

CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE

Corynebacterium diphtheriae patří do čeledi *Corynebacteriaceae*, t. j. v přírodě velmi rozšířené kategorie grampositivních, až gramlabilních tyčinek s nehomogenně se barvícím protoplasmatem a s ojedinělými výjimkami nepohybli-vých tyčinek. Jejich základním morfologickým znakem je více méně vyznačený kyjovitý, až člunkovitý tvar, vzájemné uspořádání bakterií a druhově hojně rozšířená přítomnost zvláště intensivně barvitelných, ostře ohrazených partikulí protoplasmatu, nazvaných metachromatická tělíska. Většina dosud známých korynebakterií jsou mikroorganismy aerobní, vyskytuje se však i druhy mikroaerofilní (alespoň v primokultuře). V poslední době se věnuje pozornost až dosud málo studovaným druhům striktně anaerobním.

Aerobní druhy převážně dávají pozitivní katalasovou reakci, fermentují nejrůznější karbohydráty (pravidelně bez tvorby plynu), aniž většinou produkují tak vysoký stupeň acidity, jaký je charakteristický pro laktobacily, jimž pravděpodobně stojí vývojově nejblíže. Málo druhů je proteolytických.

V přírodě přicházejí jako pathogenní parazité, po příp. epifytě člověka i zvířete. Je popsána řada druhů pathogenních pro rostliny, vyskytuje se v okolí člověka i zvířat, na jejich kožním povrchu, v zažívacím traktu, nejrůznějších sliznicích, na rostlinách, ve vodě a v povrchních vrstvách půdy.

U některých korynebakteriaceí byl popsán i náznak ramifikace, takže bývají počítány mezi t. zv. vyšší bakterie, tvořící přechod k řádu *Actinomycetales*.

Úkolem mikrobiologie je vypěstovat a odlišit především druhy obligatorně nebo příležitostně pathogenní pro člověka od druhů zcela nepathogenních, jim podobných svou morfologií i některými znaky kultivačními, zejména pokud se tyto poslední nalézají též na kůži, sliznicích, po příp. i v některých pathologických produktech člověka.

Obligatorně pathogenní lidský druh je znám pouze jeden, a to *Corynebacterium diphtheriae*, které přichází ve třech (podle některých dokonce čtyřech) typech podle růstu a v řadě typů podle antigenních vlastností protoplasmatu. Je známým vyvolavatelem lidské difterie a mohutným producentem toxického bakteriálního proteinu (dříve exotoxinu) globulinové povahy, který je u všech růstových i antigenních typů — jak se zdá — prakticky jednotným antigenem.

Ostatní korynebakterie, příležitostně pathogenní pro člověka, shrnujeme většinou pod ne zcela přesně vymezenou kategorii t. zv. „atypických korynebakterií“, mezi nimiž prokázány zárodky toxické i virulentní pro některá laboratorní zvířata a vyvolávající nesporně i onemocnění lidská. Některá z atypických korynebakterií se ukázala být ve světle prohloubené diagnostice buď identická nebo alespoň blízce příbuzná s druhy de norma vyvolávajícími cho-

roby u domestikovaných zvířat, a patří tedy mezi vyvolavatele t. zv. anthropozoonos.

Rozpoznání saprofytických korynebakterií (či t. zv. bakterií pseudodifterických), přítomných na tělesném povrchu nebo sliznicích lidských, má pouze smysl diferenciálně diagnostický, zejména proti málo toxickým či netoxic kým variantám *C. diphtheriae*.

Odběr materiálu

Toxicke a virulentní kmeny *C. diphtheriae* jsou známými vyvolavateli příslušné lidské choroby, jež postihuje zejména dětský věk. Symptomatologie a klinika se samozřejmě vymyká z rámce této statis, kvůli odběru materiálu však nutno upozornit na možné nejčastější lokalizace. Je to především klasická lokalizace tonsilární, dále u kojenců poměrně častá lokalizace na sliznici nosní a dříve hrozivá, dnes řídká lokalizace na sliznici trachey. Podstatně vzácnější jsou formy lokalizace na konjunktivě, ve zvukovodu, forma kožní (difterie ranná), difterické onemocnění ženského genitálu (zejména v puerperiu), a pak absolutně výjimečné lokalizace vzniklé metastaticky nebo per continuitatem, jako zachvácení meningů, po příp. i endokardu.

Základem úspěšné diagnostiky je odběr materiálu z místa pathologicky změněné sliznice či kůže, kde se nalézá maximum korynebakterií.

Toto nahromadění je vždy pod charakteristickými difterickými pseudomembránami na povrchu exulcerované sliznice nebo kožní plochy v místech, kde se proces šíří do okolí.

Odběr sám se provádí na sterilním vatovém tamponku, který má být navinut na dřevěné špejli, nikoli na drátě. Při floridním onemocnění je vždy nutno odebrat nejméně dva tampony, a to tak, aby jednoho mohlo být použito pro mikroskopický preparát a jednoho pro kulturový záchyt. U nemocných kojenců se nesmí zapomenout nikdy na výtěr z nosu, zejména při příznacích podezřelé rhinitidy. Při pátrání po nosičích difterie nedává zpravidla mikroskopické vyšetření tamponu hodnotitelných výsledků.

Někteří doporučují k urychlění diagnostiky použití t. zv. Folger-Soleho tamponů. Tyto se zhotovují tak, že se tampon namočí do sterilního koňského sera (bez přísady antiseptik). Pak se přebytek sera odstraní vymáčknutím o stěnu zkumavky. Tampon se pak protáhne plamenem jenom potud, aby vrchní vrstva sera na něm koagulovala. Těmito tampony se odebere materiál. Po odběru se tampony inkubují předběžně 2–6 hodin při 37 °C. Po této době se zpracují dále tak, že se válivým pohybem naočkují na telluritovou půdu a na krevní agar, a konečně se z nich stejným způsobem zhotoví mikroskopické preparáty. Předběžná kultivace na samotném tamponu vede zpravidla k takovému pomnožení *C. diphtheriae*, že toto nejen vyrůstá na dalších půdách rychle a v čisté kultuře, nýbrž se projeví i typickou morfologií v mikroskopickém preparátě.

Diagnostika

Morfologie difterické korynebakterie je typická: Kyjovité tyčinky, poměrně krátké u typu gravis, s malým počtem metachromatických zrneček, dlouhé a s velkým počtem granulí u typu mitis, nápadně mohutné kyjovité formy s tělisky a velikou nehomogenitou protoplasmatu u typu intermedius. Kromě charakteristické nehomogenity protoplasmatu, kterou nelze nikdy diagnostikovat přesvědčivě v preparátech podle Grama, ale snadno a zřetelně zředěným fuchsinem a methylenovou modří, všimáme si diagnosticky důležitého vzájemného uspořádání tyčinek, a to buď do útvaru palisád nebo písmena V. Při přesném barvení podle Grama se nám část nebo většina tyčinek toxicé difterie projeví jako gramplabilní na rozdíl od saprofytických pseudodifterií, jež zůstávají vždy přesvědčivě grampositivní.

Barvíme tedy každý preparát na difterii buď z pathologického produktu nebo z vypěstované kultury:

a) podle Grama (viz str. 15, metoda č. 9),

b) methylenovou modří nebo zřed. fuchsinem (viz str. 15, metoda č. 7),

c) na metachromatická zrnečka podle Neissera nebo podle Alberta (viz str. 16, metoda č. 13 a 14).

Podle našich osobních zkušeností nemusí barvení sub b) dát přesvědčivé výsledky u preparátů z pathologických produktů, je však pro zkušeného základně důležitým pracovním postupem při mikroskopické diagnostice z vypěstovaných kolonií. Důležité je vědět, že metachromatická zrnečka nelze sice prokázat nikdy u Hoffmannovy pseudodifterie, je však možno je nalézt (i když v menším počtu) u primokultury pseudodifterie druhu *Corynebacterium cutis*, a co je ještě závažnější, u některých pro zvíře pathogenních atypických korynebakterií.

Morfologická diagnostika difterické korynebakterie je tedy pouze pomocnou methodou, jde-li o pathologický produkt, ale důležitou diagnostickou pomůckou, jde-li o ověření vypěstovaných zárodků.

Základní a nejdůležitější diagnostickou methodou *C. diphtheriae* je jeho vypěstování z pathologického produktu spolu s určením typové příslušnosti a stanovením virulence, resp. toxicity vypěstovaného kmene.

Růstová náročnost *C. diphtheriae* není zvláště veliká, ve všech případech podstatně menší než u laktobacilů. Základními vzniku růstu faktory pro všechny studované kmeny se ukázala být nikotinová a pantothenová kyselina, přičemž poslední substrát u některých kmenů může být nahrazen beta-alaninem. Pouze určité kmeny vyžadují biotin a jiné pimelovou kyselinu.

Klasickou půdou pro záchyt *C. diphtheriae* kteréhokoli typu zůstává Löfflerovo serum (viz str. 59, půda č. 54). Očkuje se na něj většinou přímo tamponem, jímž byl odebrán suspektní materiál. Není půdou diagnostickou, ale do značné míry elektivní, na které *C. diphtheriae* vyrůstá rychleji než většina ostatních zárodků zachytitelných ku př. v nosohltanu. Vzhledem k tomu, že kolonie difterického bacila na této průhledné půdě nejsou na prvý pohled

typické, je nutno vždy z nich připravit preparát a po případě přeočkovávat na krevní agary, resp. telluritové půdy. Pokud zde *C. diphtheriae* vyrůstá isolovaně, vytváří okrouhlé kalné kolonie perleťovitého povrchu, spíše drobivé než mazlavé, z počátku s pravidelnými okraji, později nepravidelně konturované, se zdviženým centrem, obvykle se slabě nažloutlou barvou.

Selektivita Löfflerova sera, záležející v jeho relativní chudosti, se nejlépe projevuje v raných růstových fázích, takže preparáty zhotovujeme již po 12, nejpozději po 18 hodinách. Při růstu podezřelých tyčinek obvykle přeočkováváme na krevní agar či telluritové půdy po dosažení typických povrchových kolonií tak čistých, že lze z nich založit zkoušky na fermentaci cukrů. *Jde-li o rychlou diagnosu*, stačí ověření mikroskopické a zbytek kultury na Löffleru se použije přímo ke zkoušce virulence, resp. toxicity na morčeti.

Podle našeho soudu je v poslední době Löfflerova půda neprávem opomíjena, zůstává methodou volby v improvizovaných poměrech, které nedovolují přípravu složitějších půd nebo kde jde o rychlou orientační diagnosu. V každém případě je ovšem mnohem vhodnější pro isolaci bacila z floridního onemocnění než pro záchyt z nosičství.

Velikým pokrokem v diagnostice difterického korynebakteria bylo zavedení telluritových půd (viz str. 60 a 61). Ukázalo se totiž, že Kalium tellurosum je selektivně bakteriostatickým principem, který v koncentracích, jež inhibuje růst většiny gramnegativních mikroorganismů a podstatně zpomaluje množení grampositivních bakterií, nemá podstatný vliv na kmeny *Corynebacterium diphtheriae*. Kromě toho *C. diphtheriae* redukuje kalium-tellurit na kovový tellur, jenž dodává tmavošedým, až černým zbarvením i kovovým leskem zvláštní výraznosti jeho koloniím. Jsou tedy telluritové půdy elektivně diagnostické a jak dodatečně rozpoznáno, lze na nich (s dodatečným použitím ještě jiných biologických znaků, jako je mikroskopická skladba, hemolysa a fermentace škrobu) rozlišit převážnou většinu difterických korynebakterií na tři typy podle McLeoda: *gravis*, *mitis*, *intermedius*. Jen kvůli úplnosti uvádíme, že Parsons a Frobisher dodatečně k těmto třem připojili typ čtvrtý, zvaný *typus minimus*, vyznačující se zvláště pomalým růstem a tvorbou nepatrných kolonií a hlavně tím, že v primokulturách buď vůbec nefermentuje, nebo jen velmi pomalu glukosu. Pojmenování tří klasických typů neodpovídá zcela tíži klinického průběhu lidské difterie, tolik se však zdá být jisté, že *gravis* a *intermedius* přicházejí nejčastěji u výrazných forem nemoci, *mitis* u choroby lehké a u nosičů. Vzhledem k tomu, že každý z klasických typů je dost vyhraněným biotypem růstovým nejen na telluritových, nýbrž i na krevních půdách a v bujonu, popisujeme níže všechny tyto vlastnosti (včetně fermentací — viz str. 61, půda č. 58) u každého typu souborně.

Kolonie typu *gravis* dorůstají největších rozměrů (v průměru několika mm), jsou ploché, se zřetelnou vnitřní strukturou (upomínající vzdáleně na květ chudobky), barvy temně šedé, až načernalé a matného kovového lesku od redukovaného telluru. Při doteku kličkou je kultura spíše drobivého charakteru. Na krevní plotně mají kolonie *gravis* podobný ráz, ale vnitřní struktura bývá

méně patrná. Typický je na krvi matný povrch s lesklým perleťovým nádechem. Necelých 50 % vypěstovaných kmenů typu gravis bývá obklopeno úzkou zonou nepříliš zřetelné beta-hemolysy, zejména na králičí krvi. V bujonu se vytváří lehký zákal, měnící se v granulární sediment, při povrchu se rýsuje řídká pelikula. Z cukrů je fermentována (jako u všech ostatních typů s výjimkou označenou shora) *glukosa*, maltosa a fruktosa, pro typ gravis je ještě navíc charakteristická fermentace škrobu, glykogenu a dextrinu.

Typus mitis vytváří kolonie konvexní, přesně okrouhlých okrajů, černé kovově lesklé. Na krevním agaru růst analogický, kolonie jsou vždy obklopeny úzkou zonou beta-hemolysy. Růst v bujonu ve formě difusního zákalu, tendence k tvorbě pelikuly vzácná. Škrob a glykogen nejsou fermentovány, dextrin střídavě.

Typus intermedius tvoří kolonie malých rozměrů, pomalu dorůstajících (v průměru nejvýše asi do 2 mm), ploché, šedivé, někdy s tmavším centrem, mírně kovově lesklé, obyčejně trochu nepravidelné periferie. Na krevním agaru jsou kolonie rovněž nejmenších rozměrů, lomivé a nikdy nehemolysují. V bujonu vzniká tvorba vloček, které se usazují v granulární sediment. Bujon se vyčeří, nikdy není povrchová blanka. pH v tekutých půdách neklesá tak rychle jako u předchozích typů. Škrob a glykogen nikdy nefermentuje, dextrin celkem vzácně.

Z ostatních biologických vlastností *C. diphtheriae* je nutno vynaknout jejich celkem špatný a necharakteristický růst v želatinovém vpichu, žádný vznik růstu na bramboru. Mikrob nemění laktosové mléko, neprodukuje indol a nereduší nitráty v nitrity.

Různě se v literatuře interpretuje fermentace saccharosy. Většinou (na rozdíl od pseudodifterie druhu *Corynebacterium cutis*) se uvádí zkvašování tohoto cukru jako zcela negativní. Toto tvrzení je exaktní potud, že absolutní většina typických a toxigenních kmenů *C. diphtheriae* kteréhokoli typu saccharosu skutečně nechává nedotčenu. Naše vlastní zkušenosti potvrzují však vzácné nálezy zejména francouzských autorů, podle nichž lze zcela výjimečně u málo toxických kmenů nalézt velmi pomalou (až po řadě dní) fermentaci saccharosy do nevysokého stupně acidity (takový kmen byl námi isolován z případu kožní difterie).

Hemolysin *C. diphtheriae* je nerozpustná látka, vázaná na živou a metabolizující buňku bakterie, od níž ji nelze oddělit.

Telluritové půdy jsou na rozdíl od Löfflerova sera velmi úspěšným prostředkem k záchytu i k diferenciální diagnostice kolonií *C. diphtheriae*, stejně vhodným pro materiál z nemocného jako pro zjištění nosičství. Jejich velikou výhodou proti Löfflerovu seru je možnost vyslovit podezření na difterii již ze vzhledu kolonií. Diagnosa musí ovšem být potvrzena mikroskopicky a fermentačními zkouškami, které se snadno provádějí proto, že na této půdě dosahujeme většinou prakticky čisté kultury. Výraznost telluritových půd lze zvýšit tím, že k nim přidáváme glukosu se systémem indikátorů. Fermentace glukosy se změnou indikátorů pomůže méně zkušenému bakteriologovi snáze prima vista odlišit hlavně pseudodifterii druhu *C. Hoffmanni*, která tento cukr nikdy nekvásí. Podle našeho soudu se však zkušenější diagnostik obejde bez barevných indikátorů, a proto doporučujeme především telluritovou půdu bez téhoto přídatných látek. U nás se zhusta používá velmi dobrá telluritová půda s indikátory podle Škovránka.

Paralelně s telluritovou půdou vždy očekujeme materiál na krevní plotnu. Zkušený diagnostik dovede i na této půdě rozpoznat *C. diphtheriae*, všimne si jeho event. hemolytických schopností a zachytí na něm i některé důležité druhotně infikující zárodky.

K diferenciaci typů z tvaru kolonií se nám nejlépe osvědčila půda McLeodova (viz str. 61, půda č. 57). K hemolyse používáme obyčejného krevního agaru, k studiu fermentačních vlastností, t. zv. Hissovo serum s různými shora uvedenými uhlohydráty. Charakter růstu v dobrém bujoru a mikroskopický obraz podle shora uvedených principů nám doplní charakteristika vypěstované korynebakterie k takové úplnosti, že jej lze nejenom zachytit a druhově odlišit, nýbrž se souborem ostatních symptomů provést i jeho typisaci.

Claubergova půda se odečítá po 24 a 48 hod. Kolonie *C. diphtheriae* jsou černomodré s okrajovým barvením. Kolonie *C. Hoffmanni* a *C. xerosis* jsou žluté a černají. Pro zkušenější diagnostiku doporučujeme tutéž půdu, ale bez barevných indikátorů, jež popsány sub. 4. (Viz str. 60, půda č. 55.)

Na Škovránkově půdě roste *C. diphtheriae* v akutních případech vždy po 24 hod., u rekonvalescentů a nosičů i později, vždy však do 48 hod. Proto odečítáme půdy dvakrát: za 24 hod. a 48 hod. Typické znaky *C. diphtheriae* jsou: lesk kolonií kovově-modravě-černý, plochost kolonií a intensivní modré zbarvení půdy v okolí kolonií.

Růst tyčinek nedifterických:

1. *C. Hoffmanni* — černé kolonie na nezměněné nebo zažloutlé půdě.

2. *C. cutis*

a) při isolovaném růstu nápadně velké, černé lesklé kolonie s intensivně modrým zbarvením půdy,

b) při mohutném růstu — nápadně mastný, lesklý černý povlak na půdě intensivně modře zbarvené. Půda vypadá jako potřená kolomazí.

V novější době se čím dále tím více vžívá používání selektivních pomnožovacích půd tekutého charakteru i pro *C. diphtheriae*. Hlavním inhibičním principem, brzdícím rozvoj druhotné flory, je i zde kaliumtellurit. Výtěr z pathologických produktů se přímo z tamponů naočkuje do tekuté půdy, kde se množí poměrně krátkou dobu (u námi uváděné půdy pouze 6 hod.), a poté vyočkovává na krevní plotnu a půdu McLeodovu. Zpravidla se dosáhne již v tomto prvém vyočkování čistá kultura difterického korynebakteria, použitelná pro fermentační zkoušky i zkoušky toxicity.

Z několika používaných receptů jsme vybrali tekutou půdu (viz str. 61, půda č. 59), s jejímž použitím máme dobré, byť ne příliš rozsáhlé zkušenosti.

Na rozdíl od shora uvedeného faktu, že toxicický protein *C. diphtheriae* je u všech dosud studovaných kmenů prakticky jednotným antigenem, mají bakteriální těla jednotlivých kmenů všech tří typů nejrůznější antigenní skladby. Antigenicita endoplasmatu *C. diphtheriae* je určována pravidelně aglutinační reakcí s hyperimmunními sery. Zkouškami na několika steh kmenů bylo zhruba zjištěno, že všechny kmeny gravis lze rozdělit nejméně do 13 serotypů, mezi nimiž prý prevládá typ I a II. Nejheterolognější je typus mitis,

u něhož některými autory nalezeno kolem čtyřiceti serotypů, nejhomolognějším se zdá *intermedius*, kde s jistotou určeny čtyři typy. Antigenní příbuznost kmenů *C. diphtheriae* přesahuje někde rámec růstových typů, takže na př. bylo zjištěno, že typ II typu *mitis* je antigenně identický se serotypem II typu *gravis*. Kapitola serové typisace somatických antigenů *C. diphtheriae* zdaleka není ukončena a zůstává prozatím ve sféře vědeckého zkoumání. Pokud víme, dosud pro diagnostickou praxi využita nebyla a bylo by ji také těžko zhodnotit pro její velikou heterogenitu. Je pochopitelné, že by mohla mít ovšem v praxi velký význam při epidemiologickém pátrání.

Vypěstovaný čistý kmen difterické korynebakterie byl — jak z uvedeného patrno — prověřen mikroskopicky, identifikován podle růstových vlastností všemi shora uvedenými prostředky, zjištěny jeho schopnosti fermentační a po případě určena jeho typová příslušnost. Zbývá jej prověřit na jeden z jeho nejdůležitějších biologických faktorů, t. j. toxicitu, resp. virulenci. Tyto zkoušky se provádějí pravidelně, ač vcelku možno říci, že jsou snad o něco méně důležité při klinicky jasném případu difterického onemocnění než při záchytu *C. diphtheriae* v případě nosičství, kde právě podle toxicity, resp. virulence, se usměrňuje epidemiologický zákrok. Je důležité vědět, že byly opětované, a to zejména z nosičů, vypěstovány kmeny korynebakterií, odpovídající všemi biologickými vlastnostmi *C. diphtheriae*, ale při běžně používaných zkouškách zcela netoxické. O dalším významu těchto netoxických *C. diphtheriae* pro lidského nosiče, po příp. jeho okolí, lze se prozatím těžko vyslovit s definitivní platností, tím spíše, že se údajně podařilo vrátit některým z těchto kmenů schopnost toxinogenese použitím specifického bakteriofága.

V diagnostické praxi se zkoušky zaměřené pouze na toxinogenesi téměř neprovádějí, neboť by trvaly neúnosně dlouhou dobu (znamenalo by to kultivovat řadu dní vypěstovaný kmen ve vhodném bujonu a k pokusu na citlivém zvířeti použít buď filtrátu nebo supernatantu centrifugované kultury). Všechny prakticky zaměřené reakce tohoto druhu jsou zároveň zkouškami na toxinogenesi *in vivo* spolu s oceněním faktoru invasity (průnik mikroba do živé tkáně, jeho množení v ní) neboli ohodnocením jeho virulence. Nejběžněji používané zvíře je morče, méně často (hlavně pro intradermální testy) králík.

a) Nejexaktnější, ale velmi nákladný test je s. c. inokulace čisté kultury morčeti. Používá se k ní zvířat 200—250 g těžkých, vstřikuje se podkožně pod oholenou kůži břicha přibližně 1—1,5 ml 48 hod. staré kultury difterického bacila, vyrostlé v serovém bujonu. Bylo-li použito ke kultivaci Löfflerova sera, lze vstříknout podkožně suspensi získanou spláchnutím 24hodinové kultury, vyrostlé na této půdě. *Lege artis* mají být jedním z obou způsobů infikována dvě morčata, při čemž jedno bylo 24 hod. před infekcí připraveno i. p. vstříknutím antitoxického sera v množství nejméně 600, nejlépe 1000 antitoxických jednotek. Jde-li o toxický kmen *C. diphtheriae*, zůstává antitoxinem chráněné zvíře na živu a prakticky beze změn. Pokusné zvíře zachází (podle virulence, resp. toxicity kmene) pravidelně od 48 hod. do několika dnů. Jeho sekční nález je zcela typický. V podkožním vazivu rosolovitý, někdy mírně hemoragický

edém, zvětšené lymfatické uzliny, břišní útroby překrvány, v pleurálních dutinách jantarově žlutý čirý exsudát. Nejcharakterističtější změny jsou na nadledvinkách, které jsou vždy nápadně zvětšené a překrvané, až cyanotické. *C. diphtheriae* se vypěstuje pravidelně jen z místa podkožní inokulace. U málo toxicických kmenů, kdy dojde k úmrtí až po řadě dní, rýsuje se na kůži v místech edému počínající nekrosa. Velmi málo toxicické kmeny *C. diphtheriae* (ku př. z případu ranných difterií sem patří někdy i ony, jež velmi pomalu fermentují saccharosu), nezabíjejí zvíře vůbec, ale v rozsahu edému se demarkuje mohutná nekrosa kůže.

b) Rutinní methodikou, kterou lze prověřit virulenci několika kmenů (5 maxim. i 10) na 1 zvířeti současně, je intrakutánní test. Používá se k němu větších morčat, vážících kolem 400 g, po případě králíků. Kultury z Löfflerova sera se spláchnou v bujonu tak, aby chom dostali suspensi obsahující zhruba 500 milionů v 1 ml. Suspense jednotlivých kmenů *C. diphtheriae* se vstřikují do kůže v kvantu 0,1 – 0,2 ml v řadě za sebou do oholené kůže morčecího břicha nebo králičích boků. Čtyři hodiny po infekci dostane zvíře i. p. 50 – 100 antitoxicích jednotek, aby se předešlo předčasné smrti takto mnohotně infikovaného zvířete. Má-li být i tento pokus naprosto exaktní a specifický pro *C. diphtheriae*, je nutno stejným způsobem infikovat kontrolní zvíře, které jako sub a) dostalo 24 hod. před infekcí i. p. 1000 U. A. antitoxickeho sera. U kontrolního zvířete chráněného antitoxinem není reakce žádná. Místa vpichů toxicických kmenů zduřejí a zrudnou do 24 hodin, během dalších dnů se v nich vytvoří ložiska zřetelných nekros.

V novější době je tendence nahradit celkem nákladné a definitivní diagnostiku prodlužující testy *in vivo* průkazem toxinogenicity vypěstovaného kmene reakcí *in vitro*. Prvé úspěšné zkoušky toho druhu, již do té míry propracované, že mohly být přezkoušeny v praxi, provedli nezávisle na sobě současně *Ouchterlony a Elek*. Podrobnosti viz str. 108.

Diferenciální diagnostika

Možnost diagnostických záměn *C. diphtheriae* s nepathogenními korynebakteriemi jiných druhů byla poměrně veliká v dobách, kdy pro záchyt používaná pouze Löfflerova půda, resp. krevní plotna, ale podstatně se zmenšila zavedením telluritových půd. Celkem je možno říci, že dnes pouze tři druhy, žijící epifyticky na lidských sliznicích, po příp. na normální kůži (event. i kožních i slizničních ulceracích), přicházejí v úvahu k diferenciální diagnostice:

1. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum (Hoffmanni)* liší se již mikroskopicky krátkým a spíše člunkovitým než kyjovitým tvarem, vždy silně vyjádřenou grampositivitou a nedostatkem metachromatických granulí. Na krevním agaru roste v koloniích nejspíše upomínajících na typ mitis, ale mazlavějších, lehce krémově zbarvených, bez hemolysy. Bujon je lehce zkalen se zřetelným sedimentem. Na telluritových půdách dochází jen k částečné redukci telluru, takže kolonie zůstávají buď úplně světlé, nebo alespoň mají světlý okraj a tmavě

šedé centrum. Nefermentují žádný z běžných cukrů, zejména nikdy glukosu. Zkouška na toxicitu, resp. virulenci podle shora popsaných metod vždy zcela negativní. *Fraser* ovšem upozornil, že některé kmeny tohoto mikroba jsou přece jen za zvláštního experimentálního uspořádání schopny vyvolávat u králíka destrukci rohovky. Bakterie je zhusta nalézany epifyt sliznice lidského nosohltanu, po případě i nosu.

2. *Corynebacterium xerose* upomíná morfologicky již více na difterického bacila a barví se podobně jako on nehomogenně, dokonce s přítomností polárních granulek. Na krvi jsou kolonie adherující, šedavé, značně průsvitné, perletového lesku, jen o málo větší než typus intermedius. Bujon čirý s granulárním sedimentem, na telluritových půdách růst velmi pomalý, dochází k redukci Kalium tellurosum. Tvoří zřetelná kvanta kyselin z glukosy, ale i saccharosy, dále z levulosy, maltosy, ale nikoli ze škrobu. Pro pokusná zvířata je naprosto nepathogenní. Původně byl isolován z konjunktivy, opětovaně zjištěn na sliznici nosohltanu, ale vždy mnohem méně často než předcházející bakterium.

3. *Corynebacterium cutis (hyperacidum)*. Toto diferenciálně diagnosticky velmi důležité *Corynebacterium* bylo známo již dříve francouzským bakteriologům jako *C. cutis*. Později bylo zapomenuto do té míry, že se ani v Bergeyově soupisu neuvádí jako samostatný druh. Zároveň s používáním telluritových půd se stalo jeho zachycení na nich tak časté a tak upomínající na růst difterického korynebakteria, že se počalo znova prohloubeně studovat. Němečtí autoři je nazývali v této etapě *Corynebacterium hyperacidum*. Nevylučujeme, že jde o blízce příbuzný druh nebo snad i zvláště abundantně růstoucí variantu *C. xerose*. Na rozdíl od *C. Hoffmanni*, které se vyskytuje zejména na normální sliznici lidského nosohltanu, pěstuje se *C. cutis* pravidelně z nekrotických afekcí slizničních nebo kožních, primárně vyvolaných jiným činitelem. Tato okolnost pochopitelně svádí tím více k jeho záměně s *C. diphtheriae*.

Morfologie *C. cutis* na telluritových půdách nebo na krvi v primokultuře je velmi podobná po každé stránce *C. diphtheriae*, včetně pravidelné přítomnosti metachromatických zrneček. V subkulturních se tento rys již zastírá a *C. cutis* se projevuje jako mohutné a silné pseudodifterické *Corynebacterium*. Vzhled kolonií na krvi i na telluru v primokultuře rovněž upomíná na *C. diphtheriae*, dalším růstem a přeočkováním se opět tato podobnost stírá. Kolonie jsou však vždycky mazlavější, mohutnější, zpravidla rostou rychleji. Rozdíl na Škovránkově půdě je uveden při této půdě. V bujonu difusní zákal, mohutný sediment a zřetelná pelikula. Jako *C. diphtheriae* vytváří kyselinu z glukosy, ale na rozdíl od původce difterie vždycky též veliká kvanta kyseliny ze saccharosy, a to tak rychle, že se nápadné snížení pH dá prokázat již po několika hodinách růstu. Tato vlastnost kromě neschopnosti tvořit specifický toxin je hlavním diferenciálně diagnostickým znakem této pseudodifterie.

Pro morče je většina kmenů prakticky nevirulentních. Nalezli jsme však i takové kmeny, které po s. c. injekci velikých dávek bujonové kultury vyvolaly zřetelný zánětlivý edém, který rychle mizí a končí zatvrđlinou.

Z normálních tkání je snad jeho nejčastějším sídlištěm kůže zevního zvuku vodu.

4. Při suspektní difterické infekci ženského genitálu by mohly přijít v úvahu v diferenciální diagnostice též různé typy nebo druhy *vaginálních pseudodifterii*, jejichž růstové vlastnosti jsou však tak odlišné od *C. diphtheriae*, že je lze prima vista podle tvaru kolonií snadno odlišit.

Z chorob, které bývá nutno bakteriologickým vyšetřením odlišit od lehké nebo těžší formy tonsilární difterie, je nutno pamatovat na:

1. Těžší anginy streptokokové, vzácněji i pneumokokové, někdy s náznakem pseudomembrány. Rozpoznání snadné záchytem pyogenních streptokoků, resp. pneumokoků na krevní plotně.

2. T. zv. Plaut-Vincentova angina. Rozpozná se snadno průkazem hojných spirochet a fusobakterií v mikroskopickém preparátu, barveném fuchsinem nebo podle Grama.

3. Nekrotická angina při inf. mononukleose. Přes zřetelné nekrosy na tonsilách bakteriologický nález mikroskopický i kultivační je zcela necharakteristický. Přesné odlišení podle krevního obrazu, po příp. Paul-Bunnelovy reakce.

4. Angina při listerioze (viz str. 294). Telluritové půdy vždy negativní.

5. Tonsilitidy, vyvolané atypickými korynebakteriemi (viz str. 298). Telluritové půdy buď rovněž negativní nebo zcela nepatrny růst po 5—6 dnech kultivace, tedy v době, která je pro diagnostiku difterie naprosto neobvyklá.

6. Některé formy t. zv. leptotrichálních angin. Povláčky spíše retrotonsilární v ostrůvcích, které nelze kličkou seškrábnout. Odlišení snadné mikroskopicky podle nálezů hojných, dlouhých vláken leptotrichálních, většinou v konvolutech. Kultivace možná pouze anaerobně.

7. Angina soorová. Povlaky odlišné, zpravidla nejsou těžké celkové příznaky. Mikroskopicky typický nález vláken a blastospor oidia. Kultivační záchyt nejlépe možný na Sabouraudově půdě.

Rekapitulace návrhů na postup vyšetření

Zásadně se odeberou dva i více tamponů z pathologického produktu (jak uvedeno, nejlépe z okrajových míst slizničních či kožní ulcerace, pokud možno po odstranění pseudomembrán).

Uvádíme čtyři způsoby vyšetřovacích postupů:

1. Jeden tampon se zpracuje na mikroskopický preparát, druhý se nakultivuje na Löfflerovu (viz str. 59, půda č. 54) a Claubergovu půdu (viz str. 60, půda č. 55) a na krevní plotnu. Kultura z Löfflerovy půdy slouží k předběžné orientační diagnostice, a je-li dostatečně čistá, k urychlenému testu virulence a toxicity. Isolované kolonie na Claubergově půdě a v krvi se ohodnotí mikroskopicky zředěným fuchsinem a podle Alberta nebo Neissera (viz str. 16, metoda č. 13 a 14), přeočkovávají se dále do Hissova sera k určení fermentace cukrů a na McLeodovu půdu (viz str. 61, půdy č. 58 a 57), jež uzavře stanovení typové příslušnosti. Nejsou-li kolonie dostatečně čisté ani na telluritových půdách, je možno fermentační zkoušky provádět až z další subkultury na telluritových půdách nebo ještě lépe na krvi.

2. Jeden tampon se vyšetří mikroskopicky, druhý se nakultivuje na krevní plotnu a do tekuté půdy (viz str. 61, půda č. 59). Z tekuté půdy se po 6 hodinách kultivace očkuje

krevní plotna, Claubergova půda (po př. i McLeodova) a Löfflerovo serum. Čisté kolonie z krve se zkouší na fermentaci, z Löfflerovy půdy se dělá zkouška toxicity. Všechny kultury na pevných půdách se samozřejmě ověří mikroskopicky jako sub 1.

3. Odběr na Folger-Soleho tampony a obyčejný tampon, z něhož se ihned zhotoví preparát. Folger-Soleho tampony se inkubují předběžně 2–6 hod. při 37 °C nebo delší dobu při teplotách nižších. Pak se jich použije a) k zhotovení preparátu, b) k založení kultury na krvi a na telluritových půdách. Čisté kultury se identifikují fermentací a přeočkovávají na Löfflerově půdě k určení toxicity.

4. Tento způsob je vlastně nouzový, je-li nutno pracovat v poměrech, kde nelze okamžitě zhotovit telluritové půdy. Odběr na dva tampony, z nichž jednoho se použije k mikroskopickému vyšetření a jeden se očkuje na krev a Löfflerovo serum. Kultury se identifikují mikroskopicky, charakterem růstu na krvi, zkouškami fermentačními a pokusem na toxicitu, resp. virulenci.

Při vyšetření na nosičství je postup v podstatě stejný, až ná to, že od přímého vyšetření tamponu mikroskopicky nelze očekávat hodnotitelné výsledky a že kultury, zejména na telluritových půdách, rostou zpravidla pomalu.

Důležité je, aby vyšetřující mikrobiolog uvědomil ošetřujícího lékaře, že písemná bakteriologická diagnosa difterie je vlastně retrospektivní, takže tento nesmí váhat při vážném klinickém podezření s injekcí sera před ukončením bakteriologického rozboru.

Literatura

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Baltimore, 1949

Dubos R. J.: Bacterial and Mycotic Infections of Man, Philadelphia, 1952.

Elliott S. D.: Brit. Med. J. 1, 493, 1948

Froder: Brit. J. Pharmacol., 1, 241, 1946

Frobisher: Amer. J. Hyg. 52, 239, 1950.

Frobisher, King, Parsons: Amer. J. Clin. Path. 21, 282, 1951

Gradwohl: Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, London 1948

Hewitt: Brit. J. Exp. Path., 28, 338, 1946

Ouchterlony O.: Acta Path. microbiol. Scand., 26, 515, 1949

Parsons, Frobisher: Science, 113, 317, 1951

Patočka F., Šebek: Ranná a puerperální difterie, Čas. lék. čes. 1944.