

Ústav pro lékařskou mikrobiologii a imunologii university Karlovy v Praze,  
přednosta prof. dr. František Patočka

## GLYCINOVÝ LYSÁT LISTERIA MONOCYTOGENES A JEHO VLIV NA EXPERIMENTÁLNÍ LISTERIOSU

František Patočka, Jiří Schindler, Milan Mára  
(laboratorní spolupráce A. Zedníková, J. Poláková)

Vlastností, která zajímá lékařského mikrobiologa na mikroorganismech nejvíce, je jejich patogenita. Rozumíme jí komplexní soubor kvalit, z nichž část závisí na infikovaném makroorganismu. Soubor těchto kvalit označujeme jako receptivitu k infekci.

Ostatní jsou dány obecně biologickými a většinou druhovými schopnostmi mikroorganismů, při čemž jsou do značné míry určovány jejich aktuálním fyziologickým stavem. Nejběžněji se nazývají mikrobiální virulence a velká část světových autorů předpokládá, že má 2 složky, t. j. toxicitu a invazivnost.

Ty jsou u téhož bakterie přítomny buď v různém poměru, nebo, což je vzácnější, každá z nich sama o sobě. Složka toxicity jest většinou jasná a je determinována průkazem produkce specificky jedovatého principu, obecně nazvaného toxinem v nejširším slova smyslu.

Faktor druhý, t. zv. invazivnost bakterií, se nedá vždy tak snadno a jednoznačně prokázat. Jejím příkladem je na př. nejedovatý polysaccharidový komplex pouzder pneumokoků, hemofilů nebo M-protein streptokoků. Tyto poslední ovšem již patří k bakteriím přechodného rázu, u nichž — podobně jako u bacila moru, Salmonell a Pasteurell — kromě antifagocytární aktivity jejich povrchových tělových frakcí i méně účinné exotoxiny nebo toxicita endoplasmatického komplexu spolutvoří celkovou virulenci.

Málo probádaným mikrobem po této stránce je genus *Listeria monocytogenes*, bakterium, které z důvodů, jež opětovaně uváděny, a to i na tomto fóru, se stalo předmětem našeho všestranného a dlouhodobého studia.

Tento mikroorganismus má výrazné patogenní schopnosti, počínaje od hlodavců až k velkým domestikovaným ssavcům a v neposlední řadě i pro člověka. Patologie zvířecí a lidské infekce i experimentálních zvířat je dobře známa. Naproti tomu o příčinách patogenních schopností listerie se neví téměř nic s výjimkou Stanleyem zjištěné toxické polysaccharidové frakce kmene LM 9/101. Existence polysaccharidu

těchto vlastností ostatně námi na našich kmenech při napodobení Stanleyovy pracovní metodiky nemohla být prokázána. Pokud lze soudit z klinického i patologického obrazu zvířecích i lidských listerios, lze stěží supponovat u listerie produkci výrazně specificky působícího toxinu. Jedovatost celého protoplasmatického substrátu *L. m.*, jak jsme se sami přesvědčili, se prakticky rovná nule.

Girard ve své doktorské thési naznačil možnost existence nekroticky a letálně působícího toxinu produkovaného na polotuhých půdách. Zdá se, že v dalším výzkumu ani jím samým, ani jinými nebyla existence této látky ověřena. Hemolysin listerie — i když je látkou podobnou *O*-streptolysinu — je příliš málo účinným faktorem k výkladu celé její patogenní aktivity. Nezbyvalo nám tedy než pátrat spíše po faktorech listeriové invasivity, i když s určitou rezervou a opatrností, ke které nás nabádá světová zkušenost s nejdéle známým patogenním bakteriem, bacilem anthraxu, který byl ještě před 15 lety považován za mikroba čistě invasního a teprve v posledním desetiletí prokázán jako mikrob toxický, produkující svůj specifický účinný jed *in vivo* i *in vitro* (Smith a spol.).

Ve starších pokusech 1956 jsme ukázali, že suchá, acetonem usmrcená těla *Listerií*, ale ještě více jejich vodní extrakt (sám o sobě netoxický), podstatně snižují dávku mikrobů, potřebnou k vyvolání smrtícího experimentálního onemocnění u myši, vstříknutou současně *i. p.* Novější, dosud nepublikovaná část experimentů prokázala, že spontánní autolysát listeriových těl a dále jeho pepticko-tryptický extrakt účinkují stejně — a jak se ukazuje — specificky.

Tabulka č. 1

	Letalita	% letality	Difer. v %	3 $\sigma$
Listerie 50 000 . . . . .	7/30	23%	0	—
Autolysát + infekce . . . . .	20/20	100%	77	22,8
Peptický extr. + infekce . . . . .	30/30	100%	77	22,8
Tryptický extr. + infekce . . . . .	24/30	80%	57	32,1

Tato předchozí část práce také ukázala nezbytnost jejího prohloubení na velkém množství co nejšetrněji rozbitých listeriových těl. Metodika sonické disrupce, která je po této stránce nejefektivnější a již bylo s úspěchem použito jedním z nás k izolaci dosud neznámého toxinu pyogenních korynebakterií, nám byla z technických důvodů nepřístupná. Užili jsme tedy v celém postupu své práce lytické schopnosti glycinu na bakterie, prokazané Macullou a Cowlesem 1948. Tato dává výsledky, jež jsou — přepočítáno na extrahované proteiny — jen přibližně o 10—20% horší (podle použitých bakteriálních druhů) nežli u sonické disrupce.

## METODIKA

Popis pracovní metodiky i hodnocení výsledků podáváme na tomto místě co nejstručněji, aby práce a její výsledky byly přehledné. Při každém dílčím pokuse jsme postupovali tak, že 24hodinová kultura *L. m.* kmene ŠE 55 izolovaného z případu ad-

nátní listeriosy vyrostlá v glukosovém bujonu byla centrifugována, bakteriální sediment resuspendován do 1 M roztoku glycinu v koncentraci 8 % vlhké váhy a uložen do termostatu při 37 °C. Rozpuštění listerií bylo kontrolováno každého dne mikroskopicky až do 5. dne, kdy byly nalezeny pouze stěží barvitelné stíny těl. Hustá kalná tekutina zcentrifugována při 12 000 obrátkách. Svrchní tekutina byla přezkoušena na sterilitu a zbavena glycinu dialysou proti tekoucí vodě.

Hlubším smyslem naší práce nebylo ovšem pouze prověřit účinek celého rozpuštěného protoplasmatu listerie jako principu přídatně zvyšujícího virulenci živé listerie, nýbrž pokusit se pokud možno o event. purifikaci a stanovení té její frakce, na niž je vázáno maximum její aktivity. Proto jsme v dalších, prozatím neuzavřených pokusech prováděli postupnou purifikaci glycinového lysátu, a to jednak polovičním nasycením ammonium-sulfátem a v jiné řadě precipitací methanolem do 50 % objemu při teplotě —5 °C až —10 °C.

Bakteriální polysaccharid byl získán zahřátím 8 % suspence listerií v 20 % roztoku NaCl po 30 minut na 80 °C a precipitací 3 objemy methanolu.

Polysaccharid nedával biuretovou reakci na bílkoviny při obsahu 140 mg % polysaccharidů.

V opěťovaných pokusech byl hned z kraje prověřen glycinový lysát sám o sobě jako neškodný pro myšku. I. v. vstříknutí glycinového lysátu 1 miliardy mikrobů v kvantu 1 ml 20 g myškám nevyvolalo žádné příznaky klinického onemocnění. Stejně tak jsme nikdy nepozorovali sebemenší změny v chování zvířat při i. p. vstříknutí samotného lysátu v téže koncentraci, jakou jsme používali v níže popsaných pokusech o potencování listeriové infekce.

Pokusy byly vesměs prováděny na bílých myškách obojího pohlaví o průměrné váze 17—20 g (časnou selekcí gravidita vyloučena).

Mnohonásobně opakovaná pokusná zkušenost nám ukázala, že je vhodné kalkulovat smrtelnost myší do 14 dnů po inokulaci.

Účinnost námi postupně izolovaných principů na virulenci listerie byla posuzována podle toho, jak jimi byla ovlivněna LD<sub>50</sub> *Listeria monocytogenes* kmene ŠE 55, kultivovaného vždy na stejných podmínkách a po stejnou dobu, t. j. 24 hodin. LD<sub>50</sub> byla stanovena podle metody Reeda a Muenche při počtu 6 zvířat na jednu dávku. Limitní hodnoty určovány dávkami 75 % a 25 % smrtelnosti, při čemž střední chyba LD<sub>50</sub> byla propočítána podle Pizziho.

Glycinový lysát i jeho frakce byly vstříkovány bílým myškám i. p. pravidelně v množství 0,25 ml + totéž kvantum infekční dávky mikroba. LD<sub>50</sub> u myší takto nakažených porovnáno s LD<sub>50</sub> prosté infekce bakteriální. Za míru účinnosti byl zvolen *index* potencování infekce značený I, který vyjadřuje poměr obou LD<sub>50</sub>.

## VÝSLEDKY

Před vlastní prací jsme si ověřili, že pohlaví myší použitých k experimentu nemá vliv na jejich citlivost pro infekci, jak je patrné z pozorování na tabulce č. 2.

V základním pokusu na ověření účinku glycinového lysátu byl tento podán společně s infekcí myškám v různých dávkách. Vliv těchto různých

Tabulka č. 2

	Samci	Samice
LD <sub>50</sub>	2,950 000	2,500 000
LD <sub>25</sub>	500 000	500 000
LD <sub>75</sub>	3,220 000	5,000 000

dávek na průběh experimentální listeriosy ukazuje tabulka 3, z níž je patrné, že potencující účinek lysátu je závislý na jeho dávce. Tabulka č. 3.

Tabulka č. 3

GLYC. LYSÁT mg	<i>index</i>	log. indexu
0,05	521	2,71
0,10	2 642	3,41
0,25	25 140	4,17

Glycinový lysát byl precipitován ammonium sulfátem, precipitát rozpuštěn v 1/10 původního objemu a po dialyze zředěn 10×. Podobně byl připraven precipitát methanolový. Obsahovaly tedy injikované přípravky vysrážením získaný substrát v koncentraci odpovídající původnímu lysátu. Účinnost těchto 2 precipitátů byla porovnána s původním glycinovým lysátem (viz tabulku č. 4).

Tabulka č. 4

	LD <sub>50</sub>	LD <sub>50</sub> kontr.	<i>Index</i>
Lysát . . . . .	203	1,580 000	7770
Amm. sulf. . . . .	18 500	7,870 000	336
Methanol. . . . .	16 100	4,660 000	258

I když nepovažujeme námi používaný *index* za absolutní míru poměrné účinnosti zkoušených preparátů, zdá se z tabulky, že pokusy o purifikaci znamenají v části svého postupu ochuzení surového glycinového lysátu o určité kvantum aktivního principu.

Zajímalo nás dále při dalších postupech purifikace, event. koncentrace

námi hledané účinné látky, která z obou použitých metod (ammonium-sulfát či methanol) je lepší a případně může vést rychleji k cíli. Proto jsme porovnali účinnost rozpuštěných precipitátů po jejich upravení na stejný obsah pevných látek (jimiž je přibližně 250 gamma pro 1 dávku) v dávce 0,25 ml. Ammonium sulfátový precipitát zkoušen u 2 sukcesivních precipitačních vzorků, methanolvý pouze v druhém precipitačním kroku. Výsledek ukazuje tabulka č. 5.

Tabulka č. 5

	LD <sub>50</sub>	LD <sub>50</sub> kontroly	Index
M2	10 500	20,400 000	1 942
A1	11 440	20,400 000	1 783
A2	792 000	20,400 000	25 757

Z ní je patrné, že precipitace ammonium sulfátem šetrněji konservuje námi hledanou látku.

Zkoušené precipitáty byly překontrolovány orientačně na obsah proteinů, nukleových kyselin a polysaccharidů. Přitom bylo zjištěno, že v průběhu precipitace ubývá polysaccharidů a nukleových kyselin. Proto bylo v purifikačních procedurách pokračováno, a to až do čtyř sukcesivních precipitací a redisolucí ammonium sulfátem a pěti methanolem. Biologicky byl vyzkoušen pátý purifikát methanolvý. Výsledky pokusu, v němž byla protitrována jeho účinnost, jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6

METH. PRECIPITÁT V. mg	index	log. indexu
0,025	5	0,70
0,125	68	1,83
0,250	525	2,72

Z této tabulky je patrné několik experimentálně i orientační biochemickou analýsou ověřených skutečností. Především zůstává účinný princip zachován i v našem doposud posledním purifikátu. Za druhé závisí intenzita jeho účinnosti na jeho kvantu. Za třetí při přepočítávání podle obsahu pevných látek (porovnáno s výchozím glycinovým lysátem) zů-

stává účinným i přesto, že v použitém purifikátu kvantum polysaccharidů bylo redukováno na méně nežli 10% a nukleových kyselin na 42%. Zdá se tedy, že látka, kterou hledáme, může být bílkovinné povahy nebo event. lipoproteinem, jelikož poměry lipoidních látek jsme prozatím nezkoušeli.

Proti této domněnce ovšem stojí analogický experiment s preparátem polysaccharidovým, jenž se ukázal být rovněž faktorem zřetelně potencujícím virulenci listeriového kmene, neboť snižoval LD<sub>50</sub> 50krát proti kontrole. Nelze tedy vyloučit, že účinných faktorů virulence obsahují těla listerií několik, a to odlišné biochemické povahy.

Faktor obsažený v glycinovém lysátu se zdá být specificky účinným, neboť v kvantitativně i kvalitativně analogickém pokuse neovlivňoval vůbec průběh brucellové infekce myšek. Jak bylo zjištěno v dřívějších pokusech, není také obsažen v tělech bakterií antigenně příbuzných, t. j. v enterokokách, což jeho specifitu rovněž potvrzuje.

#### DISKUSE A ZÁVĚR

Část našich pokusných zvířat vyšetřil doc. dr. Bednář (jemuž na tomto místě děkujeme) histologicky, a to též proto, že jsme očekávali alespoň náznakem ověření způsobu, jakým glycinový lysát při infekci spoluúčinkuje. Rádi bychom věděli, zda snad vyvolává změny spíše toxického charakteru, či je-li sám o sobě inertním faktorem virulence jako pneumokokový polysaccharid nebo streptokokový M-protein.

Orgány zvířat injikovaných pouze glycinovým inaktivovaným lysátem obsahovaly naprosto ojedinělé listeromy se vzácnými tyčinkovitými útvary podle Giemsy. Je tedy surový lysát sám o sobě schopen vyvolávat neprogresivní a kvantitativně naprosto redukované změny analogicky jako u živých listerií. V orgánech myši infikovaných přidáním glycinového lysátu je proti kontrolní skupině myši pouze infikovaných větší intracelulární množení listerií, menší celulózní reakce a podstatně větší lembuněčné nekrosy.

Lze tedy celkem uzavřít, že glycinový lysát listeriových těl obsahuje jeden nebo více účinných principů, které specificky potencují virulenci homologního druhu bakterie. Jde o látky nebo jejich komplex, jejichž účinnost dosud popsána nebyla, ale o nichž prozatím nemůžeme rozhodnout, zda jsou nejedovatými faktory invazivity nebo velmi slabě účinnými toxiny tohoto bakterie. Při jejich izolaci lze je alespoň zčásti vysolit amoniumsulfátem nebo precipitovat methanolem za studena.

Je cílem naší další práce dosáhnout pokud možno úplné purifikace

účinné látky, identifikovat ji biochemicky a prověřit ji jako toxickou nebo invasní komponentu těl genus *Listeria monocytogenes*, a tak definitivně zjistit princip, jenž je jedním z dosud úplně neznámých zdrojů její patogenní schopnosti.

#### SOUHRN

Bylo již dříve prokázáno, že injekce mrtvých těl *Listeria monocytogenes* při současné infekci zvyšuje letální efekt při experimentální listeriose bílých myšek. Totéž bylo zjištěno při podání extraktu z listeriových těl.

Jako pokračování této práce zkoumají autoři vliv hodnotného lysátu listeriových těl na listeriosu bílých myšek. Vysoký výtěžek při šetrné lyse je dosažen použitím 1 M-roztoku glycinu. Je-li tento glycinový lysát aplikován současně s infekční dávkou *Listeria monocytogenes* bílým myším, pak je LD<sub>50</sub> až 15.000krát menší než u myší kontrolních, t. j. prostě infikovaných. Číslo, značící zvýšení letálního efektu, považují autoři za index zvýšení virulence.

Glycinový lysát sám o sobě neusmrcuje myšky při i. p. ani i. v. vstříknutí, ani nevyvolává symptomy klinického onemocnění. Histologickým rozbohem zvířat zabitých po aplikaci glycinového lysátu lze v jejich orgánech zjistit zcela ojedinělé granulomy.

Účinnost glycinového lysátu je přímo úměrná jeho dávce vstříknuté současně s mikrobiální kulturou. Podle histologického rozboru se zdá, že v orgánových poškozeních myší infikovaných listeriemi s lysátem jsou patrná větší ložiska nekrosy a silnější intracellulární množení bakterií v listeriomech.

Princip, zvyšující virulenci listerií, lze ze surového lysátu vysrážet ammoniumsulfátem nebo methanolem při teplotě pod 0 °C. Ammoniumsulfátové i methanolové precipitáty si podržují zhruba účinek původního lysátu, a to i když (v případě methanolové purifikace) byl původní obsah polysaccharidů snížen pod 10 % a nukleových kyselin pod 50 %.

V paralelním pokuse byl však zjištěn stejný účinek polysaccharidové složky mikrobiálních těl.

Specificita principu, zvyšujícího virulenci listerií, byla ověřena na experimentální brucellose bílých myšek, jejíž průběh zůstává lysátem zcela neovlivněn.

Přednesená práce znovu ověřuje starší pozorování autorů o principu, obsaženém v těle *Listeria monocytogenes*, zvyšujícím její virulenci. Je současně prvním krokem k bližší identifikaci a poznání látky či komplexu

látek dosud u tohoto mikroba nepopsaných, jež mají buď charakter mírně působících toxinů nebo faktorů invasivity, podmiňujících patogenní vlastnosti genus *Listeria monocytogenes*.

## ГЛИЦИНОВЫЙ ЛИЗАТ *LISTERIA MONOCYTOGENES* И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ЛИСТЕРИОЗ ВЫЗВАННЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПУТЕМ

Ф. Паточка, Й. Шиндлер, М. Мара

### РЕЗЮМЕ

Было уже доказано, что введение мёртвых тел *Listeria monocytogenes* при одновременной инфекции повышает летальный эффект при листериозе вызванном экспериментальным путем у белых мышей. То же самое было установлено при введении экстракта тел *Listeria monocytogenes*.

Продолжая эту работу авторы изучают влияние качественного лизата из тел *Listeria monocytogenes* на листериоз белых мышей. Большой процент лизата получен при применении м-раствора глицина. Если этот лизат вводить одновременно с инфекционной дозой *Listeria monocytogenes* белым мышкам, то  $LD_{50}$  в 15.000 раз меньше чем у контрольной группы мышей. Число, выражающее повышение летального эффекта, принимают авторы за *индекс* повышения вируленции.

Глициновый лизат сам по себе не приводит к смерти мышей при внутриперитонеальном или внутривенном применении и даже не вызывает симптомы клинического заболевания. Путем гистологического анализа животных, убитых после применения глицинового лизата, в их органах можно установить совершенно исключительно гранулемы.

Действие глицинового лизата прямо пропорционально его дозе, введенной одновременно с микробической культурой. Как показывает гистологический анализ, в поврежденных органах мышей, зараженных листериями, примененными одновременно с лизатом, очевидны большие очаги некроза и усиленное внутриклеточное размножение бактерий в листериомах.

Вещество, повышающее вируленцию листерий, можно получить в виде осадка после прибавления сульфата аммиака или метилового спирта при температуре ниже 0 °C. Эти осадки сохраняют в общем действие первоначального лизата даже и в том случае, когда основное количество полисахаридов снизилось ниже 10 %, а нуклеиновых кислот ниже 50 %.

В параллельном опыте было установлено тоже действие полисахаридов микробических тел.

Специфичность вещества, повышающего вируленцию листерий



была проверена на экспериментально вызванном бруцеллезе белых мышей, течение которого совершенно не поддается влиянию лизата.

Приведенная работа еще раз подтверждает предыдущие наблюдения автора о существовании вещества, содержащегося в теле *Listeria monocytogenes*, повышающего бактериальную вируленцию. Одновременно эта работа является первым шагом к более глубокому познанию и изучению вещества или комплекса веществ, до сих пор не описанных у этого микроба, которые имеют характер умеренно действующих токсинов или факторов размножения, обуславливающих патогенетических качеств *Listeria monocytogenes*.

## GLYCINE LYZATE OF LISTERIA MONOCYTOGENES AND ITS INFLUENCE ON EXPERIMENTAL LISTERIOSIS

F. Patočka, J. Schindler, M. Mára

### SUMMARY

In earlier reports it has been demonstrated that an injection of killed *Listeria monocytogenes* applied with infective inoculum enhances the lethal effect of experimental listeriosis in white mice. The same has been demonstrated when an extract from listerial cells was applied.

In connection with earlier experiments the authors studied the influence of a high quality lyzate of listerial organisms on listeriosis in white mice. A high yield may be obtained by lysis with a molar solution of glycine. When this glycine lyzate is applied along with *Listeria monocytogenes* to white mice, the LD<sub>50</sub> is up to 15,000 times smaller as against controls, i. e., mice infected only with L. m. The number, expressing the enhancement of the lethal effect, is considered by the authors as an *index* of virulence enhancement.

The glycine lyzate alone does not kill mice either on intraperitoneal or intravenous injection, nor does it evoke any clinical symptoms of the disease. Histologic studies of animals sacrificed after application of the glycine lyzate reveal that only occasional granulomata are encountered in their organs.

The effectiveness of the glycine lyzate is directly proportionate to the amount applied along with the infective dose. Histologic findings seem to show that in the organs of mice, infected with listeria plus lyzate, necrotic foci are larger and intracellular propagation of bacteria in listeriomata is more intensive.

The factor, enhancing the virulence of listeria, may be precipitated from raw lyzate with ammonium sulphate or methanol at a temperature below 0 °C. The effect of ammonium sulphate or methanol precipitates is about the same as that of the original lyzate, although (after methanol purification) the content of polysaccharides is under 10 %, and of nucleic acids under 50 % of the original.

In a parallel experiment, however, it has been found that the polysaccharide component of bacterial cells had the same effect.

The specificity of the factor, enhancing virulence of listeria, was verified on experimental brucellosis of white mice, the course of which was not influenced by the lyzate.

This report confirms the authors' earlier observations on a factor contained in the bacterial body of *L. m.* which enhances its virulence. It is at the same time the first step toward identification and definition of a substance, or a complex of substances which have not been hitherto described in this microbe, and whose nature is either that of a mild toxin, or an invasive factor conditioning the pathogenic properties of the genus *Listeria monocytogenes*.

#### LITERATURA

1. Patočka, Fr.: Čas. Lék. čes. 94, 1323, 1955. — 2. Patočka, Fr. a Schindler J.: Čs. EM 5, 229, 1956. — 3. Uher, V. a Uher J.: Scripta Medica 28, 73, 1955. — 4. Gordon, J., Hall, R. A., Stickland, L. H.: J. Hyg. 49, 109, 1954. — 5. Maculla, E. S., Cowles, P. B.: Science 107, 376, 1948.