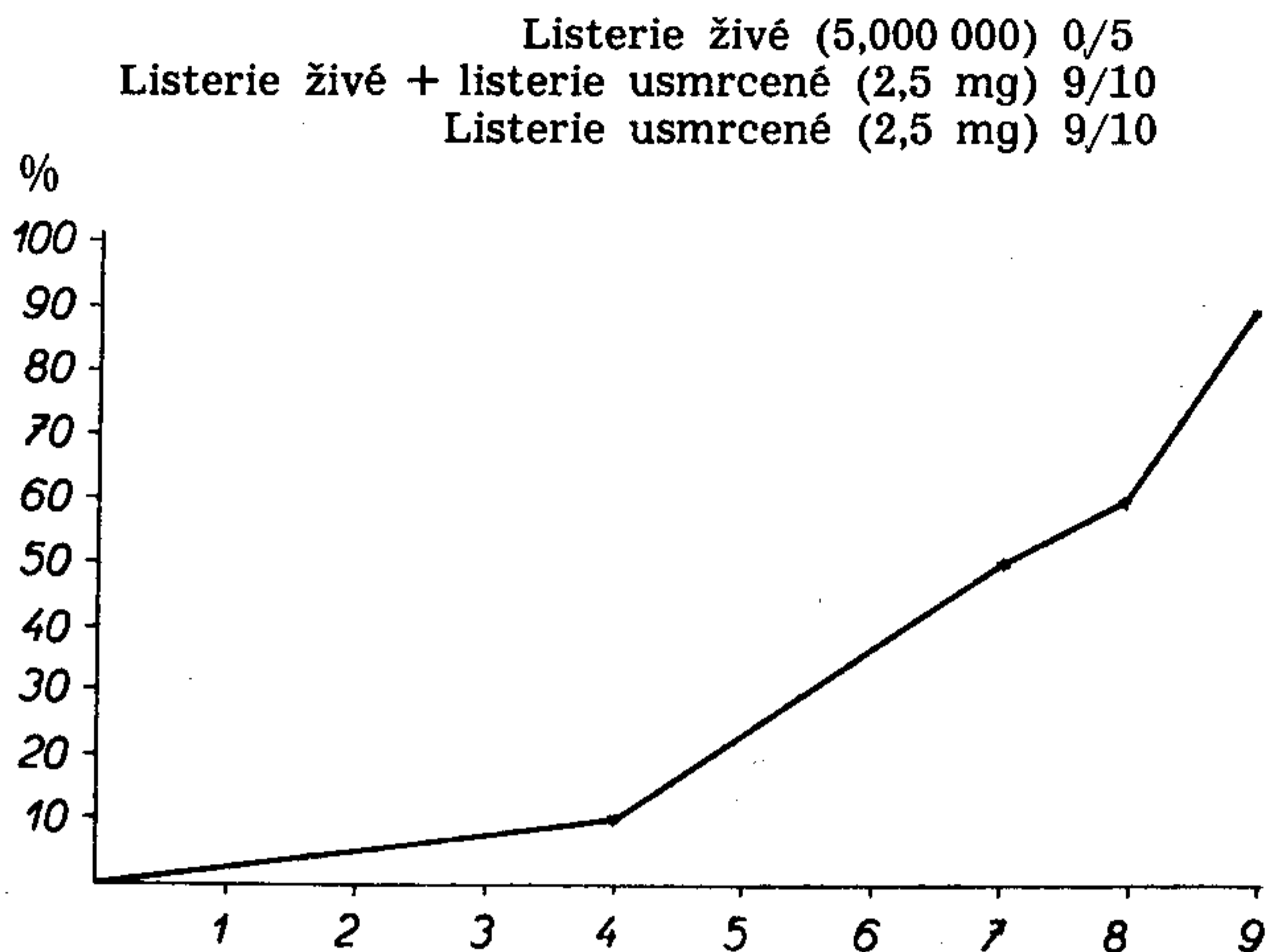
1. Extrakt vyluhován třikrát chloroformem, poté nasycen krystalickým amonium sulfátem. Po odstavení při +40°C získána bohatá vločkovitá sraženina. Získaný precipitát se lehce rozpouští v desetině původního objemu destilované vody. K supernatantu přidány 2 objemy ethanolu a krystalický natrium acetát do konečné 10% koncentrace. Po 24 hodinách se vytvořila jemná, hedvábná, vločkovitá sraženina. Centrifugací sediment oddělen, promyt několikrát ethanolom a rychle vysušen ve vakuu. Získán křídově bílý prášek, jenž po rozpuštění dával silně pozitivní reakci Molischovu, neredukoval Fehlingův roztok a nedával pozitivní reakci na bílkoviny. Tento preparát, jímž jsme se přiblížili — pokud možno podle neúplného popisu — k polysaccharidové složce Stanleyově, byl naředěn do koncentrace 50 mg/ml, t. j. 5%. Označen SII.

2. Vodný extrakt alkoholéterové sušiny smíchán s přechlazeným acetonem (−20°C) v poměru 30 ml k 85 ml a po přidání ledové kyseliny octové (3 ml) uložena směs při −25°C po 48 hodin. Po této době se vytvořil vločkovitý sediment, jenž byl dekantací a

*) Předneseno na sjezdu o anthroozoonosách v květnu 1956 v Praze.

rychlou centrifugací, při níž teplota nepřestoupila -5°C , oddělen. Sediment poté rozpuštěn ve vychlazené destilované vodě, dialysován v ledničce proti destilované vodě po 24 hodiny. Označen ACIV.

3. Vodný extrakt po chloroformové extrakci vysrážen přidáním 2 objemů ethanolu. V lednici vzniklý precipitát oddělen centrifugací. Sediment vysušen ve vakuu a rozpuštěn v destilované vodě. Označen STI.



Obr. 1. Smrtnost myšek v % při i. p. aplikaci dvakrát promyté kultury živých listerií v dávce $5,10^6$ společně s 2,5 mg mrtvých listeriových těl.

4. Vodní extrakt alkoholéterové sušiny po 72hodinové extrakci označen D.

5. Polysaccharid připraven podle metodiky Fullerovy tak, jak se ho používá pro precipitační reakce. Označen F.

Všechny tyto preparáty testovány na toxicitu na myškách ve skupinách po čtyřech, ve váze 11–13 g; cestou i. p. v dávce 0,5 ml, i. v. 0,5 ml a cestou i. c. v dávce 0,03 ml. Přepočteno na absolutní množství u preparátů STII a F, bylo při i. p. aplikaci vstříkováno 25 mg a 10 mg substance, při i. c. aplikaci 1,6 mg a 0,6 mg substance.

Žádná z myšek v tomto pokusu nezašla. Také králík 2200 g těžký, jemuž bylo vstříknuto intra venam 1,5 ml preparátu SII (t. j. 75 mg substance), přežil a nejevil ani nejmenší náznak alterace. Ačkoli jsme užili dávky u králíka 15krát větší než Stanley, nepozorovali jsme tedy u popisovaného polysaccharidového preparátu letální efekt. Také v pokuse na myškách jsme nedocílili pozitivního výsledku.

V druhé řadě jsme uvažovali o případném vlivu povrchových složek mikrobiálních těl či látek uvolňovaných v prvních 24 hodinách růstu listerií do kultivačního media. Studovali jsme vliv promývání mikrobů fyziologickým roztokem na jejich virulenci.

Dvěma skupinám myšek po 24 zvířatech vstříkováno 6 různých dávek 24hodinové kultury listerií. Každou dávkou očkovány i. v. 4 myšky; dávky od 5500 mikrobů zvyšovány vždy 10krát do dávky 550 milionů. První skupina obdržela bujónovou kulturu, druhá suspensi mikrobů 2krát promytých ve fyziologickém roztoku. Výsledek byl zpracován podle statistické metody Reeda a Muencha.

U nepromytých mikrobů stanovena $LD_{50} = 1\,600\,000$ zárodků. Počet živých mikrobů se promýváním nezměnil, v 1 ml bujónové kultury stanoveny 2,2 miliardy, v proprané suspensi 2,3 miliardy.

Ke stejným výsledkům jsme došli i při i. p. aplikaci. Toto, byť i přesvědčivé zjištění registrujeme s rezervou pro nověji diskutovanou, ne zcela úplnou spolehlivost uvedené statistické metodiky v bakteriologii vůbec. Vhodnější metody statistického zpracování podle Boneta-Maury & spol. nebylo možno na našem materiálu použít.

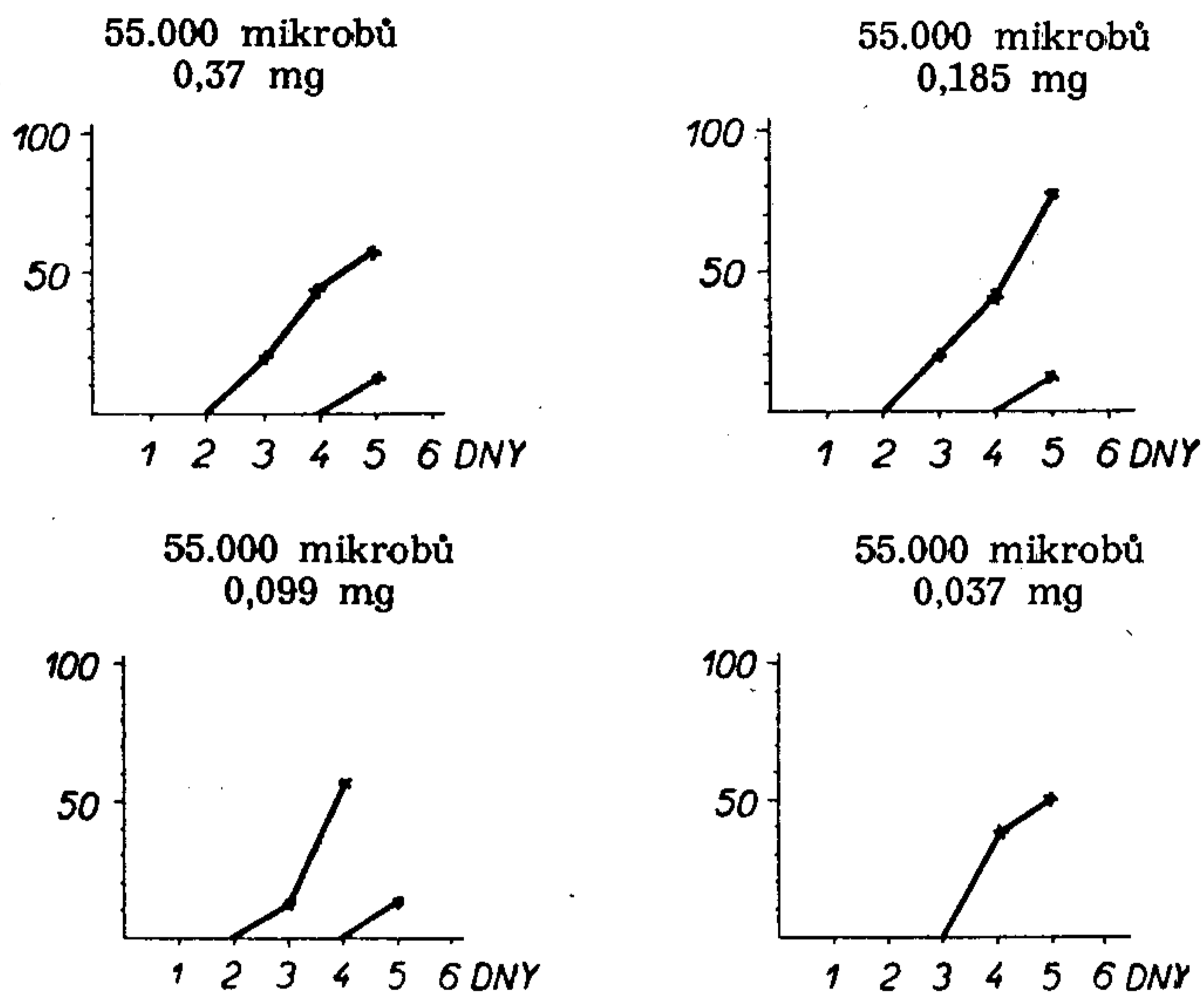
V další práci jsme obrátili svou pozornost na složky mikrobiálních somat.

Centrifugát dvoudenní bujónové kultury byl smíchán s alkoholéterem, mikroby tak usmrceny po 48 hodinách při $+4^{\circ}\text{C}$. Poté usušen ve vakuu a resuspendován ve fyziologic-

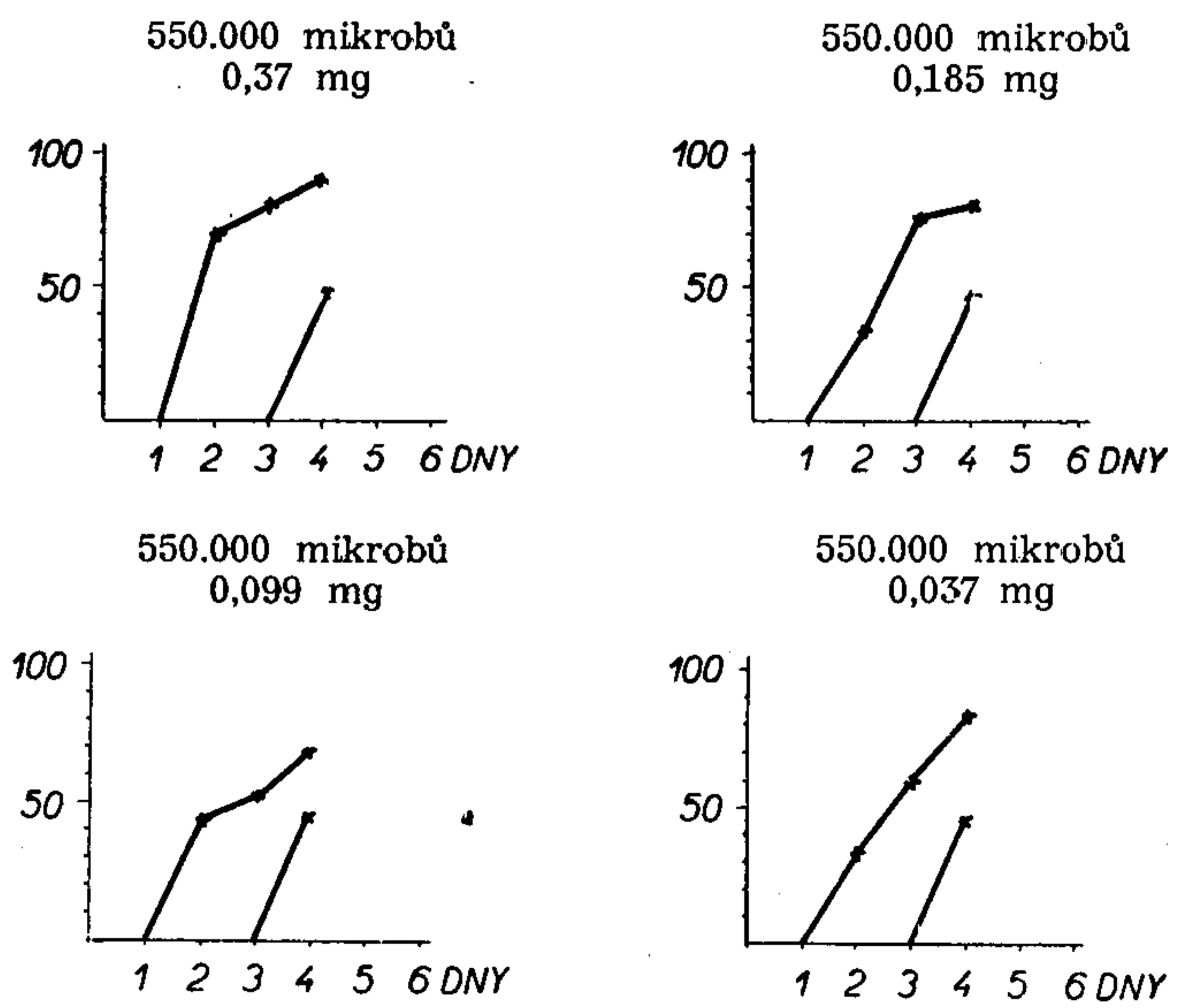
kém roztoku. Myškám vstříkováno společně s infikujícím množstvím listerií živých, 0,25 ml suspence mrtvých mikrobů v dávce odpovídající 2,5 mg sušiny. Uspořádání pokusu a výsledky ukazuje obr. 1.

V předvedeném pokuse je patrný potencující vliv mrtvých těl listerií na experimentální infekci. Účinný princip je tedy obsažen v plasmatické substanci listerií.

Abychom uvolnili co nejšeterněji endocelulární hmotu, podrobili jsme čerstvé kultury autolyse při nízké teplotě.



Obr. 2. Smrtnost myšek v % při i. p. aplikaci 55 000 listerií společně s různými dávkami autolysátu v mg vlhké váhy. (Nižší křivka znázorňuje kontrolní pokus.)

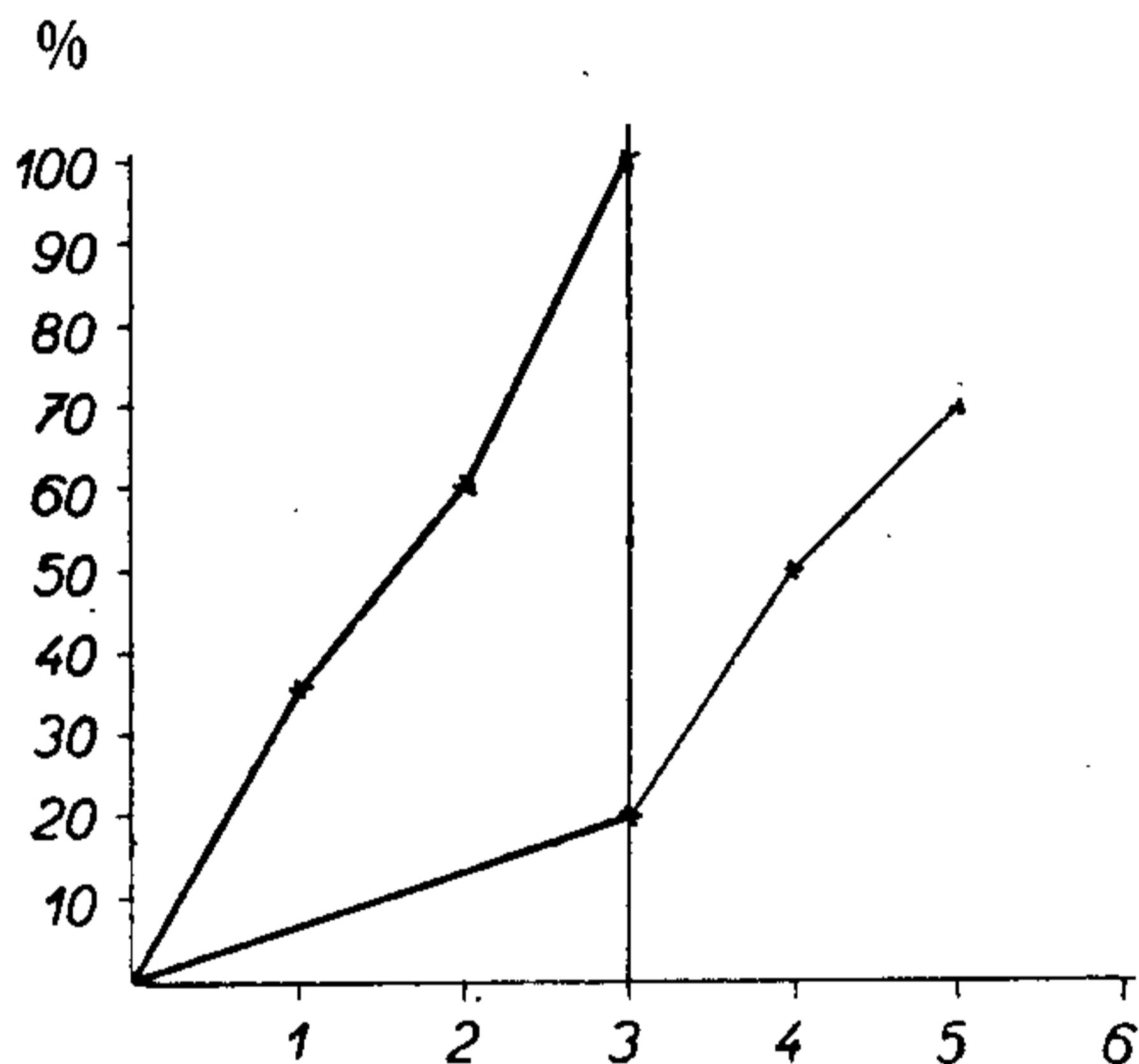


Obr. 3. Smrtnost myšek při i. p. aplikaci 550 000 listerií společně s různými dávkami autolysátu v mg vlhké váhy. (Nižší křivka znázorňuje kontrolní pokus.)

Zcentrifugovaná 48hodinová kultura uložena na 6 dní do chladničky. Po této době mikroskopicky kontrolována. Mikrobní těla se již nebarví podle Grama, jsou rozrušena, mají neostré kontury. Provedena kultivační kontrola, již ověřena sterilita. Skupinám po 15 myškách vstříkovan tento autolysát společně s infikujícími dávkami listerií v různém kvantu. Přepočítáno na absolutní množství sušiny, aplikovali jsme myškám i. p. ve směsi s inokulem od 0,018 mg do 0,37 mg autolysátu

Užili jsme 2 různých dávek živých listerií, abychom se za daných podmínek pokusu (stáří, váha a kmen myšek) co nejtěsněji přiblížili mezní smrtelné dávce.

Listerie	5/25*	17/25
Listerie + extrakt	30/30*	30/30
Extrakt	0/30*	0/30



Obr. 4. Smrtnost myšek v % při i. p. infekci společně s 0,25 ml vodního extraktu listeriiových těl. Kolmicí zdůrazněna smrtnost do tří dnů. (Viz text.)

Po řadě zkušeností jsme se totiž přesvědčili, že se LD 50 u námi užívaného kmene pohybuje přibližně v mezích plus-minus 1 logaritmus. Proto také bylo zásadně v celé práci užíváno pro každý pokus kontrol zvlášť. Výsledek pokusu při infekci 55 000 a 555 000 mikrobů ukazují obr. 2. a obr. 3.

Potencující vliv látek obsažený v autolysátu závisí tedy na dávce infikujícího mikroba a na celkovém množství autolysátu. Samotný autolysát nebyl pro myšky toxický v dávkách v rozmezí od 0,037 mg do 0,7 mg, tedy ani v dávkách dvojnásobných, což ověřeno na 90 myškách ve skupinách po 15.

V další serii pokusů jsme pátrali po přítomnosti účinných látek z těl ve vodním extraktu a orientačně po jejich povaze.

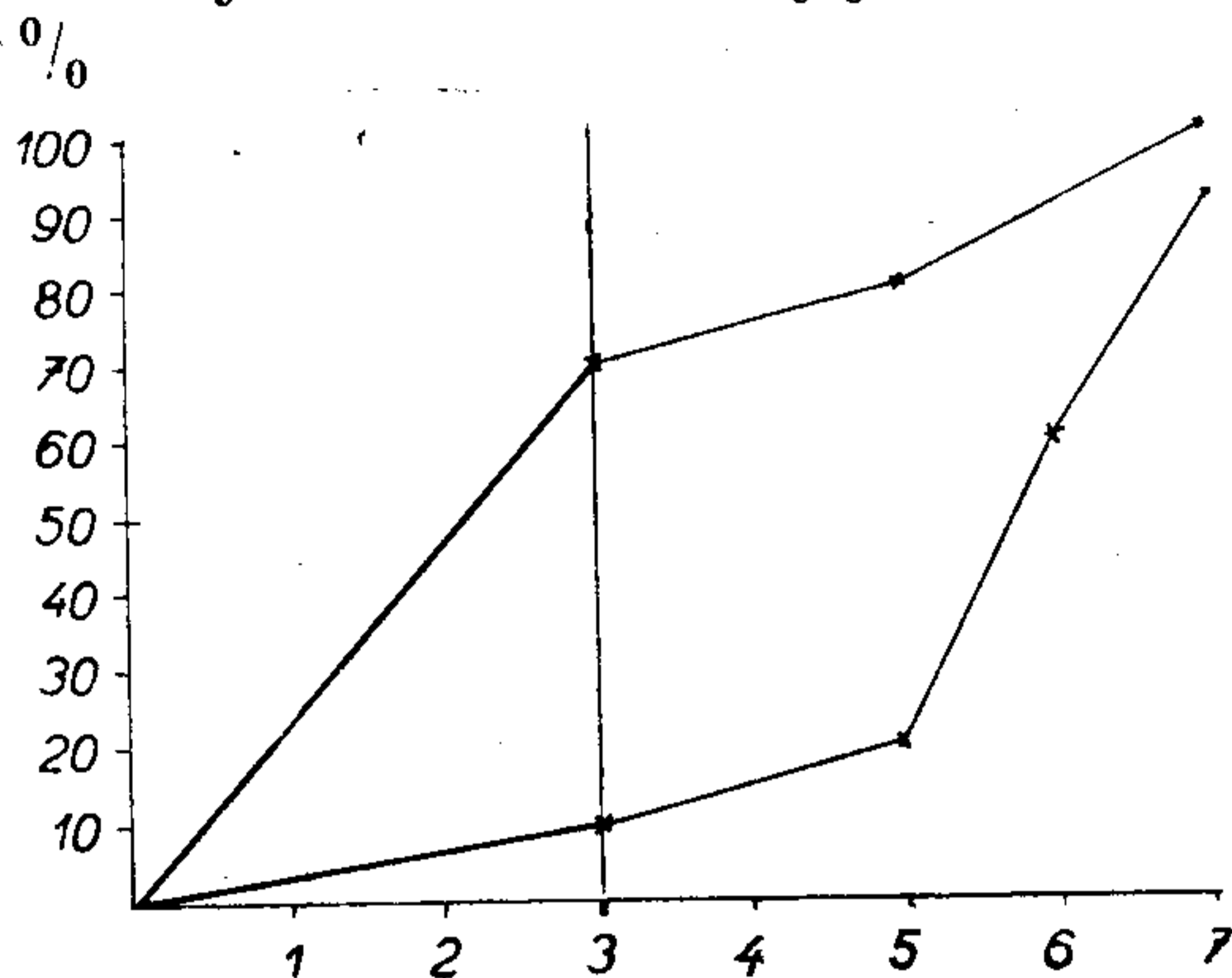
Drť alkoholéterem umrtvených a usušených těl byla extrahována destilovanou vodou po dobu 48 hodin při laboratorní teplotě v 10% suspensi. Získaná žlutohnědá kapalina dávala pozitivní reakci Molischovu a s kyselinou sulfosalicylovou, s nasyceným roztokem amonium sulfátu a s ethanolem se tvořila bílá sraženina. Po přidání krystalického amonium sulfátu do nasycení při teplotě 20° C utvořil se hustý, bílý precipitát, jenž ponechán v ledničce, sedimentoval za několik hodin. Po centrifugaci a oddělení čirého, bezbarvého supernatantu se porcelánově bílý sediment zcela lehce a ihned rozpouští v 1/10 původního objemu destilované vody, čímž nakoncentrován desetkrát. Poté roztok dialysován při 40 C po 18 hodin proti destilované vodě. Reakce na bílkoviny a Molischova stále silně pozitivní. Původní extrakt aplikován myškám v několika pokusech, jejichž výsledek znázorněn v souhrnu na obr. 4.

Nakoncentrovaný extrakt byl vstříknut myškám i. p. spolu se živými listeriem v dávce 5krát menší než původně. Výsledek znázorňuje graf na obr. 5.

* Smrtnost do 3. dne.

Orientačně zkoušen také potencující účinek polysaccharidového preparátu Stanleyova, připraveného podle jeho metodiky. 12,5 mg preparátu SII vstříkováno s 5 000 000 listerií i. v. s negativním výsledkem.

Na základě právě pověděných faktů usuzujeme, že je aktivní princip obsažen v polysaccharidověproteinovém komplexu; je málo anebo vůbec nerozpustný v alkoholéteru, neprochází dialyzační blanou a lze jej nakoncentrovat vysolením síra-



Obr. 5. Totéž jako předchozí obrázek, při aplikaci 10krát koncentrovaného extraktu. Skupiny po 10 myškách.

nem amonným. Naproti tomu není však, jak se zdá, přítomen v čisté polysaccharidové frakci mikroba s výjimkou té možnosti, že by byl rozpustný v chloroformu či na toto organické rozpustidlo citlivý.

O specificitě pozorovaného jevu jsme se přesvědčili vstříkáním živých listerií se suspensí usmrceného enterokoka v dávce 0,037 mg suché váhy, která průběh infekce u 15 myšek proti stejně početným kontrolám nijak neurychlila ani neovlivnila.

Ze všech uvedených faktů uzavíráme, že jsme v organismu *Listeria monocytogenes* prozatím nenašli žádnou látku výrazně toxického charakteru. Naproti tomu se ukazuje, že některé složky jejího těla mají při infekci u laboratorních hlodavců účinek snižující jejich resistenci tak, že, vpraveny do organismu společně s infektem, působí podle svého kvanta urychlení smrtelného průběhu. Nemůžeme zatím rozhodnout, zda tu jde spíše o účinek analogický subtoxickým dávkám Boivinova komplexu *Enterobacteriaceí* nebo povrchovému substrátu *Pasteurella pestis*, či dokonce faktor porovnatelný s M-proteinem *sterptokoků*. V každém případě bude však nutno především studovat vztah tohoto principu k leukocytům i jiným buňkám.

Účinkují tedy malá kvanta živých bakterií, potenciovaná shora uvedenými principy, v podstatě asi stejně jako velká a bezpečná smrtící dávka týchž listerií.

V předložené práci jsme se snažili diskutovaný problém pouze experimentální cestou doporučit k úvaze. Jeho propracování bude předmětem další práce.

S O U H R N

Nepodařilo se zatím prokázat žádný toxický princip z těl *Listeria monocytogenes* při reprodukci práce N. F. Stanleye ani několika postupy vlastními.

Mrtvá těla listerií působí při inokulaci se živými bakteriemi téhož druhu podpůrným způsobem na i. p. infekci bílých myšek. Týž účinek an infekci má také autolysát a vodní extrakt drcených listeriových těl. Účinný princip nalezený ve vodním extraktu lze nakoncentrovat amonium sulfátem.

Изучение факторов, оказывающих влияние на вирулентность. *Listeria monocytogenes*

В представленной первой части наших опытов мы стремились изучить возможную первичную токсичность экстрактов листерийных тел. Тестировалась также токсичность полисахаридной фракции водного экстракта по Стенли. Ни один из указанных препаратов не обнаруживал токсического действия при внутреннем, внутрибрюшном и внутримозговом введении мышам.

Имея в виду характер гистологических находок Г. Флемма в случаях ранней гибели мышей после внутрибрюшинной прививки, мы стремились в указанной серии своих опытов установить причины т. н. токсибактериального действия листерий (Флемм).

Ориентировочного были проверены патогенные свойства нашего штамма в различных способах прививки. Для штамма ŠE, поддерживаемого нашими пассажами, мыши обнаруживали наибольшую чувствительность при прививках в мозг, меньшая чувствительность отмечалась при внутрибрюшинном введении.

Принимая в расчет возможное влияние поверхностных микробных компонентов на вирулентность листерии, мы сделали попытку установить смертельную дозу внутривенным путем при использовании 48-часовой бульонной культуры по сравнению с той же культурой дважды отмытой физиологическим раствором. В нескольких случаях было установлено что LD 50 (по Риду и Мюнху) после отмывания примерно в 4 раза выше.

Добавление 2,5 мг сухого веса листерий, убитых ацетоном, отчетливо потенцирует детальное действие инфекции при использовании минимального передельного количества смертельной дозы. Автолизат центрифугированных листерий из 48-часовых культур, не содержащих живых микробов, ускоряет летальное течение настолько, что большинство мышей, привитых комбинированным способом, побивает в течение 3 дней (контроли в течение 4 дней и больше).

Подобным образом, но только более интенсивно, действует водный экстракт листерий, убитых алкогольным эфиром. Указанное действующее начало, концентрированное 10-кратным осаждением сернокислым аммонием и дающее сильно положительную реакцию Молиша, сохраняло свою потенцирующую способность еще при в 5 раз меньшей дозе.

SUMMARY

Some Factors Influencing the Virulence of *Listeria monocytogenes*

In the first part of our experiments we examined the possibility of primary toxicity of extracts from listeria cells. We also tested the toxicity of the polysaccharide fraction of the aqueous extract according to Stanley. None of these preparations evinced a toxic effect on intravenous, intraperitoneal and intracerebral application in mice.

Keeping in mind the character of H. Flamm's histologic findings in early deaths of mice on intraperitoneal inoculation, we tried to approach the causes of the so called toxic-bacterial effect of listeriae (Flamm).

We preliminarily verified the pathogenic properties of our strain, using different modes of inoculation. The mouse was found to be the most susceptible animal to strain ŠE, propagated by passages through mice, on intracerebral inoculation, less so on intraperitoneal application.

Examining the eventual influence of surface bacterial fractions upon the virulence of listeriae, we tried to establish the lethal dose by intravenous injection, using a 48 hour broth culture, and compared its effect with the same culture twice resuspended in saline solution. It has been ascertained (according to Reed & Münch) that the LD₅₀ is four times as high after resuspension in saline solution.

The addition of 2.5 mg of dried listeriae, killed with acetone, prominently enhances the lethal effect of infection with limes tod. The non-toxic autolyzate of centrifuged listeriae from 48 hour broth cultures containing no living microbes, enhances the lethal effect of infection so that most mice inoculated by the complex mode die within three days (controls die until after the fourth day).

Of similar, but more intense effect is an extract of listeriae killed with alcohol-ether. This active substance, concentrated ten-fold by ammonium sulphate precipitation, and

giving an intense positive Molisch reaction, retained its potentiating capacity, even though the applied dose was five times smaller.

Summarizing, the authors infer that so far (in accordance with the literature) they were not successful in demonstrating a primarily toxic principle. They judge, however, that listeriae possess an active complex which supports virulence.

L I T E R A T U R A

1. Stanley, N. F.: Austr. J. Exp. Biol. Med. 27, 123, 1949. — 2. Flamm, H.: Schweiz. Z. Path. Bakt. 18, 270, 1955. — 3. Bonet-Maury & spol.: Rev. Immun. 18, 21, 1954. — 4. Boivin, A. et Delaunay, A.: C. R. Soc. Biol. 92, 704, 1942. — 5. Boivin, A. et Delaunay, A.: Rev. Immun. 7, 193, 1942.