

Ústav pro lékařskou mikrobiologii a imunologii KU v Praze, přednosta prof. Dr F. Patočka

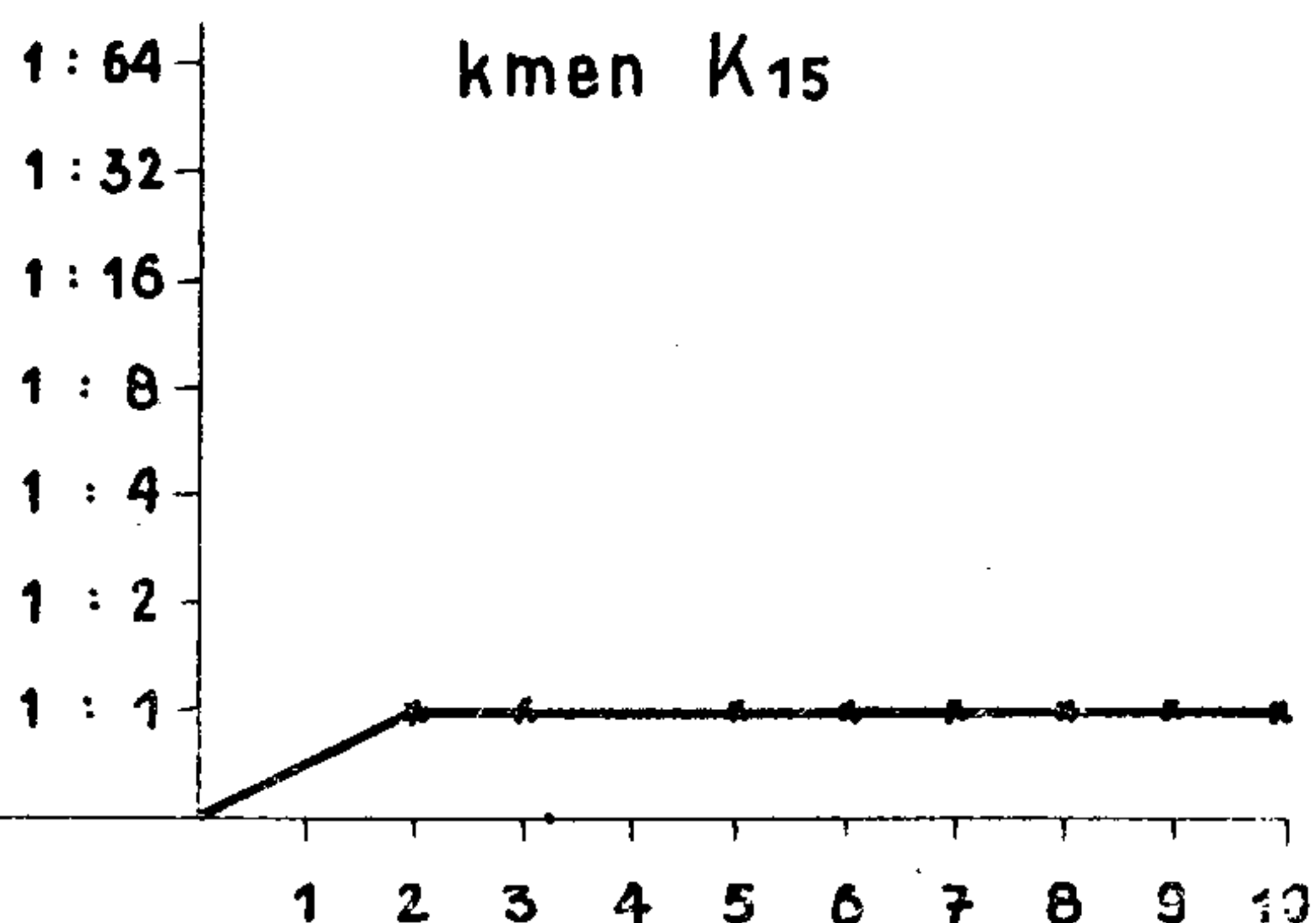
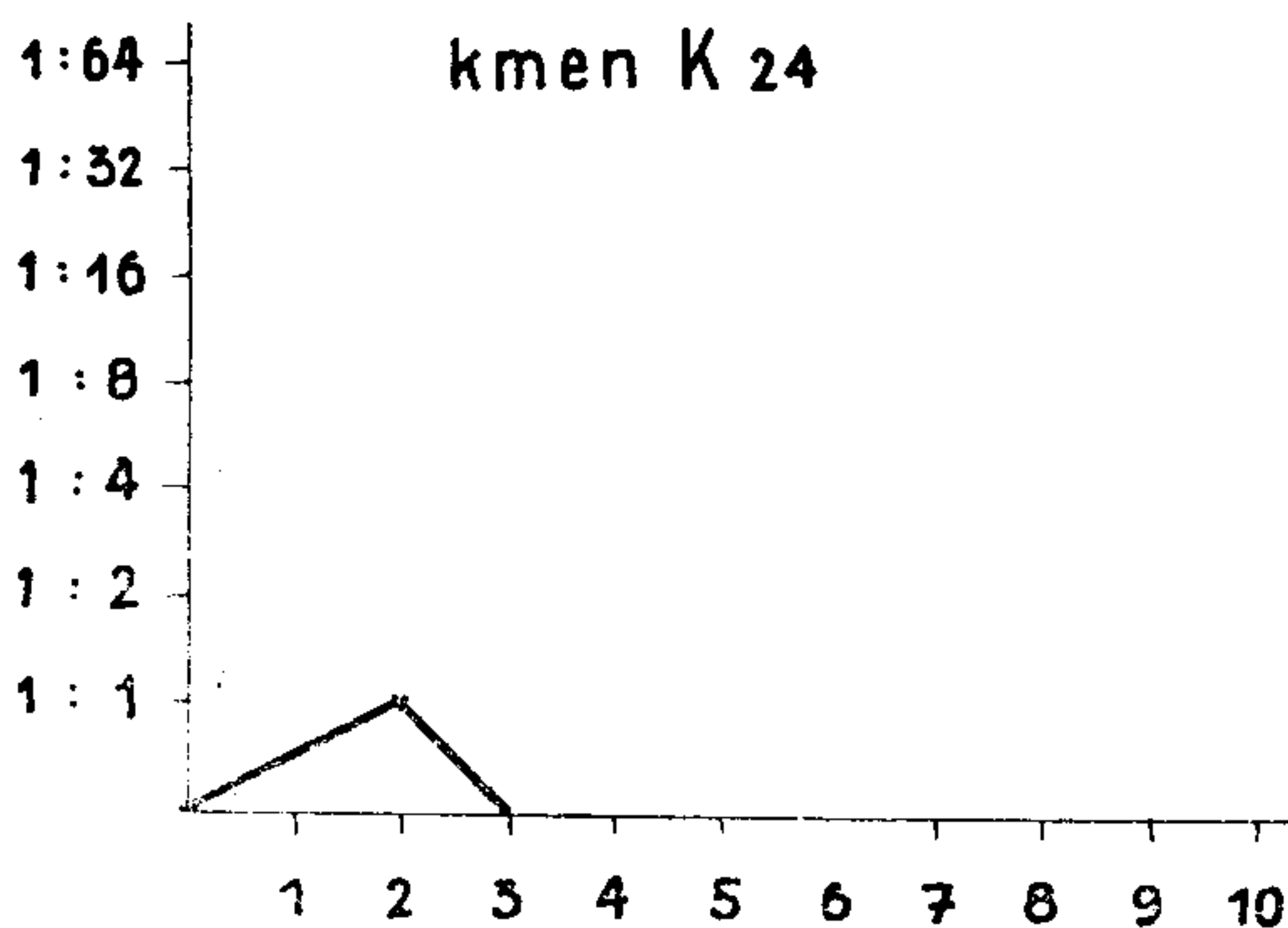
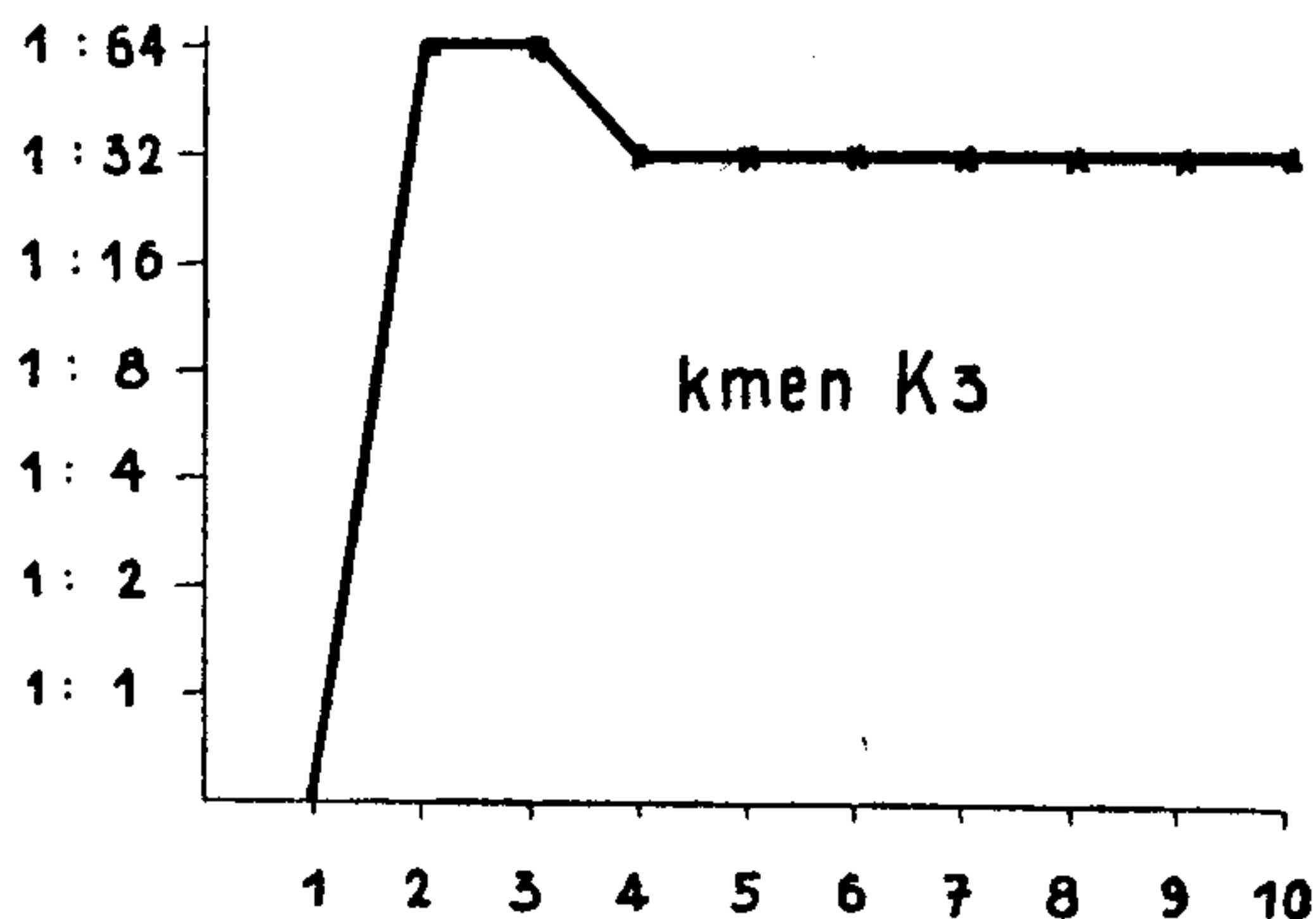
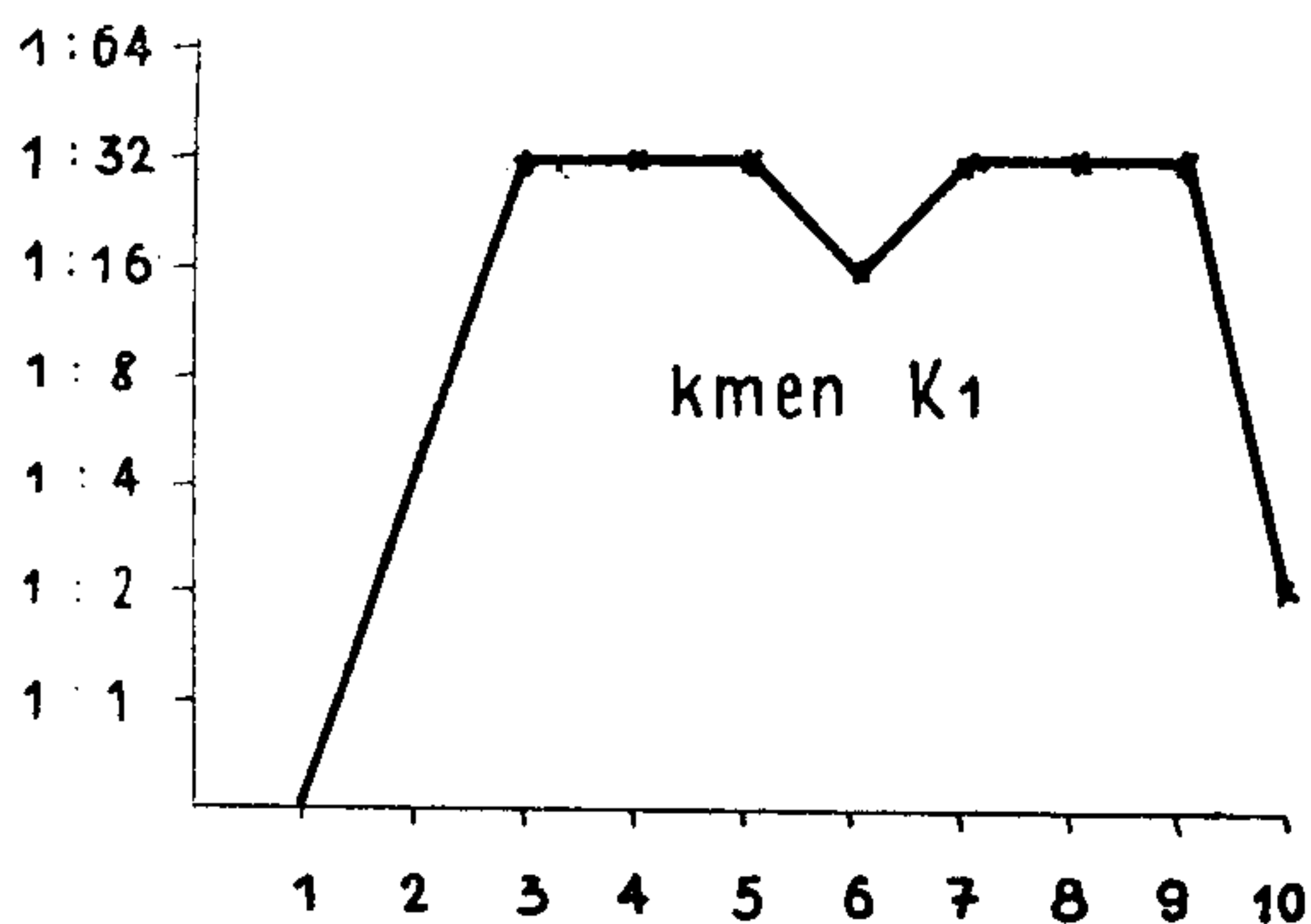
## NOVÉ ISOLACE ATYPICKÝCH KORYNEBAKTERIÍ U ČLOVĚKA VE SROVNÁNÍ S NĚKTERÝMI ZVÍŘECÍMI KMENY\*)

F. PATOČKA, J. SCHINDLER

V práci jednoho z nás o lidských variantách pyogenního korynebakteria, přednesené v podstatných rysech na sjezdu čs. mikrobiologů 1949 a publikované in extenso v ČLČ 1955, bylo popsáno celkem 12 kmenů, které označeny jako pravděpodobné lidské varianty silně hemolysujícího *Corynebacterium pyogenes*. Isolovány většinou jako druhotná infekce s patogenicky celkem bezvýznamnou sdruženou florou, vzácněji v čisté kultuře, z toho jednou, t. j. u případu těžké juvenilní osteomyelitidy, jako nesporné agens, patogenní pro člověka.

Kromě produkce rozpustného hemolysinu měly všechny tyto bakterie řadu společných znaků, t. j. byly slabě želatinolytické, čerstvě izolovány koagulovaly po delší době buď úplně, nebo alespoň náznakem mléko, pokud zkoušeno, ferment-

Titrace produkce hemolysinu v tekuté půdě.

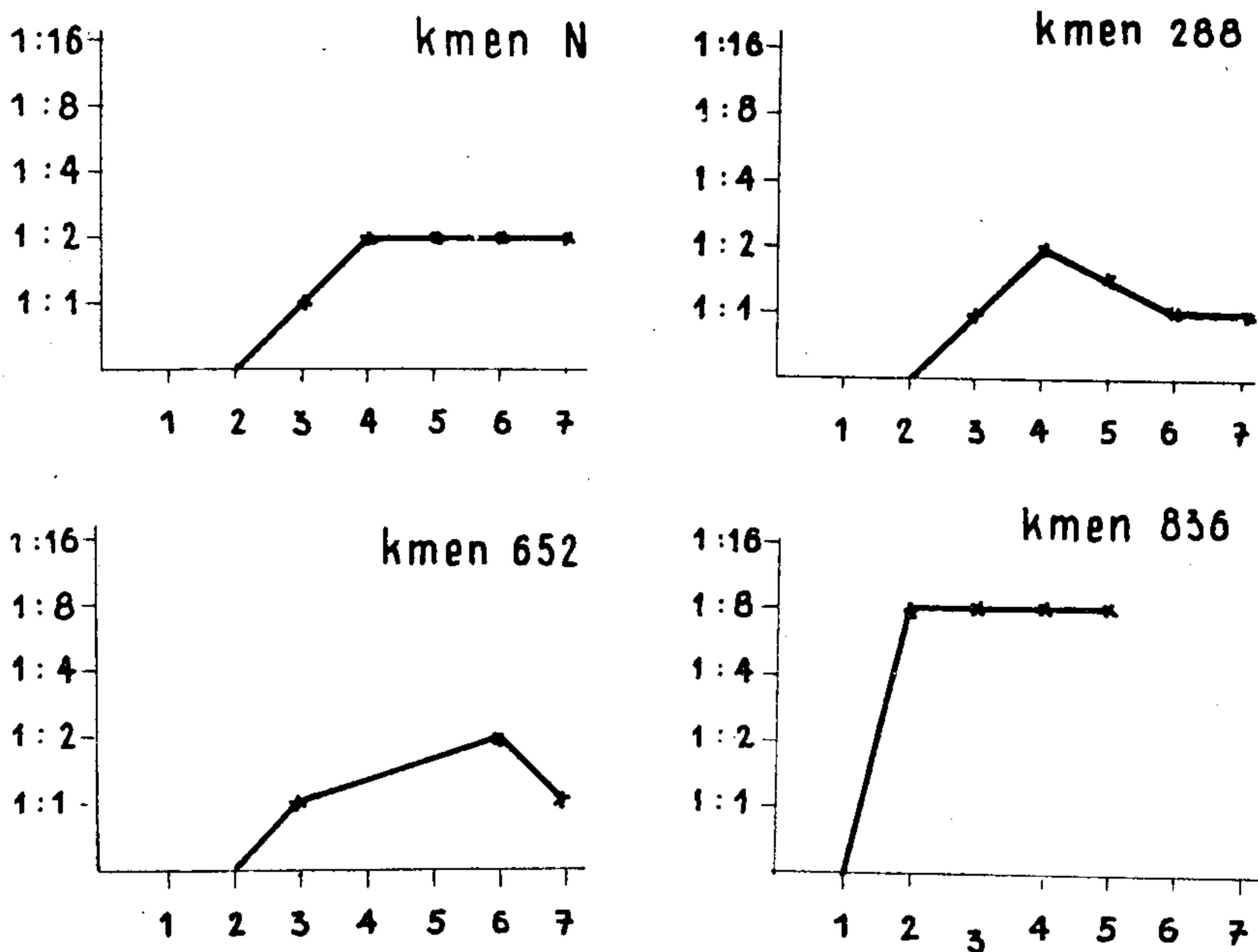


Tab. 1. Titrace produkce hemolysinu v tekuté půdě. Kmeny izolované ze zvířat.

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

tovaly škrob a neredukovaly nitráty a byly mikroaerofilní, zejména v prvních generacích. Typickým znakem byl jejich nápadně pomalý a slabý, po případě žádný růst na telluritových půdách. Osm z dvanácti bylo zřetelně pathogenních pro morče a králíka.

Až do doby publikace uvedené práce neměli autoři možnost porovnat lidské



Tab. 2. Titrace produkce hemolysinu v tekuté půdě. Kmeny izolované z člověka.

kmeny se zvířecím *Corynebacterium pyogenes*. Podle popisů běžně uváděných v odborné literatuře lišily se však v některých podrobnostech od typických zvířecích kmenů, nikoli však do té míry, aby odchylky nalezené u lidských korynebakterií přesahovaly naprosto jasně rámec druhové variability. Autoři již tehdy usoudili, že nálezy hemolysujících korynebakterií příbuzných *Corynebacterium pyogenes* u člověka jsou asi zjevem pravidelnějším, nežli se má běžně zato, a vyzvali mikrobiologickou veřejnost, aby bylo po jejich výskytu u člověka systematicky pátráno již pro průkaz persistence této zajímavé anthroozoonosy.

Od zveřejnění shora citované práce byly v laboratořích mikrobiologického ústavu izolovány, resp. prostudovány 4 další kmeny výše uvedených korynebakterií a dodatečně porovnány s 5 kmeny zvířecími, izolovanými ve Stát. výzkumném veterinárním ústavu v Praze, jež byly laskavostí Dr Koláře zapůjčeny autorům k prostudování.

Lidský kmen 652 izolován v laboratoři mikrobiologického ústavu Dr Leksou z hnisu při subakutní otitis media u dítěte spolu s netoxickým mikrokokem.

Kmen 863 zachycen v téže laboratoři z hnisu peritonsilárního abscesu spolu s pneumokokem a neiserií.

Kmen 288 izolován Dr Rakušanovou z OHES-Kolín z případu arteriosklerotické gangrény nohy a předán autorům se žádostí o identifikaci. Z téhož pacienta po několikaměsíčním trvání choroby bylo vypěstováno hemolysující korynebakterium opětovaně a označeno jako kmen 288N.

Zvířecí kmeny, pokud je nám známo, pocházely z orgánových granulomů zmetaných hovězíh fetů.

Všechny 4 lidské kmeny měly zhruba stejné biologické vlastnosti, jaké popsány pro 12 dříve izolovaných bakterií v citované práci prvního z autorů. Zejména se projevovaly jako mikroaerofilní a zřetelně serofilní v prvních pasážích po izolaci. Produkce hemolysinu

byla nejlépe patrna na půdách s králičí krví, zvláště široké halo  $\beta$ -hemolysy se vytvořilo za anaerobních podmínek.

Rozpustný hemolysin titrován záměrně v *centrifugátu* bujónových kultur, a to s konečným ředěním králičíchrvinek do 0,25% suspence. Odčítáno po hodině pobytu ve vodní lázni při 37° C a po hodinovém odstavení při laboratorní teplotě. Jako pozitivní hodnocena poslední zkumavka s kompletní hemolysou. Nepoužito aktivujícího redukčního účinku thio-

Tab. Srovnání kvasných vlastností zvířecích a lidských kmenů.

	Mannosa	Laktosa	Glukosa	Sacharosa	Arabinosa	Maltosa	Mannit	Trehalosa	Škrob	Gelatina	Mléko
K1	-	+	+	-	±	+	-	+	+	+ 48 hod.	+ 24 hod.
K3	-	+	+	-	±	+	-	-	+	+ 48 hod.	+ 24 hod.
24	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+ 48 hod.	+ 24 hod.
15	-	+	+	-	±	+	-	-	+	+ 48 hod.	+ 24 hod.
7444	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+ 48 hod.	+ 24 hod.
836	±	+	+	+	+	+	-	-	++	∓	+ 4 dny
652	±	+	+	+	+	+	-	-	+	∓	+ 3 dny
288	±	+	+	+	+	+	-	-	+	∓	+ 3 dny
N	+	+	+	+	+	+	-	-	+	∓	+ 4 dny

sloučenin. Vzestup kvanta hemolysinu, který u lidských kmenů dosahoval vesměs nízkých hodnot, znázorněn na tab. 2, z níž vyplývá, že pouze jediný z našich kmenů produkoval hemolysin v kvantu souměřitelném s produkcí u kmenů zvířecích, u ostatních tří byl hemolysin prokazatelný buď pouze v dekantátu koncentrovaném nebo ve zředění 1:2.

Naproti tomu stejným způsobem stanovené titry hemolysinu u zvířecích kmenů kolísaly ve velmi širokých rozmezích, jak patrně z tab. 1, a to od hodnot nulových u kmene 7444 až k maximálnímu dosaženému titru 1:64 u kmene 5984/7. Na grafech je nutno si všimnout také dlouhodobé persistence hemolysinu v bujónové kultuře. Vzhledem k tomu, že ani tento maximálně hemolytický kmen nejevil letální pathogenní účinek pro morče, považujeme za velmi problematické hodnocení toxigenní schopnosti pyogenních korynebakterií a jim blízkých mikrobů podle jejich hemolytické aktivity, jak to dříve navrhl Lovell, nověji Albertsen (viz průkaz letálně působícího toxinu v naší shora uvedené práci).

K fermentačním zkouškám použito 10% roztoků testovaných sacharidů s přidáním 20% hovězího sera bez prvotního přidání indikátoru. Po 24hod. intervalech přidávána kapka bromthymolové modři a odčítáno. Souběžně zkoušena fermentace bez přídavku hovězího sera. Ke koagulaci mléka, resp. želatinolyse, užito na základě dřívějších zkušeností odstředěného mléka či želatiny s kouskem sterilisovaných morčecích jater.

Fermentace uhlohydrátů, želatinolyse a koagulace mléka je patrná z tabulky 3, která shrnuje i analogické vlastnosti námi studovaných kmenů zvířecích. Na první pohled je z ní

patrně několik konstantních biologických rozdílů mezi kmeny lidskými a zvířecími. Tyto difference spočívají hlavně v tom, že lidské kmeny zkvašují sacharosu, slabě, ale přece jen zřetelně mannosu.

Škrob byl fermentován všemi lidskými kmeny, kdežto u zvířecích pouze po přidání hovězího sera. Koagulace mléka u lidských kmenů byla relativně pomalá, nastávala od 3. až 4. dne.

Tab. 4. Srovnání vlastností kmenů pyogenních korynebakterií při s. c. inokulaci morčeti.

Kmen	Smrt	Edém	Hemoragie	Nekrosa	Absces
7444	—	—	—	+	+ 1×1
24	—	—	—	+	+
15	—	—	—	—	++ 1×1
K3	—	—	+++	+++	+
K1	—	—	—	—	+ 2,5×1
Cor. equi	—	—	—	—	—
863 hum.	+ 2. den	+++	+		
652 hum.	+	+++	+++	+++ 3×3	
288 hum.	+ 2. den	+	+	++ 2×3	
N hum.	+ 2. den	+++	++	+ 1×1	

Želatinolysa u čerstvě izolovaných kmenů byla sotva naznačená, ve starých kulturách se tato schopnost zcela ztratila. Zvířecí kmeny koagulovaly mléko úplně do 24 hodin, želatina promptně zkapalňována do 48 hod.

Redukce nitrátů v našich pokusech vesměs negativní.

Jak z toho, co jsme uvedli, je patrné, až dosud největší rozdíl mezi lidskými a zvířecími kmeny jeví se v promptní koagulaci mléka, mohutné schopnosti želatinolytické a neschopnosti fermentovat sacharosu u kmenů zvířecích.

Všechny námi izolované lidské kmeny byly v prvních pasážích po izolaci zřetelně a typicky pathogenní pro morčata (viz tab. 4). Kmen 288 již v kvantu 0,5 ml, ostatní v množství 1,5 ml 3denní bujónové kultury zabíjely morče při subkutánní aplikaci do 3 dnů s tvorbou mohutného edému, na první pohled podobného edému difterického, na němž se však těsně před smrtí počala rýsovat nekrosa s hemoragickým lemem. Při pitvě obsahoval edém malé množství sulcovité hmoty a více sanguinolentní tekutiny, při čemž povrch svalu pod edémem byl pokryt fibrinosně hnisavým náletem. Nadledvinky nebyly zvětšeny, často mírně překrveny. Obecným zjevem u lidských kmenů je jejich rychlá ztráta toxicity. Již zmíněný kmen 288 ztratil náhle během 2 měsíců svou původní virulenci i při použití dávky 3krát vyšší, t. j. 1,5 ml, přesto, že během této doby prodělal 7 pasáží na morčeti. U té-

hož kmene bylo však možno z velké části i restaurovat jeho původní pathogenní schopnosti, a to 40 pasážemi přes žloutkový vak 7denního kuřecího embrya.

Naproti tomu zvířecí kmene přesto, že nám byly dodány jako čerstvě izolované, neměly letální schopnosti pro morče (viz tab. 4). U 4 se vyvinul pouze malý absces v místě vpichu (1,1—2×1,5), ve 2 případech doprovázený malou kožní nekrosou. V jednom případě (nejsilněji hemolytický kmen) došlo k rozsáhlejší nekrose kůže bez abscesu, ale s hemoragickým lemem. Srovnávací antigenní studie byly započaty, ale prozatím pro slabou antigenicitu zkoušených kmenů a některé překážky technického rázu nevedly k přesvědčivým závěrům.

Souhrnem lze uzavřít, že popsané rozdíly mezi studovanými lidskými a zvířecími kmene nejsou tak hlubokého a zásadního rázu, aby z nich bylo lze potvrdit existenci dvou zcela rozličných bakteriálních druhů. Jeví se naprosto nutno sledovat dále výskyt lidských kmenů korynebakterií výše popsaných vlastností, prohloubit průzkum jejich hemolytického komplexu, letálního toxinu i všech ostatních biologických a antigenních vlastností. Stejně tak dodnes chybí konkrétní epidemiologický důkaz o jejich zoonotické provenienci. Autoři sami jsou nakloněni považovat nalezený rozdíl mezi lidskými a zvířecími kmene za pravděpodobné potvrzení existence poměrně fixních lidských variant *Corynebacterium pyogenes*.

### Z Á V Ě R

Jsou srovnány vlastnosti kmenů pyogenních korynebakterií izolovaných ze zvířat s kmene izolovanými z člověka.

Lidské kmene při subkutánní inokulaci morčeti jeví toxické vlastnosti, ztrácející se během pasážování na umělých půdách. Kmeny zvířecí při stejné inokulaci vyvolávají jen tvorbu abscesu. Přes některé vlastnosti biochemické, jimiž se kmene nevýrazně liší, domníváme se, že pyogenní korynebakteria lidská nevybočují svou povahou z kategorie druhu *Corynebacterium pyogenes*, a považujeme je proto za lidské varianty tohoto bakterie.

### Р Е З Ю М Е

**Новые работы по выделению атипичных коринебактерий у человека и их сопоставление с некоторыми штаммами, выделенными от животных**

В течение последнего времени, т. е. примерно с 1955 года, в лабораториях Института медицинской микробиологии и иммунологии при Карловом университете в Праге были выделены, resp. идентифицированы 4 дальнейших штамма человеческих вариантов, по всей вероятности *Corynebacterium pyogenes*, неопубликованные в сводной работе одного из авторов, изданной в 1955 году.

Штамм 652 выделен д-р Лекса в лаборатории института из гноя после воспаления среднего уха у ребенка совместно с не имеющей значения вторичной инфекцией.

Штамм 863 был выявлен в диагностической лаборатории института из гноя перитонзиллярного абсцесса совместно с пневмококком и нейссерией.

Штамм 288 был выделен д-р Ракушановой из районной ГЭС — Колин из гангрены ступни при артериосклерозе и идентифицирован авторами. Тот же штамм от того же больного был выделен еще раз и обозначен 288 N. Он имелся в гангрене после примерно полугодичного интервала.

Все указанные человеческие штаммы обладали после выделения примерно одинаковыми свойствами, как это было описано одним из авторов в работе о человеческих вариантах *Corynebacterium pyogenes*. 1,5 мл 3-дневной бульонной культуры убивало в течение 3 дней морскую свинку после подкожного заражения при наличии дифтерии подобного отека и геморрагического некроза, resp. каймой на поверхности некроза. У штамма 288, 500 ед. и 1000 ед. дифтерийного антитоксина, впрыснутого морским свинкам за 24 часа до заражения, предотвратило смерть животных. Как кажется, антитоксичное действие не было специфичным; подобный эффект был достигнут при использовании противостолбнячной сыворотки. Ни один из человеческих штаммов не восстанавливал нитратов, все они по прошествии некоторого времени свертывали молоко и обнаруживали или незначительное желатинолитическое действие, или же вообще им не обладали. У всех отмечалась

ферментация сахарозы и крахмала. Надосадочная жидкость исследовалась в течение определенного времени на гемолитическую активность. Человеческие штаммы сопоставлялись с 5 подобными штаммами от животных, выделенными в Государственном ветеринарном институте в Праге и любезно нам представленные д-ром Коларжом. В ростовых качествах не было обнаружено никаких принципиальных отклонений. Однако они не убивали морских свинок, за исключением одного штамма (в течение 14 дней). В месте укола наблюдался абсцесс с кожным некрозом. В отношении остальных биологических свойств штаммы от животных отличались быстрым и мощным желатинолизисом и быстрым свертыванием молока, сахароза не сбраживалась. Выработка гемолизина у штаммов от животных была весьма неодинаковой: у 3 штаммов отчетливо меньше, а у 2 штаммов гораздо выше, чем у человеческих вариантов, так как она достигла титров от 1:32 до 1:64. Данный факт опять-таки подтверждает то, что летальный токсин указанных коринебактерий отличается от гемолизина, как уже это указывалось в упомянутой сводной работе.

Приведенные в настоящем сообщении различия между штаммами от животных и от людей не представляются, по нашему мнению, настолько принципиальными, чтобы иметь право говорить о совершенно различных бактериальных видах. Несмотря на это кажется, что указанные различия, — по крайней мере в данный момент, — настолько постоянны и выражены, что на их основе будет, вероятно, возможно подтвердить существование стойких человеческих вариантов.

## SUMMARY

### Newly Isolated Strains of Atypical Corynebacteria in Man and their Comparison with Animal Strains

Since 1955 four further strains of human variants, probably of *Corynebacterium pyogenes*, have been isolated, or identified in the laboratories of the Department of Microbiology, Charles University, Prague. These strains have not been included in the comprehensive report by one of the authors in 1955 (Patočka, »Human Variants of *Cor. pyogenes*«).

Strain 652 was isolated by Dr Leksa in the department's laboratory from pus in a case of otitis media in a child, along with insignificant secondary flora.

Strain 863 was isolated in the department's diagnostic laboratory from pus of a peritonsillar abscess along with pneumococci and neisseriae.

Strain 288 was isolated by Dr Rakušanová of the County epidemiological station in Kolín from a gangrene lesion of the foot in a case of arteriosclerosis; it was identified by the authors. The same strain was isolated from the persisting lesion once more a 1/2 year later, and designated as 288N.

All these human strains isolated had about the same properties as those described in the mentioned report. 1.5 ml of a three day broth culture killed guinea pigs on subcutaneous inoculation within three days, producing edema similar to diphtheria with haemorrhagic necrosis, or with a haemorrhagic border zone on the surface of the necrosis. When strain 288 was used, it was possible to prevent death of the animals by administering 500 and 1,000 units of diphtheria antitoxin 24 hours prior to infection. As it seems the effect was not of a specific nature; similar results were produced when tetanus antitoxin has been used. None of the strains reduced nitrates, all clotted milk very slowly, and liquefied gelatine either slightly, or not at all. All of them fermented saccharose and starch. The supernatant of broth cultures was tested for hemolyzing activity at fixed intervals. The human variants were compared with 5 similar animal strains isolated at the State Veterinary Institute in Prague, which were supplied by Dr Kolář. No substantial differences in the nature of their growth were found. However, the animal strains did not kill guinea pigs. An abscess with necrotic skin lesions was observed in the site of inoculation. Other differences in biological properties are marked by intensive liquefaction of gelatine and rapid clotting of milk; saccharose is not fermented. The animal strains produced hemolysins in varying quantities: three strains distinctly less, and two strains much more than the human variants (with titres of 1 : 32 to 1 : 64). This finding again confirms that the lethal toxin of these corynebacteria is not identical with the hemolysin, as has been demonstrated in the above mentioned report.

We are of the opinion that the reported differences in the strains are not so profound as to justify a recognition of separate bacterial species. Nevertheless, it seems that differences are sufficiently constant and well defined as to warrant the supposition of fixed human variants.

## LITERATURE

1. Patočka: ČLČ 94, 1323, 1955. — 2. Lovell: J. Path. Bact. 45, 339, 1937. — 3. Lovell: J. Path. Bact. 49, 329, 1939. — 4. Lovell: J. Path. Bact. 52, 295, 1941. — 5. Lovell: J. Path. Bact. 56, 525, 1944. — 6. Albertsen: Act. Path. Micr. Scand. 32, 4, 1953.