

Československá
epidemiologie, mikrobiologie,
imunologie

ČASOPIS

SPOLEČNOSTI ČS. MIKROBIOLOGŮ, EPIDEMIOLOGŮ
SEKCE ČS. LÉKAŘSKÉ SPOLEČNOSTI J. E. PURKYNĚ

VEDOUCÍ REDAKCE: PROF. DR. K. RAŠKA
REDAKČNÍ RADA: MUDR. V. BÁRDOŠ, MUDR. V. BURIAN, MUDR. J. ČERVENKA,
MUDR. J. JOHANOVSKÝ, PROF. DR. F. PATOČKA, DOC. DR. V. ŠKOVŘÁNEK
TAJEMNÍK REDAKCE: MUDR. L. SYRŮČEK

VI - 3

KVĚTEN 1957

STÁTNÍ ZDRAVOTNICKÉ NAKLADATELSTVÍ - PRAHA

ČS. EPIDEMIOLOGIE, MIKROBIOLOGIE, IMUNOLOGIE - 3 (VI.-1957)

O B S A H

Suchanová M., Patočka F.: Pokus o dosažení L forem <i>Listeria monocytogenes</i>	133
Seeman J.: Nálezy <i>Listeria monocytogenes</i> u hlodavců	140
Soběslavský O.: Experimentální infekce kura domácího (<i>Gallus gallus domesticus</i>) R. burneti	146
Šerý V., Strauss J.: Výskyt ornithosy a salmonellosy u racka chechtavého (<i>Larus ridibundus</i>	
L.) — I. epidemiologická vyšetřování	152
Mornsteinová D, Albrecht P.: Experimentální infekce myšky <i>Micromys minutus</i> virusem čs.	
klíšťové encefalitidy	157
Patočka F., Kubelka V., Korych B.: Kultivace virusu encephalomyelitis enzootica suum v ho-	
mologní tkáni I.	162
Korych B., Patočka F., Kubelka V.: Kultivace virusu encephalomyelitis enzootica suum v tká-	
ňových kulturách homologní tkáně II.	166
Duběn J., Neubauer M., Duběn Z.: <i>Corynebacterium pyogenes bovis</i> — srovnání kmenů zví-	
řecího původu s lidskými variantami	169
Mottl J.: Mikrotechnika pro rychlé zjišťování redukce nitrátů	179

Z p r a x e

Neubauer M., Duběn J., Duběn Z.: Pasteurelová angína	183
Brázdová K., Aldová-Klečková E.: Zkušenosti s parazitologickým vyšetřováním obyvatelstva	
provincie Sev. Hamgen v Koreji	186
Polák H., Němec J., Neuwirth J., Blažková P., Zita Z.: Vliv gamaglobulinu na motilitu lid-	
ských leukocytů	188
Absolonová O., Frágnér P., Patera V.: Mykologické nálezy ve sputu při plicní tuberkulóze	192
Vošta J.: Ondatra pížmová reservoárem leptospiros v ČSR	195
Sedlák J., Dvořáková V.: Příspěvek k diagnostice a terapii postdysenterické artritidy	197
Pokorný J., Havlík O.: Čištění kontaminovaných kultur leptospir membránovými filtry	204
Manych J., Pokorný J.: Použití běžných desinfekčních prostředků a detergentů při desinfekci	
pathogenních hub	209

СОДЕРЖАНИЕ

Суханова М., Паточка Ф.: Попытка добиться Л форм <i>Listeria monocytogenes</i>	133
Семан И.: Обнаружение <i>Listeria monocytogenes</i> у грызунов	140
Собеславский О.: Экспериментальная инфекция кур (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	
<i>S. burneti</i>	146
Шерый В., Штраусс Ю.: Орнитоз у салмонеллоз у обыкновенной чайки (<i>Larus ridi-</i>	
<i>bundus</i> L.)	152
Морнштейнова Д., Албрехт П.: Экспериментальная инфекция мышки <i>Micromys</i>	
<i>minutus</i> вирусом чехословацкого клещевого энцефалита	157
Паточка Ф., Кубелка В., Кorych В.: Культивация вируса инфекционного энцефало-	
миелита свиней (болезни Тешена) в гомологической ткани I.	162
Кorych Б., Паточка Ф., Кубелка В.: Культивация вируса инфекционного энцефало-	
миелита свиней (болезни Тешена) в тканевых культурах гомологических	
тканей II.	166
Дубен И., Нейбауер М., Дубен З.: <i>Corynebacterium pyogenes bovis</i> — сравнение штам-	
мов происходящих от животных с вариантами от человека	169
Моттл И.: Микротехника для скорого обнаружения редукции нитратов	179

ČESKOSLOVENSKÁ EPIDEMIOLOGIE, MIKROBIOLOGIE,
IMUNOLOGIE

Nákladem Státního zdravotnického nakladatelství v Praze III, Malostranské nám. 28. — Oddělení časopisů a administrace v Praze II, Krakovská 8, telefon 23-07-51-4. — Vedoucí redakce: Prof. MUDr K. Raška. — Vychází 6krát ročně za předplatné 45,60 Kčs, jednotlivé číslo 7,60 Kčs. Tisk: Střeďočeské tiskárny, n. p., základní závod, Praha II, Hálkova 2. — Rozšiřuje: Poštovní novinová služba (kat. č. 135). Objednávky přijímá každý poštovní úřad i doručovatel. — A-03811

Československá
epidemiologie, mikrobiologie, imunologie

ROČNÍK VI.

KVĚTEN 1957

ČÍSLO 3

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

**POKUS O DOSAŽENÍ L FOREM LISTERIA
 MONOCYTOGENES**

M. SUCHANOVÁ a FR. PATOČKA

Sama existence lidských adnatních listerios, jak byla zaznamenána postupně řadou autorů na celém světě [viz H. Seeliger: Listeriose (5)] a od r. 1951 každoročně pozorována také v ČSR [Patočka—Benda (4), Vacek (7), Suchanová a spol. (6), Menčíková (3)] vede k vysoce pravděpodobné představě diaplacentárního přenosu listerie podle všeho intaktní placentární bariérou. Naše zkušenosti (celkem shodné s většinou autorů cizích) doposud ukazují, že nákaza mátek listeriosou zachvácených plodů nastává nejpravděpodobněji v posledních měsících gravidity. Je zhusta inaparentní, z velké části lehkého a klinicky netypického charakteru a jen vzácněji těžší a výrazná.

Vstupní bránu nákazy matky, jak je z předeslaného pochopitelné — většinou neznáme. Podle naší představy, ověřené případem Menšíkové, může jí být sliznice a lymfatická tkáň tonsil. Podle experimentů na zvířeti (1, 2) lze právem usuzovat též na poměrně častou infekci alimentární, případně přenos cestou konjunktivální. Naproti tomu není nic známo o vzniku listerie do gravidní matky traumatem, ač se to rovněž nedá vyloučit [viz též naše experimenty (6)]. Uropoetický aparát, jakžto místo primárního vniku listeriové infekce do organismu těhotné, se nám zdá být málo pravděpodobný, ačkoli jsou listeriové pyelitidy a cystopyelitidy popsány v případech adnatních listerios téměř nejčastěji. Většinou zde jde o nesporná druhotná onemocnění, jež jsou paralelním důsledkem zachvácení placenty plodu.

Nepochybně dochází po vniku infekce do matky kteroukoli z vylíčených cest k přechodným bakteriemiím, při nichž dochází k prostupu listerie z krve intervilosních prostor na placentu a plod.

Jen k vůli úplnosti poznamenáváme, že výjimečně může mít adnatní listeriosa i jinou pathogenesu, t. j. ascensi nákazy per continuitatem z infikované vaginy do dělohy a plod (8).

Nevyřešenou zůstává otázka, jaké jsou příčiny specifické afinity listerie k placentě, resp. k plodu, jež byla prokázána naprosto jasně jak klinikou adnatních listerios tak řadou experimentálních prací [na př. Patterson (cit. z 5), Hahnefeld (1), Gray (2), Suchanová—Menčíková—Patočka—Benešová (6)]. Především nutno uvažovat o té okolnosti, že tkán placenty samotné i embryonální tkáň plodu jsou zvláště vhodným prostředím pro množení listerií i z nejnepatrnějších infikujících kvant tohoto bakteria. Pravděpodobnou je dále domněnka, že specifický podpůrný vliv na rozvinutí infekce v placentě a plodu mají vnitřně sekretorické změny, podmíněné graviditou, nebo některý z dosud neznámých a procesem gravidity vyprovokovaných metabolitů, který by mohl být pro listerii podpůrným růstovým faktorem. V našich orientačních pokusech zůstal však na př. agofolin

zcela bez vlivu na rozšíření listeriové infekce, vyvolané nepatrnými dávkami, které u gravidní samice vedly až k smrtící generalisované chorobě.

Už ve své první práci s Bendou (4) jsme naznačili, že by přestup ojedinelých individuí listerie z krve subklinicky nebo jen velmi lehce infikované matky intaktní placentární bariérou mohl být snáze pochopitelný, kdyby se prokázala schopnost tohoto mikroorganismu rozpadat se v drobné až i snad filtrovatelné formy snáze procházející, schopné však dorůst a vydatně se množit v citlivé tkáni placenty nebo embrya.

Byli jsme si vědomi toho, že podobný problém zůstal nedořešen i pro případ *spirochaetae pallida*, u níž se předpokládá, že průnik je umožněn jejím zvláštním typem pohyblivosti a dokonce pro *mycobacterium tuberculosis*, kde jako prvotní příčina se uvádí vznik nekros v placentárních syncytiích, které tvoří most přechodu.

U listerie nás k výše uvedené koncepci vedl nálezný drobných granulárních forem tohoto bakterie, které jsme při prvních našich případech zjistili v hnisu placentárních abscesů lidských.

Položili jsme si už tehdy za úkol pokusit se prostudovat šíři možné variability listerie jednak směrem k tvorbě rozpadových částecek a jejich regeneraci, jednak se zaměřením k jejich případné schopnosti vytvářet analogon t. zv. L forem, o nichž se prokázalo, že mohou obsahovat množení schopné granulární elementy, velikosti až i větších filtrovatelných virusů.

A. Granulární formy listerie vznikající její rozpadem v živém organismu

Při jinak zaměřené práci jsme zjistili, že vstříknutí husté suspence živých virulentních listerií s lipidními adjuvanciemi podle originálního Freundova předpisu intramuskulárně králíkovi, vede pouze k lokální zánětlivé reakci, v níž lze zjistit listerie většinou už jen ve formě granul nebo drobných kokobacilů.

Pokusy tohoto druhu byly provedeny celkem na 9 králicích a to 7 neimunních a 2 předem immunisovaných. Vstříklo se 0,5 ml suspence bakterií s adjuvantní směsí v poměru 1 díl bakteriální suspence ku 2 dílům adjuvancií. V žádném případě nedošlo ke generalisaci listeriové infekce.

Ve všech 9 případech byla extirpována částka svalů, do něhož se injikovalo a to průměrně 6. den po injekci. Místo vpichu bylo vyšetřeno mikroskopicky, kultivačně a 8krát sval z bezprostředního okolí vpichu i histologicky.

Mikroskopicky v nátěru z rozdrcené tkáně z místa infekce byla zjištěna svalová drť, zánětlivé buňky různého typu a v menšině případů gramnegativní až gramlabilní granulka drobných rozměrů (i větší okrouhlé elementy), která připomínala kulatá tělíska L forem. Typické formy listerie nebyly nalezeny.

Histologicky (doc. Dr. Bednář, doc. Dr. Benešová) byl dokázán v intermysiu různě intenzivní, resorptivní, granulomatosní zánět. Jenom v některých případech byly prokázány nápadně krátké, výjimečně také běžně veliké grampositivní bipolární tyčinky v nepatrném počtu. Ve všech 9 případech vyrostla bohatá kultura listerie.

Aniž bychom z těchto pozorování chtěli činit zvláště důrazné závěry, pro něž nám chybí také přesné kvantitativní hodnocení poměrů, máme snad právo z nálezu necharakteristických granulárních a krátkých forem a z diskrepance mezi chudostí mikroskopického obrazu a bohatostí kultury soudit, že listerie za uvedených poměrů ve tkáni podléhá morfologickým změnám při relativně dobrém zachování růstových schopností.

Velmi zřetelné granulární formy listerie byly zjištěny histologicky u králíka infikovaného malým kvantem listerií a to v histiocytech v okolí plicních listeriomů. Rozměry těchto granulí odhadujeme daleko pod 1 mí, takže podle našeho názoru odpovídají zhruba svou velikostí kokobacilárním formám *Rickettsia Burneti*. Benešová a Menčíková v připravované práci potvrzují zcela analogické nálezy v plicních histiocytech dětí při adnatní listerioze.

Řadou pokusů jsme si ověřili skutečnost publikovanou již před námi, že *Listeria monocytogenes* je bakteriem velmi rychle se množícím ve všech tkáních vyvíjejícího se kuřecího zárodku, které také infekci zpravidla podléhá a to tím rychleji, čím je mladší. Nejrychleji usmrcuje podle našich zkušeností inokulace do žloutkového vaku, který se ukázal citlivějším a rychlejším detektorem listerie z nepatrných inokulačních kvant nežli hodnotný glukosový bujon.

Celkem jsme zpracovali z nejrůznějších výzkumných důvodů asi 250 embryí 7–8denních, naočkovaných velmi řídkou, mladou kulturou listerií. Embrya většinou hynula do 2, resp. 3 dnů, při čemž žloutkový vak, embryo samo, amniotická i alantoidní tekutiny byly naplněny gram pozitivními granulárními formami listerie tvaru i velikosti velmi drobných až středních koků. Typické bakteriální formy listerie v kuřecím embryu se vyskytovaly rovněž, byly však poměrně vzácné. Vyskytovaly se zejména tehdy, bylo-li embryo po uhynutí ponecháno ještě několik hodin v inkubátoru. Histologický nález některých uhynulých embryí zhruba potvrdil bakterioskopii.

Ze žloutkového vaku, embryálních tekutin i tkání vyrostla rychle typická kultura listerie v nápadně velkém množství.

Granulární, případně kokovité formy listerie v těchto pokusech připomínaly velikostí a samozřejmě i tvarem ony, jež byly prokázány už dříve v lidských placentárních abscesech, případně i intracelulární granula v plicních histiocytech u králíka i člověka.

Potvrzuje tedy kultura v tkáních mladého kuřecího zárodku schopnost listerie vytvářet drobné kokovité formy, které zcela nepochybně snadno dorůstají v typicky formované listerie.

K dosažení většího kvanta drobných resp. rozpadových forem listerie, jehož by bylo možno využít i k filtračním pokusům, jsme použili dále metody kolodiových váčků.

Váčky byly zhotoveny zhruba podle Keila ze 4% kollodia, naplněny buď bujonovou kulturou nebo suspenzí listerie ve fyziologickém roztoku, uzavřeny a zašity pod kůži králíkům. Některé řarže váčků byly kalibrovány na dimenzi pórů barvivy, při čemž zjištěno, že tyto kolísaly v širokých mezích podle způsobu preparace, zpravidla se však zdály menší než 10 mm. U velké části váčků se při vhojení jejich závěr prakticky neviditelně uvolnil, což bylo příčinou, že v těchto případech jednak pronikala kontinuální mikrokvanta listerií do okolní tkáně, jednak se ve váčku hromadil zánětlivý exsudát z okolí. Váčky extirpovány po 4 a 7 dnech pobytu ve zvířeti, jejich obsah odpipetován, přezkoušen mikroskopicky, kultivačně i co do obsahu bílkovin a použit k filtračnímu pokusu. Experimentováno celkem na 20 králících a 3 morčatech.

Výsledky pokusů lze zhruba rozdělit do 3 skupin. Prvá zahrnuje ty ojedinělé případy, kdy obsah kolodiového váčku nekomunikoval s okolní tkání. V těchto případech byla reakce obsahu se sulfosalicylovou kyselinou negativní a listerie prakticky bez morfologických změn homogenně v suspenzi rozptýlené. V druhé skupině byla komunikace naprosto nepatrná, reakce obsahu se sulfosalicylovou kyselinou slabě pozitivní, listerie zčásti morfologicky i tinkčně intaktní, ale shluklé v masu. Mimo ně bylo vidět značné množství drobných gram pozitivních granul. Váčky ze třetí skupiny, nesporně pod vlivem živějšího přílivu exsudátu z rány (výjimečně nalezeny v obsahu leukocyty), obsahovaly velké množství bílkovin, menší množství shluků listeriových těl, zato však absolutní převahu drobných gram pozitivních i gramlabilních granul z listeriových těl. Kultivace z váčku všech tří skupin prokázala listerii vždy ve velkém množství.

Obsah váčků zejména ze třetí skupiny byl zfiltrován přes Schottův filtr G5 a potom naočkován jednak do glukosových bujonů, jednak vstříknut v množství 0,5 ml do žloutkových vaků 7 až 8denních kuřecích zárodků. V žádném z těchto případů neprokázán z filtrátu touto metodikou růst listerie. Kultivaci obsahu váčků zjištěna však ve všech případech listeria ve velkém množství.

Z těchto pokusů lze soudit, že kultura listerie v kolodiových váčkách, podobně jako ve svalu králíka nebo ve tkáni kuřecího embrya, kde přijde do kontaktu s tělesnými tekutinami, podléhá granulárnímu rozpadu. Tím vznikají formy sice velmi drobné, ale filtrem neprocházející.

V 5 případech jsme pokus modifikovali tak, že jsme zkusili filtrát nakořcentrovat centrifugací na švédské ultracentrifuze po dobu 30 min. za dosažení maxima 30.000 obrátěk/min. V těchto případech byla do bujonu resp. do kuřecího zárodku

inokulována pouze tekutina spodních vrstev centrifugačních rourek, které ovšem neobsahovaly žádný viditelný sediment. V jediném případě z těchto pěti centrifugát, naočkovaný do žloutkového vaku kuřecího embrya, vedl po 4 dnech k vývinu typické listerie, která usmrtila embryo generalisací infekce. Tento celkem už nečekaný výsledek zaznamenáváme především kvůli úplnosti, neboť se nám nikdy poté jej nepodařilo reprodukovat.

B. Pokusy o přeměnu kultury *listeria monocytogenes* na t. zv. L formu

V této řadě pokusů se záměrně používalo čerstvě izolovaných kmenů *listeria monocytogenes*, protože se opakovaně prokázalo, že k tvorbě L forem jsou nejvhodnější stigmatisované primokultury a nejméně vhodné kmeny dlouhou dobu pasážované na neživých kultivačních půdách. Naše další práce skutečnost potvrdila.

Brzy se ukázalo, že přeměna listerie z kmenů námi izolovaných adnatálních listerios na typické L formy je nesnadným problémem. Jak je při této práci běžné, bylo k prvním experimentům o přeměnu použito penicilinu.

Pracovali jsme běžně známou metodikou agarového žlábků (Dienes), do něhož byly nakapány různé koncentrace penicilinu 10, 50, 100, 500 j. penicilinu v 1 ml). U všech 12 námi zkoušených kmenů jsme dosáhli pouze ostré hranice inhibiční zony, ve které po 2 až 7 dnech se začaly objevovat sporé droboučké kolonie listerií, složené z drobných kokovitých útvarů, ale jinak nevykazující žádné typické znaky L forem.

K dalším pokusům jsme zkusili použít specifické protilátky ve formě hyperimunního homologního antilisteriového sera (titr komplement fixačních protilátek 1 : 512), inkorporovaného v množství 10% do měkkého živného agarů i tekuté půdy. Kromě shlukování bakterií v tekutém prostředí jsme po přeočkování nepozorovali formaci kolonií charakteru L.

Podle práce Wittlerové (9) ukázalo se i přidání glycinu do kultivačních půd faktorem podporujícím formaci L kolonií u některých bakterií na př. hemofilů. Zkusili jsme pro naše listeriové kmeny i tuto metodu a to tak, že jsme přidávali glycin v kvantu od 0,5–3% do měkkých agarových půd s 10% koňského sera, na něž jsme naočkovali tři čerstvě izolované kmeny (6, 18, M.). Inkubováno anaerobně, odcítáváno denně po 7 dní; hodnoceno v nátěrech, barvených gramem a tiskovými preparáty barvenými giemou.

V těchto případech byl úspěch aspoň částečný. V koloniích ze všech tří kmenů byla pravidelně při koncentraci glycinu 1–2% zjišťována tvorba vláknitých forem, mnohem delších než jak jsou pravidelně nacházeny v listeriových koloniích R fáze, a ojedinelé sferoidy, odpovídající svými rozměry i strukturou velkým kulatým tělíškům L forem.

Přesto však nelze říci, že by kolonie obsahující tyto dvě abnormální formy listerie odpovídaly ve svém celku charakteristickým L koloniím bakteriálních L forem.

V poslední řadě pokusů jsme se pokusili o kombinaci obou vlivů, jež se zdály mít podle předcházejících pokusů alespoň částečný podpurný efekt na tvorbu kolonií přechodných k L formě.

Tyto pokusy se prováděly tak, že do půdy, složení: bujon z infuze z hovězích srdcí s 1% proteose peptonu 3 (Difco), s ½% NaCl, s 1,25–1,50% práškovaného agarů a s 10% inaktivovaného koňského sera, bylo inkorporováno 1% příp. 2% glycinu. Do žlábků uvedeného středem plotny nakapána kápka roztoku penicilinu o 100 j./ml. Půdy opět kultivovány anaerobně. K pokusům použito kmenů 14, 18, 41.

Kolonie rostoucí mimo sterilní zonu penicilinové inhibice se sestávaly z dlouhých, pro glycin typických forem. Uvnitř sterilní zony docházelo přibližně 48 hodin

k pomalému růstu drobných kolonií, které obsahovaly dlouhá vlákna a podstatně větší množství kulatých tělísek, než jak bylo typické pro glycin samotný.

Část těchto kolonií se pak ještě v dalších dvou dnech vyvinula ve formace odpovídající svou vnitřní strukturou zcela tomu, co popisuje Dienes jako B typ L forem bakteriálních. Skládala se totiž nyní už z ojedinelých vláken, ze středního kvanta velkých kulatých tělísek a z velkého množství kokobacilárních granul. Co však bylo zvláště typické pro tyto, už zcela jasné L formy, byla jejich jakoby pěnovitá struktura, vyvolaná okrouhlými prázdnými prostory mezi výše popsanými určitými bakteriálními formacemi. V dalším sledu a to až do 10 dní nastával spon-tánní, ale pozvolný zvrát v normální listeriové kolonie.

Přečkování těchto kolonií na výši jejich přeměny v L formu na glycinovou půdu nezabránilo tomuto zvrátu ke kultivačnímu normálu. Přečkování na penicilinovou půdu vedlo buď k zastavení množení nebo k vývinu mikrokolonií sestávajících z kokovitých elementů.

Tato poslední serie pokusů tedy ukázala, že lze kombinací účinku penicilinu a glycinu na některé listeriové kmeny dosáhnout poměrně nesnadno tvorby nestabilní, varianty L formy listerie, označované jako B typ, která přechází spon-tánně k normálnímu růstu běžných bakteriálních kolonií. Tato fáze je tak rychle přechodná, že nám prozatím nebylo možno ji podchytit k prohloubenému biologickému studiu, zejména k ověření, zda obsahují bakteriálními filtry procházející granulka ve zjistitelném množství.

D i s k u s e

Výsledky této naší práce nedovolují prozatím zcela jasných a určitých závěrů a také je nepokládáme za ukončené. Jsou pouze souhrnem pozorování a výsledků práce zaměřené k vytčenému cíli. Nechceme-li, jak jsme ostatně už uvedli, dedukovat z jediného experimentu, neprokázali jsme až do této doby existenci většího množství snadno filtrovatelných forem listerie. Zato jsme si ověřili starou zkušenost, že listerie snadno vytváří v kontaktu s živou tkání kokovité a časté velmi drobné tvary, jejichž rozměry odhadujeme přibližně jako u drobných forem rickettsií délkou pod 1 mí. Podle všeho jsou tyto schopny (jako extrémní forma variability bakteriálního těla listerie) i intracelulárního parazitismu a nesporně celkem snadno dorůstají do běžných bakteriálních útvarů. Přeměna v L formu, která by rovněž mohla obsahovat filtrovatelná a regenerace schopná granulka, je v zásadě možnou, ale celkem nesnadnou a jen v přechodné fázi. Zdá se nám, že tato pozorování vybízejí alespoň k tomu, aby celá problematika variační schopnosti listerie byla dále a prohloubeně studována.

S O U H R N

Jako příspěvek k řešení problému přestupu listeria monocytogenes placentární bariérou při listeriosách fetů byla studována morfoloická variabilita tohoto mikroba v živých tkáních a na kultivačních půdách hlavně směrem k tvorbě drobných, případně filtrovatelných množení schopných částic, event. L forem.

Naše pokusy prokázaly, že v živých tkáních (v králičím svalu, kam byly listerie vpraveny spolu s lipidní adjuvanční směsí podle Freunda, v králičím podkoží, kde byly umístěny v kolodiových váčcích a v kuřecích embryích, očkovaných do žlutkového vaku) se listerie nachází většinou v drobných kokovitých až granulárních formách, které mohou být uloženy i intracelulárně, na př. v plicních histiocytech králíka). Na kultivačních půdách tyto elementy snadno regenerují v typické listerie. Nejdrobnější z nich jsou zhruba velikosti drobných forem rickettsia burneti, jejich filtrabilitu se však nepodařilo spolehlivě prokázat.

Na umělých půdách byla studována schopnost listerie vytvářet L formu. K pokusům použito penicilinu, glycinu a homologní protilátky.

Protílátka neměla vlivu v tomto směru. Penicilin sám vedl pouze ke vzniku velmi drobných kolonií, složených z drobných koků. Glycin vyvolával dlouhé vláknité formy a tvorbu nečetných sferoidů, připomínajících velká kulatá tělíska bakteriálních L forem. Teprve kombinací obou posléze jmenovaných vlivů se podařilo vyvolat kolonie, které svou strukturou i elementy je skládajícími, se naprosto lišily od bakteriálních kolonií a jasně připomínaly L formu Dienesova typu B. Elementy těchto kolonií při další inkubaci a po přeočkování se pozvolna vracely v normální typické listerie.

РЕЗЮМЕ

Попытка добиться Л форм *Listeria monocytogenes*

Как взнос к решению вопроса перехода *Listeria monocytogenes* через плацентарный барьер при листериозах fetусов, изучалась, в живых тканях и на питательных средах, морфологическая вариабильность этого микроба — главным образом вопрос о способности образования им маленьких, быть может фильтрабельных, способных к размножению частиц, возможно Л форм.

Наши опыты показали, что в живых тканях (в кроличьей мышце, в которую листерии вводились вместе с липоидной адьювантной смесью по Фройнд, в кроличьем субкутане, где были помещены в колодиовых мешочках и в куриных эмбрионах, инокулированных в желточный мешок) листерии находятся преимущественно в маленьких кокковистых или даже гранулярных формах, которые могут помещаться и интрацеллулярно (на пр. в легочных гистиоцитах кролика). На питательных средах эти элементы легко регенерируют, превращаясь в типичные листерии. Размер самых маленьких из них приблизительно такой же как у маленьких форм *Rickettsia burneti*, но их фильтрабельность не удалось надежно доказать.

На медиумах изучалась способность листерии образовать Л форму. Для опытов употреблялись пенициллин, глицин и гомологические противотела.

Противотела в этом отношении не оказали влияния. Один пенициллин вызывал образование лишь маленьких колоний, состоящих из мелких кокков; глицин — появление длинных волокнистых форм и образование немногочисленных сфероидов, напоминающих большие круглые тельца бактериальных Л форм. Только через комбинацию обоих на конец упомянутых агентов удалось вызвать образование колоний, которые по своей структуре и составным элементам совершенно отличались от бактериальных колоний и ясно напоминали Л форму В типа Дienesа. Элементы этих колоний при дальнейшей инкубации и после переноса на подходящую среду медленно обратно вращались в нормальные типичные листерийные формы.

SUMMARY

An Attempt to Attain L Forms of *Listeria monocytogenes*

To supplement the findings concerning the problem of penetration of the placental barrier by *Listeria monocytogenes* in foetal listerioses the morphological variability of this microbe has been studied in live tissues and on culture media. Our attention was centered on the production of minute, or even filtrable particles capable of propagation, eventually bacterial L forms.

Our experiments showed that in live tissues (a — in rabbit muscle whither *Listeriae* were applied with a lipid adjuvant mixture according to Freund; b — in rabbit subcutaneous tissue where *Listeriae* were deposited in collodion sacs; and c — in chick-embryo yolk-sacs) *Listeriae* are usually found in minute coccoid or granular forms which can also be found intracellularly (e. g. in rabbit lung histiocytes). These elements readily regenerate into typical *Listeriae* on culture media. The minutest of them are approximately the size of *Rickettsia burneti*, but their filtrability has not been reliably ascertained.

The capacity of *Listeriae* to form L forms has been studied on culture media; penicillin, glycin, and homologous antibodies were implemented in these experiments.

The antibodies remained without any effect; penicillin alone lead to the production of very small colonies composed of minute cocci; glycin evoked the production of long filamentous forms and some spheroids similar to large spheric bodies of bacterial L forms. Combined, the two latter substances evoked the production of colonies which in their structure and in the elements composing the wholly differed from bacterial colonies and resembled the L form type B described by Dienes. The elements of these colonies under further incubation and subculture gradually regained the form of typical *Listeriae*.

L I T E R A T U R A

1. Hahnefeld, M.: Profylaxe 1954, I., 164. — 2. Gray, Ml. Chintamani, Singh, Thorp, Jr.: Proceedings 89—175, 163—169, 1955. — 3. Menčíková: Čs. hygiena, epidemiologie, mikrobiologie, imunologie 225, 1956. — 4. Patočka, Benda: Čs. hygiena, epidemiologie, mikrobiologie, imunologie 325, 1953. — 5. Seeliger, H.: Listeriose, Monografie, J. Ambr. Barth, 1955. — 6. Suchanová, Menčíková, Patočka, Benešová: Acta Medica Universitatis Carolinae 1956, Supl. — 7. Vacek, R., Benda, R.: Pediatrické listy 9, 107, 1954. — 8. Wenkebach, G.: Mikr. kongres Řím, 1953, Vol. II., 406, Nr. 669. — 9. Wittler, R. G.: G. Gen. Microb. I., 1024, 1951.

Text pod obrázky na křídové příloze

- Obr. 1. 24 hod. kultura *Listeria monocytogenes* v bujonu (zvětšeno 1000X).
- Obr. 2. Dlouhé formy *Listeria monocytogenes* po 48 hod. v glycinové půdě.
- Obr. 3. Ojedinelá kulatá tělíska a dlouhé formy *Listeria monocytogenes* na půdě s glycinem (zvětšení 600X).
- Obr. 4. Kolonie L-formy *Listeria monocytogenes* na půdě s glycinem a penicilinem (zvětšení 1000X).
- Obr. 5. Kolonie L-formy *Listeria monocytogenes* na půdě s glycinem a penicilinem (zvětšení 1000X).
- Obr. 6. Granulární formy *Listeria monocytogenes* v plicních histiocytech králíka.

Cs. epidemiologie,
mikrobiologie, imunologie
VI - 3 - 1957

Ústav epidemiologie a mikrobiologie v Praze, ředitel prof. Dr. K. Raška

NÁLEZY LISTERIA MONOCYTOGENES U HLODAVCŮ*)

JIRÍ SEEMAN

U listerios je epidemiologie nejméně probádaným úsekem a na mnoho otázek stále nedovedeme odpovědět. Celkový obraz epidemiologie a epizootologie je velmi pestrý a podobá se v mnohém ostatním anthroozoonosám. Způsob šíření listerios s koloběhem v přírodě je značně různorodý a všechny články infekčního řetězu nejsou dosud známy. Zejména neznáme všechny zdroje infekce, způsoby šíření a přenosu na člověka.

Rozšíření listerios u zvířat má význam pro šíření nákazy i pro přenos na člověka. Proto je epizootologie nedílnou součástí epidemiologie.

Jednou ze základních, stále nevyřešených otázek jsou biologické přírodní rezervoáry listerios. Jejich znalost je potřebná k sledování původu a šíření infekce při řešení epidemiologických souvislostí.

Prvé nálezy listerií u volně žijících zvířat pocházejí ze dvacátých let od Mur-
raye a spol. a od Pirieho, který je našel náhodně při kontrolním vyšetřování v rámci hledání přenašečů moru u jihoafrických myší *Tatera lobengulae*. Myši zacházely za typických příznaků septikopyemické infekce. Další ojedinělé nálezy potvrzují rozšíření listerios u polních hlodavců, jako myši, králíků, zajíců (Gudkova—Sacharov v SSSR, Levy v USA). Je pozoruhodné, že byly listerie prokázány u krys pouze v jediném případě v Brazílii (Machiavello). Naproti tomu Olafson předpokládá, že krys mohou být přírodním rezervoárem, podobně jako je tomu u moru.

Rozšíření listerios u velkých, volně žijících zvířat není ve větší míře probádáno. Pouze ojediněle prováděné vyšetřování s pozitivním nálezem listeriosy, na příklad u lišky a srnčí zvěře (Thal — Švédsko), naznačují, že se může vyskytovat u lesních zvířat častěji, než je známo.

Průběh nemoci a pathologickoanatomický nález u zvířat, zašlých listeriosou, se prakticky shoduje s obrazem experimentální infekce u pokusných a laboratorních zvířat. Onemocnění bývá septikopyemického rázu s postižením jater, kde jsou granulomatosní ložiska s nekrotickými centry, zvětšení sleziny a často postižení plic s šedobílými uzlíky. Někdy bývá postiženo i srdce, kde bývají drobné nekrosy podobné infarktovým ložiskům.

Materiál a metody

Účelem našeho vyšetření bylo zjistit orientačně přemočenost zvířat listeriem a pátrat po přírodních biologických rezervoárech.

Odchyt a odběry byly prováděny v různých přírodních lokalitách v Čechách při terénních expedicích Ústavu epidemiologie a mikrobiologie.

Provedli jsme vyšetření celkem 2000 zvířat. Kultivačně jsme zpracovávali orgány různých volně žijících zvířat, převážně polních hlodavců, ptáků synanthropních a exoanthropních i několika velkých zvířat, dále ojediněle některých chovných zvířat. Serologicky jsme vyšetřovali chovná zvířata a srdeční výluhy některých volně žijících zvířat.

Kultivační bakteriologické vyšetřování jsme prováděli z jater, sleziny a plic, případně i ze střeva. U některých drobných zvířat jsme zpracovávali směs jater a sleziny. Orgány jsme po rozmělnění očkovali přímo na krevní agar a Endovu půdu a pomnožovali v játrovém bujonu s následným vyočkováním na výše uvedené půdy.

*) Předneseno na sjezdu anthroozoonosy v květnu 1956.

·Přezkoušeli jsme metodiku kultivace po uložení infekčního materiálu na dobu 2-4 i více týdnů v lednici při teplotě + 4°, která postačí ke slabému pomnožení listerií. Tímto způsobem se zvýší zachytlost (Gray, Linzenmeier). Podařilo se nám tímto způsobem v jednom případě zachytit *Listeria monocytogenes*. Orgány hraboše rudého (*Clethrionomys glareolus*), negativní v primokultuře, byly uloženy 6 týdnů v lednici a po této době vyrostla při pomnožení v játrovému bujónu *Listeria* v čisté kultuře.

V ý s l e d k y

Přehled výsledků bakteriologických vyšetření je vyjádřen v tabulkách 1. a 2. V tabulce 1. se uvádí převážně vyšetření hlodavců, v tabulce 2: výsledky vyšetření ptáků. Celkem bylo kultivačně vyšetřeno 1300 zvířat. *Listeria monocytogenes* izolována ve třech případech: první kmen z hraboše rudého (*Clethrionomys*

Tabulka 1. Přehled bakteriologických vyšetření.

Volně žijící zvířata			
Druh	Počet vyšetřených zvířat	Isolace	
		<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
<i>Sorex araneus</i> — Rejsek obecný <i>Sorex minutus</i> — Rejsek malý	152	0	0
<i>Neomys fodiens</i> — Rejsek vodní	12	0	0
<i>Crocidura</i> — Běložubka	5	0	0
<i>Apodemus sylvaticus</i> — Myšice křovinná	295	1	1
<i>Apodemus flavicollis</i> — Myšice žlutohrdlá			1
<i>Mus musculus</i> — Myš domácí	78	0	0
<i>Microtus arvalis</i> — Hraboš polní	130	0	0
<i>Clethrionomys glareolus</i> — Hraboš rudý	85	1	0
<i>Rattus norvegicus</i> — Potkan	43	1	0
<i>Arvicola terrestris</i> — Hryzec vodní	6	0	0
<i>Lepus europaeus</i> — Zajíc	12	0	1
<i>Sciurus vulgaris</i> — Veverka	24	0	0
<i>Ondatra</i> — Ondatra	3	0	0
<i>Mustella nivalis</i> — Lasička	6	0	0
<i>Erinaceus europaeus</i> — Ježek západní	3	0	0
<i>Plecotus</i> <i>Myotis</i> <i>Barbastella</i> Netopýr	85	0	0

Tabulka 2. Přehled bakteriologických vyšetření.

Ptáci			
Druh	Počet vyšetřených zvířat	Isolace	
		listeria mono- cytogenes	erysi- pelothrix rhusio- pathiae
<i>Parus major</i> — Sýkora koňadra	53	—	2
<i>Parus coeruleus</i> — Sýkora modřinka		—	—
<i>Parus cristatus</i> — Sýkora parukářka		—	—
<i>Passer domesticus</i> — Vrabec domácí	65	—	2
<i>Corvus frugilegus</i> — Havran polní	70	—	—
<i>Turdus musicus</i> — Drozd cvrčala	32	—	1
<i>Turdus merula</i> — Kos černý		—	—
<i>Emberiza citrinella</i> — Strnad obecný	40	—	—
<i>Phoenicurus ochruros</i> — Rehek domácí	25	—	—
<i>Fringilla coelebs</i> — Pěnkava obecná	51	—	—
<i>Erithacus rubecula</i> — Červenka obecná	12	—	—
<i>Columba livia</i> — Holub	18	—	—
<i>Motacilla alba</i> — Konipas bílý	15	—	—
<i>Sturnus vulgaris</i> — Špaček obecný	10	—	—
<i>Sylvia</i> — Pěnice	12	—	—
<i>Carduelis spinus</i> — Čížek lesní	1	—	1
<i>Carduelis carduelis</i> — Stehlík obecný	3	—	—
<i>Delichon urbica</i> — Jiříčka	45	—	—
<i>Hirundo rustica</i> — Vlastovka	62	—	—
<i>Phylloscopus collybita</i> — Budníček menší	7	—	—
<i>Certhia familiaris</i> — Šoupálek dlouhoprstý	4	—	—
<i>Troglodytes troglodytes</i> — Střízlík obecný	3	—	—
<i>Aegithalos caudatus</i> — Mlynářík dlouhoocasý	3	—	—
<i>Dendrocopus major</i> — Strakapud velký	1	—	—
<i>Garulus glandarius</i> — Sojka obecná	5	—	—
<i>Phasianus colchicus</i> — Bažant obecný	22	—	—
<i>Regulus regulus</i> — Králíček obecný	5	—	—

Tabulka 3. Přehled serologických vyšetření na listeriosu metodou rourkové aglutinace.

Zvíře	Počet vyšetřených	Počet případů se zvýšeným titrem (1 : 160 - 1 : 640)
Krávy	255	18
Telata	70	1
Ovce	46	6
Kozy	11	3
Králci	17	2
Zajáci	16	—
Kachny	90	5
Slepice	53	0
Husy	25	0
Srdeční výluhy různých volně žijících zvířat	110	0

glareolus) z jater i ze sleziny, druhý kmen z jater potkana (*Rattus norvegicus*). Třetí kmen listerie pochází z jater myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*).

Uvádíme na tomto místě i výsledky izolací kmenů *Erysipelothrix rhusiopathiae*, které jsme našli v devíti případech, z toho třikrát u hlodavců: u myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) ze sleziny, u myšice žlutohrdlé (*Apodemus flavicollis*) ze směsi orgánů, a u zajíce (*Lepus europaeus*) z plíc. Zbývajících šest kmenů jsme isolovali z ptáků: dvakrát ze sýkory koňadry (*Parus major*) ze směsi jater a sleziny a dvakrát z vrabce domácího (*Passer domesticus*) z jater a ze směsi orgánů. Další kmeny z drozda cvrčaly (*Turdus musicus*) ze sleziny a z čížka lesního (*Carduelis spinus*) z jater.

Isolované kmeny listerie *monocytogenes* jsme identifikovali morfologicky, kultivačně i biochemicky a ověřili si patogenitu na bílých myškách. Serologicky přísluší všechny typu 1 (Paterson).

Připravili jsme králičí diagnostická sera. K imunisaci jsme použili antigenů, vyrobených ze standardních kmenů (Paterson) serologických typů 1-4, které nám zaslal doc. Dr Seeliger z Bonnu.

Serologická vyšetřování jsme prováděli metodou rourkové aglutinace. Používali jsme antigenu připraveného z kmenů dodaných ústavem prof. Dr Patočky. Vyšetřovali jsme převážně chovná zvířata, jako hovězí dobytek, ovce, kachny, slepice a j. a ojediněle srdeční výluhy drobných volně žijících zvířat. Celkem jsme serologicky vyšetřili sera 700 zvířat. Přehled výsledků serologických vyšetření je vyjádřen v tabulce 3.

Zvýšený titr hladiny protilátek jsme pozorovali u 35 zvířat. Jako hranice při hodnocení považován minimální titr 1:320.

D i s k u s e

U všech hlodavců s pozitivním kultivačním nálezem byl pathologickoanatomický nález normální. Z toho lze soudit, že jde buď o zdravé nosiče listerií, kteří mohou přenášet zárodky podobně jako bacilonosiči, nebo o chronickou formu

onemocnění, jaká byla u zvířat už popsána. V tomto smyslu se shodují naše nálezy s Machiavellovými, který isoloval rovněž u zdravých hlodavců zárodky (divoké krysy v severní Brazílii).

Podobná pozorování uvedli též Plummer a Byrne, kteří nachytali v severní Kanadě lumíky (*Lemmus trimucronatus* a *Lemmus groenlandicus*). Po převozu, při němž nastalo snížení odolnosti, onemocněli mnozí listeriosou. Autoři předpokládají u zvířat latentní bacilonosičství.

Abychom mohli s konečnou platností posoudit úlohu hlodavců i jiných volně žijících zvířat, je zapotřebí dalšího vyšetřování. Z dosavadních pozitivních nálezů je patrné, že se mohou uplatňovat jako biologický reservoár.

Při koloběhu infekce v přírodě mají v epizootologii listerios význam jak přenašeči nákazy, tak i dočasní hostitelé. Dosavadní poznatky jsou i zde velmi kusé. Kratochvilovi se podařilo isolovat listerie z klíštěte (*Ixodes ricinus*). Gill považuje střecha (*Oestrus ovis*), sídlícího v nose ovcí, za možného přenašeče nákazy, ale nepodal důkaz.

Naše ojedinělé pokusy o izolaci listerií z klíšťat (*Ixodes* sp.) byly negativní, stejně jako kultivace z ptakotrudek (*Crataerina*, *Ornithomyia*, *Stenopteryx*).

S O U H R N

Positivní nálezy listerií u hlodavců, i když pozorované dosud v malé míře, poukazují na účast hlodavců v epidemiologii a epizootologii listerios. Potvrzují názor, že se hlodavci účastní koloběhu nákazy v přírodě.

Popsaná izolace *Listeria monocytogenes* u potkana (*Rattus norvegicus*) je nálezem pozoruhodným, a pokud je nám z dostupné literatury známo, dosud nepozorovaným.

U ptáků synanthropních a exoanthropních jsme listerie nenalezli, takže lze soudit, že jim nepřísluší v přenosu nákazy valný význam.

Nálezy považujeme za orientační, protože se jednalo o vyšetřování zvířat z různých lokalit v rámci terénních úprav Ústavu epidemiologie a mikrobiologie. V místech výskytu pozitivních nálezů nebyly pozorovány případy lidské listeriosy.

V přítomnosti se zaměřujeme na hledání epidemiologických souvislostí mezi výskytem lidských onemocnění a nálezů listerií u zvířat.

Р Е З Ю М Е

Обнаружение *Listeria monocytogenes* у грызунов

Положительные находки листерий у грызунов, хотя пока они наблюдались в незначительной мере, показывают на участие грызунов в эпидемиологии и эпизоотологии листериозов. Они подтверждают мнение, что грызуны принимают участие в циркуляции этой инфекции в природе.

Описанная изоляция *Listeria monocytogenes* у серой крысы (*Rattus norvegicus*) является единичной находкой, и насколько нам известно из доступной литературы, она на другом месте пока не наблюдалась.

У птиц синантропных и эксоантропных мы листерий не нашли, так что возможно полагать, что они не имеют важного значения в переносе инфекции.

Эти находки мы считаем ориентировочным, так как дело касалось исследований животных из разных районов при работе в террене, проводимой Институтом эпидемиологии и микробиологии. В местах положительных находок случаи человеческого листериоза не наблюдались.

В настоящее время мы намерены искать эпидемиологические связи между распространением заболеваний у людей и находками листерий у животных.

S U M M A R Y

Findings of *Listeria monocytogenes* in Rodents

Positive findings of *Listeriae* in rodents, also when observed rarely as yet, may refer to the participation of rodents in the epidemiology and epizootology of listerioses. They confirm the view that the rodents participate in the infection's circulus in the nature.

The described isolation of *Listeria monocytogenes* in *Rattus norvegicus* represents an interesting and, as far as we know from the literature we have at our disposal, hitherto not observed finding.

No *Listeriae* were found in synanthrope and exoanthrope birds, so that we may conclude that they have no much importance in the transmission of the infection.

Our findings have to be observed as good for orientation only, because we investigated animals from different localities within special terrain expeditions of the Institute of Epidemiology and Microbiology. No cases of human listeriosis were observed in the vicinity of positive findings.

Our present intention is to search for epidemiologic connections between the occurrence of human infections and between findings of *Listeriae* in animals.

L I T E R A T U R A

1. Geurden, L. M. G.: Ann. Soc. belge Méd. trop. XXXIV, 6, 901, 1954. — 2. Gill, D. A.: Veter. J. 87, 60, 1931, Austral. Veter. J. 13, 46, 1937. — 3. Gray, M. L., Stafseth, D. V. M., Thorp, T.: J. Amer. Veter. Ass. CXVIII, 242, 1951. — 4. Gray, M. L., Stockton, J. J., Carpenter, W. S.: J. Amer. vet. Ass., Vol. 124, 102, 1954. — 5. Gudkova, E. J., Sacharov, P. P.: Z. exper. biol. Med. 22, 54, 1946. — 6. Jensen, R., Mackey, D. R.: J. Amer. Veter. Ass. 114, 420, 1949. — 7. Kratochvil, N. I.: Žur. mikrob., epidemiol. a imunol. 11, 60, 1953. — 8. Levy, M. L.: Veter. J. 104, 310, 1948. — 9. Machiavello, A.: Arq. de Hyg. 12, 105, 1942. — 10. Murray, E. G. D., Webb, R. A., Swann, M. B. R.: Jour. Pathol. a Bacter. 29, 407, 1926. — 11. Oedegard, B., Grelland, R., Henriksen, S. D.: Acta med. scand. 142, 231, 1952. — 12. Olafson, P.: Cornell Vet. 30, 141, 1940. — 13. Paterson, J. St.: J. Pathol. a Bacter. 48, 25, 1939; ibidem 51, 427, 1940. — 14. Patočka, F., Benda, R., Stárka, J.: Čs. Hygiena, epidemiologie, mikrobiologie 2, 5, 325, 1953. — 15. Plummer, P. J. G., Byrne, J. L.: Canad. J. Comp. Med. a Vet. Sci. 14, 214, 1950. — 16. Pirie, J. H. H.: Publ. S. Afr. Inst. Med. Res. 3, 163, 1927. — 17. Potel, J. a) Zbl. Bakter. I. Orig. 156, 490, 1951, b) Wiss. Zschr. d. Martin-Luther Univ. Halle a. S. III, 341, 1953, c) Zschr. f. ges. Hyg. 2, 3, 1956, d) Das Dtsch. Gesundheitswesen 92, 1954. — 18. Seeliger, H.: a) Listeriose, J. A. Barth Verlag, Leipzig, 1955. b) Dtsch. med. Wschr. 587, 1952. c) Z. Hyg. 139, 389, 1954. d) Z. Hyg. 141, 15 et 110, 1955. — 19. Webb, R. A.: Lancet, II, 5, 1943.

Cs. epidemiologie,
mikrobiologie, imunologie
VI - 3 - 1957

Ústav epidemiologie a mikrobiologie, ředitel prof. MUDr K. Raška

EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE KURA DOMÁCIHO (GALLUS GALLUS DOMESTICUS) C. BURNETI

O. SOBĚSLAVSKÝ

Naši i zahraniční autoři, zabývající se problematikou šíření a koloběhu Q horečky, zmiňují se v některých svých pracích o výskytu této rickettsiosy mezi divoce žijícími i domácími chovnými ptáky.

Babudieri, Sussi-Valli a Moscovici isolovali v roce 1951 R. burneti z holuba a vyvolali experimentální infekci u vrabců a kanára (1, 2, 3).

Z našich autorů to byli Raška, Syrůček a spol., kteří v roce 1954 a 1955 zjistili serologicky pozitivní nálezy u nejrůznějších druhů synanthropních, eusynanthropních a exoanthropních ptáků, žijících v ohnisku Q rickettsiosy (4, 5). V souvislosti s těmito nálezy vyvolali potom experimentálně Q rickettsiosu u kura domácího (*Gallus gallus domesticus*) a prokázali persistenci původce nákazy v jeho orgánech (6).

Stoker oznámil koncem roku 1955, že také prokázal v oblasti s výskytem Q rickettsiosy pozitivní serologické nálezy u ptáků (7).

Z uvedených příkladů je zřejmé, že ptáci, právě tak jako mnoho jiných druhů živočichů, jsou vůči infekci C. burneti více či méně vnímaví a že mohou Q rickettsiosou onemocnět. Avšak nezodpověděná a doposud otevřená zůstává otázka, do jaké míry a za jakých okolností se mohou stát zdrojem a reservoáry této nákazy a do jaké míry se mohou uplatnit při jejím koloběhu a šíření.

V předkládané práci jsme se proto snažili přispět k řešení této otázky modelovým pokusem — experimentální infekcí kura domácího C. burneti. Vytčené dílčí úkoly měly především objasnit dobu persistence C. burneti v orgánech infikovaných slepic, dobu vylučování rickettsií trusem těchto zvířat a konečně potvrdit předpokládanou možnost transovariálního přenosu rickettsií u nich.

METODIKA

Pět slepic běžného chovu, druhu »vlaška«, bylo po předchozím negativním průkazu protilátek proti Q antigenu (Henzerling) infikováno emulzí žlutkového vaku kuřecího zárodku, v kterém byl pomnožen kmen C. burneti 1894, izolovaný v roce 1954 z hlodavce *Clethrionomys glareolus*.

Infekce jednotlivých slepic byla provedena takto:

Slepice č. 1	0,1% emulse	1 ml s. c.
slepice č. 2	0,1% emulse	1 ml s. c.
slepice č. 3	0,1% emulse	1 ml i. p.
slepice č. 4	0,1% emulse	1 ml i. nas.
slepice č. 5	0,1% emulse	1 ml i. nas.

Infikované slepice byly umístěny odděleně v klecích a dlouhodobě pozorovány. Jejich trus a krev byly periodicky vyšetřovány na přítomnost rickettsií a zároveň byl zjišťován titr specifických protilátek v jejich seru.

Krev byla získávána punkcí křídelní žíly, trus byl sterilně odebírán do Petriho misky. Tento materiál, pokud nebyl kultivačně zpracováván ihned, byl uchováván v mrazárně při -150°C nejdéle 14–21 dní.

Krev byla inokulována vždy dvěma morčátům v množství 2 ml i. p. Trus byl suspendován ve fyziologickém roztoku pH 7,2 a připravená suspence byla centrifugována při nízkých otáčkách

(1,500 ot/min.) po dobu 10 minut. Supernatant byl potom oddělen od sedimentu a injikován taktéž dvěma morčatům subkutánně v množství 2 ml.

Často se nám stávalo, že morčata, kterým byla injikována suspence trusu, hynula druhý nebo třetí den po inokulaci infekcí způsobenou *B. proteus*. Proto jsme k inokulu přidávali polyvalentní antiproteové serum.

Infikovaná morčata byla umístěna odděleně po dvou do skleněných válců a byla jim pravidelně měřena tělesná teplota.

Za 21—30 dní po infekci byla morčata exsanguinována a v jejich seru zjišťován titr specifických protilátek proti antigenu *C. burneti*. K průkazu těchto protilátek se použila komplement-fixační reakce. V několika případech, kdy nám antikomplementární vlastnosti ser zabránily vyšetřit je tímto způsobem, bylo užito reakce mikroaglutinační.

Antigen byl připraven z kmene Henzerling metodikou popsanou Siegertem, Simrockem a spol. (8) a do komplement-fixační reakce byl přidáván v optimálním ředění zjištěném šachovnicovou titrací.

Jako kontroly specificity protilátek bylo v komplement-fixační reakci užito antigenu připraveného z *R. prowazeki*.

Mikroaglutinace byla prováděna s koncentrovaným antigenem (kmen Henzerling).

Jako zdroj komplementu pro komplement-fixační reakci použili jsme neaktivního morčecího sera v množství 1,5 až 2 jednotky komplementu. Tyto byly určeny titrací stoupajícího ředění neaktivovaného morčecího sera smíchaného s pracovním ředěním antigenu. Nejvyšší ředění morčecího komplementu, které způsobilo totální haemolysu 3% erythrocytární sensibilisované suspence (beraní), bylo považováno za jednu jednotku komplementu.

K sensibilisaci beraních erythrocytů bylo užito dvou jednotek haemolytického amboceptoru.

K vyšetřovaným inaktivovaným serum (56° C po 30 minut) ředěným od 1 : 4 do 1 : 64 byly přidány 1,5 až 2 jednotky komplementu, dále pracovní ředění antigenu a po 45 min. inkubace ve vodní lázni při 37° C 3% haemolytický systém. Po čtýřnásobné 30minutové inkubaci ve vodní lázni (37° C) byl hodnocen stupeň zábrany haemolysy. Za pozitivní byla považována ta sera, která rozředěná od 1 : 16 a výše způsobila totální zábranu haemolysy.

Pokusy byly prováděny ve skleněných zkumavkách o průměru 8 mm, ředidlem pro všechny re-agencie byl 0,9% fyziologický roztok a objemovou pracovní jednotkou pro antigen a ředěné serum bylo množství 0,1 ml, pro komplement a haemolytický systém 0,2 ml.

K mikroaglutinačním testům byla sera ředěna stejným způsobem jako při reakci komplement-fixační. K naředěným serum, naneseným bakteriologickou kličkou (průměr 6 mm) na podložní sklíčko bylo přidáno stejné množství koncentrovaného antigenu a spolu dobře promíseno. Po 24 hod. inkubaci ve vlhké komůrce při 37° C jsme kapky na sklíčkách fixovali methylalkoholem a obarvili vroucím roztokem Giemsova barviva. Obarvené kapky byly prohlíženy imersním objektivem mikroskopu a pozitivita sera byla hodnocena podle množství a velikosti shluků rickettsií. Specificita aglutinací byla ověřována v kontrolní kapce (antigen + fys. roztok nebo standardní negativní serum).

K druhé části pokusu, k zjišťování možnosti transvariálního přenosu *C. burneti* bylo užito dvouročních slepic druhu Rhode Island. Po předchozím negativním serologickém vyšetření na *Q. rickettsiosu* byla zvířata infikována 1 ml 1% emulze žloutkového vaku kuřecího embrya, v němž byl pomnožen kmen *C. burneti* 1899, izolovaný v r. 1954 z hlodavce *Rattus norvegicus*.

Od infikovaných slepic, žijících ve společném výběhu se serologicky negativním kohoutem, byla odebírána snesená vejce, inkubována při 34—36° C v líně, pravidelně denně prohlížena a zjišťována fertilita a stav vyvíjejících se zárodků.

Materiál získaný z těchto zárodků i vylíhnutých kuřat byl nejdříve vyšetřen mikroskopicky na přítomnost rickettsií, potom emulgován ve fyziologickém roztoku pH 7,2 a injikován v množství 2 ml, vždy dvěma serologicky negativním morčatům vážícím přibližně 250 g. Za kritérium přítomnosti rickettsií v inokulovaném materiálu jsme považovali signifikantně zvýšené hladiny specifických protilátek a teploty (40° C) infikovaných morčat.

DOSAŽENÉ VÝSLEDKY

V dřívějších pokusech bylo Syručkem (6) zjištěno, že *Q. rickettsiosa* probíhá u slepic inaparentně. Výsledky předkládané práce tuto skutečnost potvrzují. Opětovně jsme si ověřili, že nelze vymezit jeden symptom (na př. změnu v chování, pokles váhy, nechutenství, zvýšenou tělesnou teplotu a pod.), který by zřetelně doprovázel experimentální *Q. rickettsiosu* u slepic.

Tabulka 1. Přítomnost rickettsií v krvi a trusu infikovaných slepic zjišťovaná v týdenních intervalech.

	Slepice číslo		Rickettsiemia po infekci ve dnech	C. burneti izolovaná z trusu po infekci	
				ode dne	do dne
Způsob infekce	subkutánně	1	86	14	42
		2	—	14	42
	intra perit.	3	—	14	49
	intra nas.	4	—	14	42
		5	—	14	35

Výsledky dosažené v otázce rickettsiemie a dlouhodobého vylučování původce nákazy trusem kura domácího ukazuje tabulka 1. Průměrná doba vylučování rickettsií trusem slepic je od 14. do 42. dne po infekci.

Isolovat původce nákazy z krve pokusných zvířat se nám podařilo jen v jednom případě. Tato krev však byla odebrána za podmínek, které se lišily od podmínek odběrů předchozích.

82. den po infekci jsme začali pozorovat u slepice č. 1 pokles tělesné váhy, nechutenství, celkovou ochablost a netečnost v chování. Slepice potom za stále se zhoršujícího stavu za 14 dnů uhynula. Při pitvě byl zjištěn metastasující tumor intestinální crassi. K informaci uvádíme, že pozitivní isolační pokus byl z krve odebrané 10 dní před uhynutím, že k prokázané rickettsiemii tedy došlo za 44 dnů po poslední pozitivní izolaci z trusu a že jsme ze všech vypitvaných orgánů isolovali C. burneti (játra, slezina, ledvina, plíce, vaječník, střevo, dřev kostní a nádorové masy).

Uvedené nálezy nás vedly k předpokladu, že u slepice č. 1 došlo vlivem interkurentní choroby k aktivaci latentní infekce a v důsledku toho k masivnímu pomnožení rickettsií a k výsevu do krevního oběhu.

Abychom si tento předpoklad ověřili, snažili jsme se vyvolat rickettsiemii, resp. opětovné vylučování rickettsií trusem u dvou z pěti do pokusu vzatých slepic podáváním celkového množství 250 mg Cortisonu v pětidenních dávkách 5 × 50 mg). Dvě zbývající slepice sloužily jako kontrola (Cortison nedostaly).

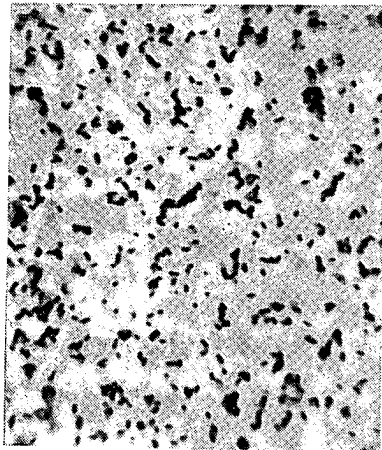
Čtvrtý den po první injekci Cortisonu objevil se u slepic průjem. Od tohoto dne jsme po dobu 3 týdnů 4krát vyšetřovali krev a trus na přítomnost rickettsií, avšak výsledek všech izolací byl negativní. Tento pokus považujeme ovšem jen za hrubě orientační a uvádíme jej jen pro úplnost.

V otázce dlouhodobého přežívání rickettsií v orgánech nemocných zvířat bylo zjištěno, že rickettsie je možno prokázat ještě za pět měsíců po infekci.

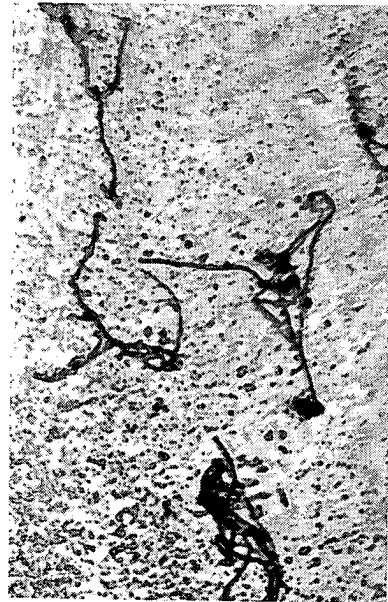
Výsledky periodického serologického vyšetřování pokusných slepic ukázaly, že komplement-fixační látky se začínaly tvořit začátkem 3. týdne po infekci; že dosáhly nízkých títů (maximální titer byl 1 : 16) a že 40. den již hladina protilátek vymizela.

Výsledky druhé části pokusu, v níž byla zjišťována možnost přenosu C. burneti vejci experimentálně infikovaných slepic, znázorňuje tabulka 2. Z ní je patrné, že infikované slepice snesly v rozmezí 19—42 dnů celkem 13 oplozených vajec. Z tohoto počtu podařilo se izolovat C. burneti ze žloutkového vaku vyvíjejícího se kuřecího embrya celkem v šesti případech.

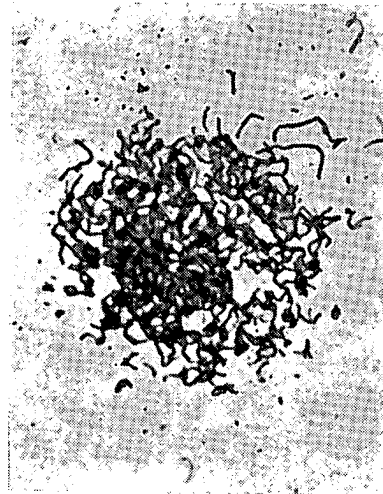
M. Suchanová - J. Patočka
POKUS O DOSAŽENÍ L FOREM LISTERIA MONOCYTOGENES



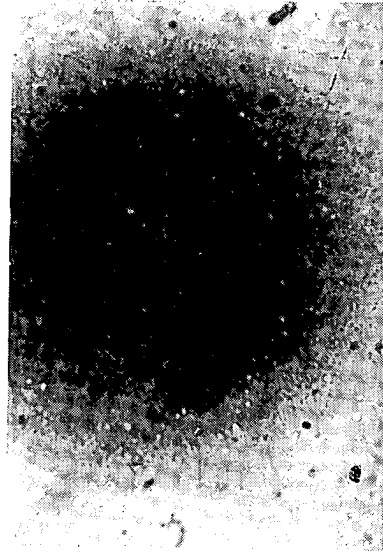
Obr. 1.



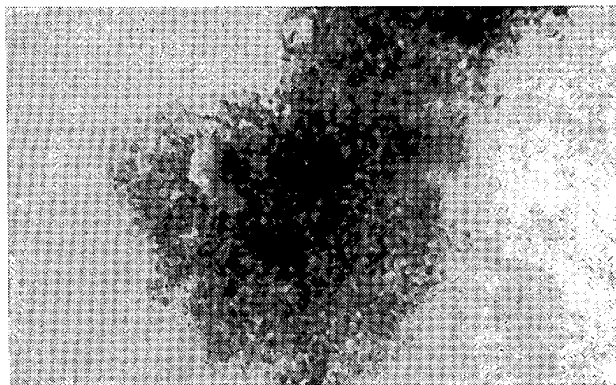
Obr. 2.



Obr. 3.



Obr. 4.



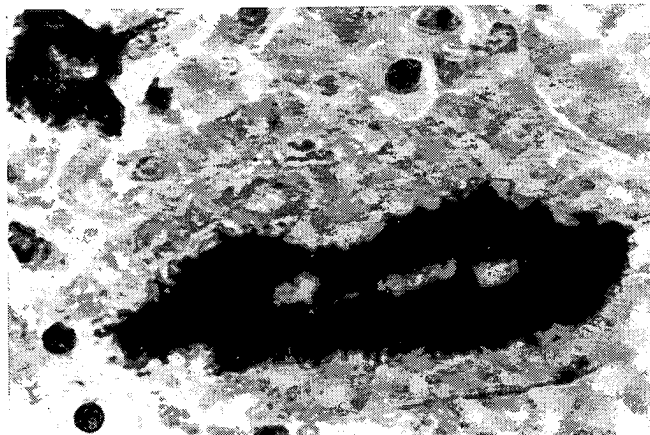
Obr. 5.



Obr. 6.

J. Vošta

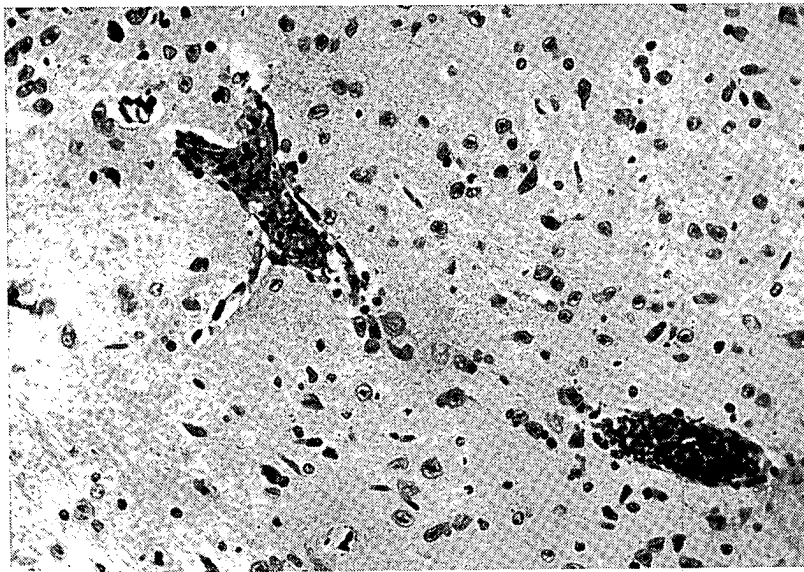
ONDATRA PIŽMOVÁ RESERVOÁREM LEPTOSPIR V ČSR



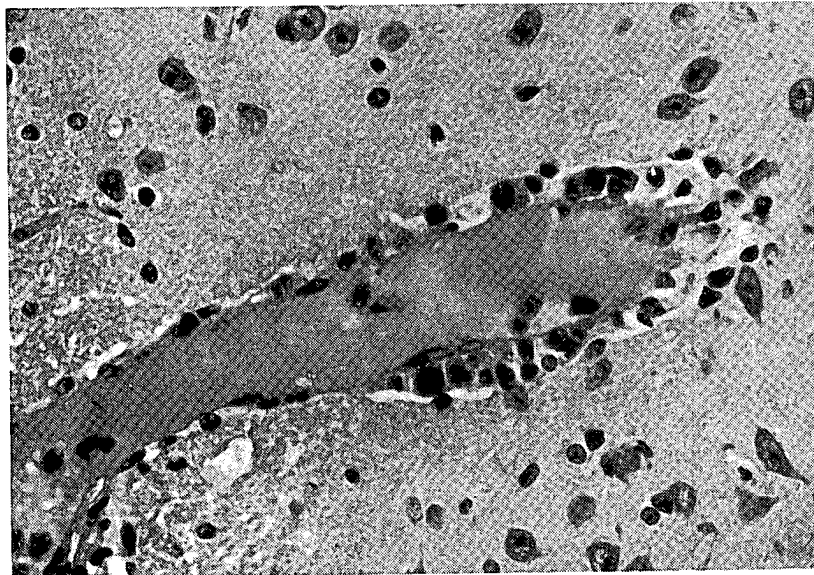
Obr. 1. Leptospiry na postříbřeném řezu ledvinami ondatry (Dobellova metoda, 1200X)
Foto J. Vošta

Mornsteinová-Albrecht

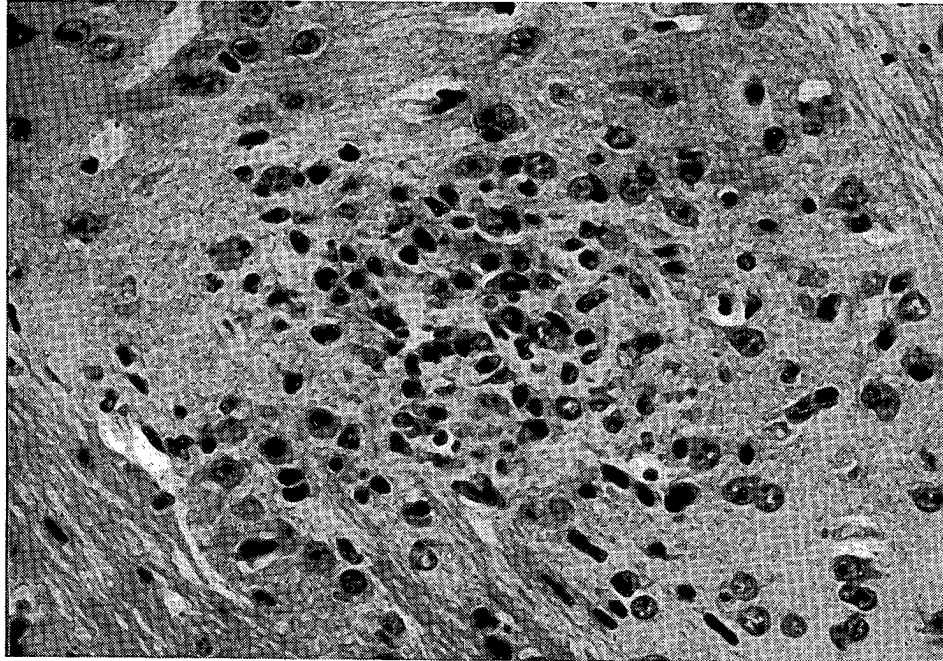
EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE MYŠKY MICROMYS MINUTUS VIRUSEM ČS. KLÍŠTOVÉ
ENCEFALITIDY



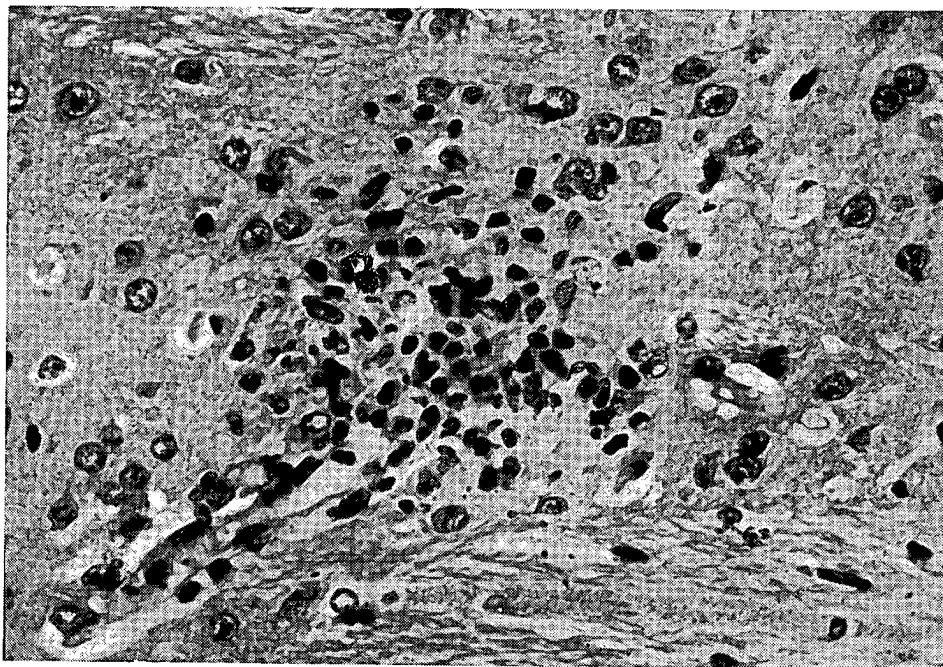
Obr. 1. Zmnožení endoteliálních buněk a pericytů mozkových cév u *Micromys minutus*.
Haematoxylin-eosin, 100 X.



Obr. 2. Perivaskulární infiltrát lymfocytů a plasmacytů v mozku. Haematoxylin-eosin, 400 X



Obr. 3. Zápalový infiltrát a destrukce mozkové hmoty. Haematoxylineosin, 400X.



Obr. 4. Zápalový infiltrát ve spojení s poškozenou kapilárou. Haematoxylin-eosin, 400X.

Tabulka 2.

Slepice číslo	Inokulovaný materiál					Isolace C. burneti z inok. mat.	Poznámka	
	Vejce		žloutkový vak		slezina a játra a) vylíhnutých kuřat b) kuřečích embryí			
	č.	snesené po infekci za	stáří ve dnech	mikro- skop. nález rickettsii	stáří ve dnech	mikro- skop. nález rickettsii		
1	1	21 dní	18	—			+	
	2	29 dní			55 a)	—	+	
	3	31 dní	14	—			—	
	4	37 dní	18	—			—	
	5	38 dní	14	—			+	
2	1	19 dní	14	—	14 b)	—	+	
	2	20 dní	14	—	14 b)	—	+	
	3	22 dní			2 a)	—	+	paresy dolních končetin
	4	29 dní	16	—			—	
	5	36 dní	20	—			+	20. den vý- voje embryí uhynulo
	6	37 dní	14	+			+	
	7	38 dní				48 a)	—	°
	8	42 dní				3 a)	—	+

Ve třech případech byl pokus o izolaci negativní.

Z parenchymatosních orgánů vyvíjejících se embryí zdařila se izolace rickettsii ve dvou případech a v orgánech vylíhnutých kuřat, ponechaných na živu za normálních podmínek dva až padesát pět dnů, byla přítomnost zjištěna ve třech případech.

Jeden pokus o izolaci v této skupině byl negativní.

Dvě vylíhnutá kuřata s pozitivní izolací C. burneti jevila známky méněcennosti oproti kuřatům, která se vylíhla z vajec normálních slepic. Jednalo se o paresy končetin a celkový opožděný a nedokonalý vývoj.

DISKUSE

Ve své experimentální práci jsme se snažili objasnit úlohu kura domácího (*Gallus gallus domesticus*) v procesu šíření Q rickettsiosy.

Dosažené výsledky ukázaly, že kur domácí je vůči infekci *Coxiella burnetii* vnímavý. Onemocnění probíhá inaparentně a *C. burnetii* přežívá dlouhou dobu v orgánech infikovaných slepic.

Zejména je pozoruhodné dlouhodobé vylučování původce nákazy trusem a jeho přenos transovariální cestou.

Je známo, že *C. burnetii* je značně odolná vůči nepříznivým zevním vlivům, a že se může v suchém prostředí (na př. prach a pod.) udržet dlouhý čas plně virulentní.

Je tedy dobře možné šíření nákazy i zaschlým trusem infikovaných slepic. Průkaz rickettsií ve vejcích infikovaných slepic ukazuje na další článek přenosu *Q rickettsiosy*.

Jsme si ovšem vědomi, že masivní infekční dávka, které bylo v pokusech užito, neodpovídá plně přirozeným podmínkám. Rovněž počet provedených pokusů je dosud nedostatečný. Předkládáme proto toto sdělení jen jako prvou část výsledků získaných při výzkumu úlohy kura domácího v epidemiologii a epizootologii *Q rickettsiosy*.

S O U H R N

Autor se pokusil pomocí experimentální infekce kura domácího prokázat jeho úlohu v epidemiologii a epizootologii *Q rickettsiosy*.

V první části pokusu byla zjišťována u slepic doba persistence *C. burnetii* v jejich orgánech a doba vylučování rickettsií trusem těchto zvířat.

Výsledky pokusu ukázaly, že *Q rickettsiosa* probíhá u experimentálně infikovaných slepic bez klinických symptomů a že rickettsie byly trusem vylučovány průměrně od 14. do 42. dne po infekci.

Z krve pokusných zvířat se podařilo izolovat *C. burnetii* jen v jednom případě a to u slepice, která během pokusu onemocněla metastasujícím nádorem tlustého střeva.

Dále bylo zjištěno, že původce nákazy přežívá v orgánech po dobu pěti měsíců po experimentální infekci.

Výsledky serologického vyšetření ukázaly, že komplement fixační protilátky se začaly tvořit začátkem třetího týdne po infekci a že dosáhly jen nízkých titrů. Čtyřicátý den po infekci nebylo je už možno v seru prokázat.

V druhé části této práce byl proveden pokus o izolaci *C. burnetii* z třinácti oplozených vajec snesených slepicemi v době od 19. do 42. dne po experimentální infekci.

Z tohoto počtu podařilo se izolovat *C. burnetii* ze žlutkových vaků vyvíjejících se kuřecích zárodků celkem v šesti případech. Třikrát byl pokus o izolaci negativní.

Z parenchymatósniých orgánů (slezina, játra) embryí se zdařila izolace ve dvou případech.

V orgánech čtyř vylihnutých kuřat, nechaných na živu od 2 do 55 dnů, byla přítomnost rickettsií zjištěna ve třech případech. Jeden pokus o izolaci byl negativní.

Tím autor prokázal v pokusných podmínkách transovariální přenos *C. burnetii* u slepic.

V závěru autor diskutuje o důsledcích této možnosti v koloběhu *Q rickettsiosy* v přírodě.

Р Е З Ю М Е

Экспериментальная инфекция кур (*Gallus gallus domesticus*) *R. burnetii*

Автор попытался доказать при помощи экспериментальной инфекции кур роль кур в эпидемиологическом и эпизоотологическом процессах *Ку риккеттсиоза*.

В первой части опыта устанавливалось время персистенции *C. burnetii* в органах кур и время выделения риккеттсий с их пометом. Результаты опыта показали, что *Ку риккеттсиоз* протекает у экспериментально зараженных кур без клинических признаков и что риккеттсии выделялись с пометом в среднем с 14-ых по 42-ые сутки после инфекции.

Из крови подопытных птиц удалось изолировать *C. burnetii* лишь в одном случае, и это случилось у курицы, которая заболела во время опыта метастазирующим опухолем толстой кишки.

Далее было установлено, что возбудитель инфекции сохраняется в органах через пять месяцев после экспериментальной инфекции.

Результаты серологического исследования показали, что противотела связывающие комплемент начали образоваться с начала третьей недели после заражения и что они достигли лишь низких титров. В 40-ой день после инфекции уже нельзя было доказать их наличие в сыворотке.

Во второй части этой работы была сделана попытка изолировать *C. burneti* из 13 оплодотворенных яиц, снесенных курами в период с 19-ых по 42-ое сутки после экспериментальной инфекции.

Из этого числа удалось выделить *C. burneti* из желточных мешков развивающихся куриных эмбрионов в общем в шести случаях. Три раза была изоляционная попытка негативной.

Из паренхиматозных органов эмбрионов (селезенка, печенка) изоляция удалась два раза.

В органах четырех цыплят, оставленных при жизни в пределах от двух до 55 суток, наличие риккетсий было обнаружено в трех случаях. Одна изоляционная попытка была отрицательна.

Этим автор доказал в экспериментальных условиях трансвариальную передачу *C. burneti* у кур.

Заключительная дискуссия посвящена последствиям этой возможности для циркуляции *Cu* лихорадки в природе.

S A M M A R Y

Experimental Infection of the Domestic Fowl (*Gallus gallus domesticus*) with *Rickettsia burneti*

The author tried to prove the rôle of the domestic fowl in the epidemical and epizootical process of Q rickettsiosis with help of experimental infection.

In the first part of the experiment the period of persistence of *Coxiella burneti* was investigated in organs of the fowl, and the period of excretion of rickettsiae through their faeces.

The results of the experiment have shown that Q rickettsiosis in experimentally infected hens passes without clinical symptoms and that rickettsiae are excreted through faeces on an average since the 14th to the 42nd day after infection.

The isolation of *C. burneti* from blood succeeded in one case only, namely in a hen which fell ill with metastizing tumour of the colon during the experiment.

Further, it was found that the agent persists in organs during the first five months following the experimental infection.

The results of serologic investigations have shown that the antibodies fixing the complement have been formed at first on the beginning of the third week after infection and that they reached only low titres. On the fourtieth day after infection they could not be proved in the serum.

In the second part of our experiment we tried to isolate *C. burneti* from thirteen fertil eggs laid by hens during a period from the 19th to the 42nd day after experimental infection.

Out of this number *Rickettsia burneti* was isolated from egg yolks of developing chicken embryo altogether in six cases. The attempt for isolation was threetimes negative.

The isolation from parenchymatous organs (spleen, liver) succeeded in two cases.

The presence of rickettsiae was proved in three from four borne chicken left alive from 2 to 55 days; one attempt for isolation was negative.

By this, the author has proved a transovarial transmission of *C. burneti* in hens under experimental conditions.

Finally, the author is discussing the consequences of such a possibility for the circulus of Q rickettsiosis in the nature.

L I T E R A T U R A

1. Advance in the Control of Zoonoses, WHO Monograph series, No 19, Geneva 1953. —
2. Babudieri, B., Moscovici, C.: Nature London, 1, 195, 1952. — 3. Babudieri, B., Suzzi-Valli, E.: R. C. 1st sup. San. 14, 430, 1951. — 4. Raška, K., Syrůček, L.: Sborník prac. konference o ohniskových nákazách, Bratislava, 1945 (v tisku). — 5. Syrůček, L., Raška, K.: Bull. Wld. Hlth Org. 1956, 15, 329—337. — 6. Syrůček, L.: Čs. epidemiologie, mikrobiologie, immunologie 4, 196, 1955. — 7. Stoker, M. G. P.: Písemné sdělení 1955. — 8. Siebert, R. et all.: Zbl. Bakter. Orig. 157, 309, 1951.

Čs. epidemiologie,
mikrobiologie, imunologie
VI - 3 - 1957

Ústav epidemiologie a mikrobiologie v Praze, ředitel prof. MUDr. Karel Raška

VÝSKYT ORNITHOSY A SALMONELLOSY U RACKA CHECHTAVÉHO (LARUS RIDIBUNDUS L.)

I. epidemiologická vyšetřování*)

VLADIMÍR ŠERÝ a JURAJ STRAUSS

V epidemiologii některých nákaz hrají ptáci významnou úlohu. Ve Spojených státech jsou považováni (5, 6, 7) za nejdůležitější zdroj salmonell. V posledních letech upozornili někteří autoři na význam ptáků při šíření Q horečky (Raška, Syruček, Havlík, Lím (45, 46), Babudieri a spol. (2, 3) a mimo jiné bylo také sledováno i jejich uplatňování v epidemiologii virusových encefalitid (26, 30, 32, 33, 35).

Mezi ptáky epidemiologicky významné je možno počítat racky pro jejich způsob života, pestrost přijímané potravy, která se mnohde skládá z velké části z odpadků a zdechlin. Jsou rozšířeni na celém světě a při svém tisícikilometrovém putování mohou přijít do styku s různými ptáky a zvířaty. Závažná u nich může být i dlouhodobá persistence původců některých nákaz po odeznění akutní fáze.

Častým nálezem u racků jsou salmonelly.**) Van Dorsen (49) isoloval z racka bouřního (*Larus canus* L.) v okolí Utrechtu *S. typhi* murium, Jansen (11, 12, 13) v souvislosti epizootií v kachních farmách rovněž *S. typhi* murium, Adams (1) isoloval z racka bouřního *S. typhi* a Steiniger s Hahnem (40) na Schleimünde *S. typhi*, *S. typhi* murium a *S. thompson*. Kumerloeve a Steiniger (16) prokázali v okolí zamořených přístavů u racka stříbřitého *S. paratyphi* B a *S. typhi* murium. Steiniger a Hahn (40) popisují onemocnění salmonellosou u lidí, kteří sbírali vejce racka stříbřitého v okolí Flensburgu. Také Schmidt (34) zjistil *S. typhi* murium u racků chechtavých a bouřních při jejich hromadném hynutí na ostrově Riems. Steiniger a Hahn (40) popisují nález *S. typhi* ve vejcích racka chechtavého v blízkosti Eutinu a izolaci *S. paratyphi* B, *S. typhi* a *S. panama* z trusu racka žlutoohného (*Larus fuscus* L.) v okolí Svarthallar ve Švédsku.

Virus ornithosy isoloval v roce 1947 Meyer a Eddie (22, 23) z racka stříbřitého (*Larus argentatus smithsonianus*). Mezi dalšími nálezy u racků stojí za povšimnutí průkaz lyssy v Anglii (21).

Během epidemiologického vyšetřování v několika drůbežárnách upoutali naši pozornost rackové chechtaví, kteří u nás místy hnízdí v tisícových koloniích. Vzhledem k tomu, že jsme byli svědky jejich těsného soužití s kachnami, u nichž byla zjištěna ornithosa a nákaza *S. typhi* murium, i vzhledem k dalším epidemiologickým souvislostem, pokusili jsme se objasnit jejich epidemiologický význam.

POSTUP VYŠETŘOVÁNÍ

V kachní farmě v B. ve východních Čechách se vyskytly v poslední době u zaměstnanců 3 případy onemocnění ornithosou a v sousední farmě 3 případy onemocnění *S. typhi* murium v rodině jednoho zaměstnance. U některých mladých kachen byly zjištěny v jarních měsících příznaky typické pro ornithosu (15, 47, 48) a z trusu určitého počtu kachen byla opakovaně izolována *S. typhi* murium.

*) Při epidemiologickém vyšetřování spolupracoval Dr. Kleinbauer, Dr. Urbášková-Krátká (KHES Pardubice), Dr. W. Černý (Biologická fakulta KU), J. Křížová a M. Frič (ÜEM).

**) Už v roce 1952 isoloval Dr. F. Procházka v jižních Čechách *S. typhi* murium z uhynulých racků chechtavých. (Nepublikované sdělení.)

Tabulka 1. Přehled bakteriologického a virologického vyšetření racků.

Rackové		Celkový počet vyšetřených racků	Isolace			
			S. typhi murium		virusu ornithosy	
			Bakteriologicky vyšetřeno	Posit. nález	Počet vyšetřených racků v isolačních pokusech	Positiv. izolace
Mladí	Chycení	25	25	21 b) d)	11	1 a) b) c)
	Uhynulí	11	11	9 b) d)	2	0
Jednoroční (chycení)		2	2	1	1	0
Dospělí (chycení)		2	2	0	1	0
Celkem		40	40	31	15	1

- a) Positivní izolace virusu ornithosy ze směsi slezin a jater 2 racků.
 b) Nekrosy v játrech u některých vyšetřovaných racků.
 c) Ložiskové peribronchiální nekrosy u jednoho vyšetřovaného racka.
 d) Nápadně zvětšená slezina u některých vyšetřovaných racků.

Při epidemiologickém vyšetřování, které jsme prováděli v uvedené drůbežárně v červnu, pozorovali jsme zejména v době krmení, že se mezi kachny slétala celá hejna racků. Toto zjištění bylo podnětem k průzkumu hnízdišť racků na nedalekém rybníku, který je přírodní rezervací. V okolí kolonií jsme našli velký počet uhynulých mláďat několik týdnů starých. Mimoto jsme zjistili na plovoucích ostrovech a v rákosí větší počet zřejmě nemocných, značně vyhublých mladých racků, kteří se dali snadno chytit. Na některých byla nápadná atrofie svalstva a hnědozelený průjem.

Při pitvě racků nebyly pozorovány nápadnější změny na orgánech, pouze u několika byla zjištěna značně zvětšená slezina, známky zánětu střev a u 5 pitvaných mláďat, žlutavá nekrotická ložiska v játrech.

Celkem bylo vyšetřeno 40 racků, z nichž 36 bylo mladých ve stáří 2–8 týdnů, dva byli jednoroční a dva dospělí. S. typhi murium byla izolována ze sleziny a střevního obsahu 30 mladých a jednoho jednoročního racka. (Celkem tedy u 77 % vyšetřovaných.) Z makroskopicky patrných nekrotických ložisek v játrech byla izolována rovněž S. typhi murium v čisté kultuře. V histologických preparátech byla patrna v okolí nekros jen slabá mononukleární reakce a v nekrotických masách zjištěny shluky bakterií. Ve žlutavém výtoku, který slepoval oční víčka jednoho racka, byly nalezeny vedle buněčných elementů Gram pozitivní koky.

Pokus o izolaci virusu ornithosy na bílých myškách byl proveden u 15 racků, jejichž orgánů (slezin, jater, ledvin, plic) bylo použito ke 14 isolačním pokusům. Isolace virusu, který byl identifikován (43), se zdařila ze směsi slezin a jater dvou mladých racků při současném nálezu S. typhi murium. (Tab. 1.) V histologických preparátech z orgánů těchto racků byly zjištěny makroskopicky neviditelné nekrosy v játrech a v plicích, ojedinělé ložiskové peribronchiální nekrosy s chabou okolní reakcí mononukleárů. Na otiskových preparátech sleziny obarvených podle Macchiavelliho byla patrna elementární tělíska.

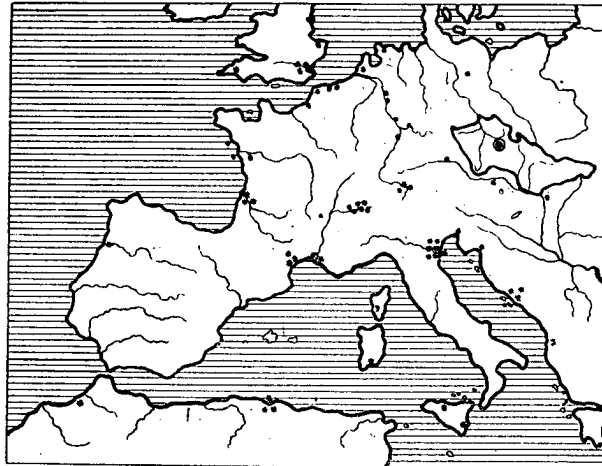
Po zjištění nálezů u racků v rezervaci B. jsme rozšířili epidemiologické vyšetřování na hnízdiště racků v jiných krajích. V jednom jihočeském okrese v kachní farmě K. jsme odhalili právě doznívající onemocnění ornithosou u 3 ošetřovatelů kachen, která byla potvrzena serologicky. U některých kachen jsme zjistili příznaky charakteristické pro ornithosu. (15, 47, 48). Pokus o izolaci virusu u těchto dvou kachen se však nezdařil. V této farmě byla v posledních letech zjišťována při pravidelném vyšetřování kachního trusu S. typhi murium. Poblíž farmy K. jsou na rybníkách hnízdiště několika tisíc racků chechtavých, která však při naší návštěvě

byla už téměř opuštěna. V červnu a začátkem července bylo pozorováno také v této oblasti masové hynutí mladých racků. Ze střevního obsahu a sleziny jednoho mrtvého racka byla izolována *S. typhi murium*. Při dalším epidemiologickém vyšetřování bylo zjištěno, že s hynutím racků pravděpodobně souvisela i epizootie v nedaleké výkrmně vepřů, do níž mohla být trusem racků zanesena *S. typhi murium*. V časové souvislosti potom došlo na několika místech jiného kraje k výskytu onemocnění u lidí, kteří požíli výrobky z masa těchto vepřů.

DISKUSE

Hromadné hynutí mladých racků je často zjišťováno v různých zemích, jeho příčiny však nebyly vyšetřovány komplexně. Někteří ornithologové uvádějí, že v prvním roce, zvláště v prvních dnech života zahyne až 75 % racků [Steinbächer,

Mapa 1. Nálezy kroužkovaných racků z vyšetřované přírodní rezervace v B.



● Přírodní rezervace v B.

* Nález racka kroužkovaného v rezervaci v B.

Makatsch]. (20, 37) Smrtnost od prvního roku je podle Stadieho (36) již jen 10 až 15 %. Z bakteriologů na př. Schmidt (34) označil *S. typhi murium* za původce hromadného hynutí mladých racků na ostrově Riems. Také námi sledovaná epizootie a hynutí mladých racků bylo asi především způsobeno *S. typhi murium*, jak se dá soudit podle izolací této salmonelly u 77 % vyšetřovaných racků. Pro poměrně malý počet pokusů o izolaci viru ornithosy, nelze zatím posoudit, v jaké míře se tento virus uplatňoval při popsané epizootii. Hynutí mohou zřejmě podporovat i některé nepříznivé vlivy prostředí, jako nedostatek potravy, chladné počasí, po případě další přidružené nákazy.

Racek chechtavý u nás hnízdí na některých rybnících v tisícových koloniích v době, která odpovídá největší produkci v líních našich drůbežáren. Při dnešní snaze o zakládání kachních farem na rybnících v zájmu zvýšení výnosnosti rybníčního hospodářství, stává se otázka ohrožení kachen volně žijícím ptactvem aktuální, zejména při těsném soužití, které můžeme místy pozorovat hlavně mezi kachnami a racky.

Z mapky 1 sestavené Černým je patrné, kde byli chyceni rackové okroužkovaní v posledních letech v námi sledované rezervaci. Podle těchto nálezů mohou přicházet rackové do styku s různými druhy ptáků, zejména na mořském pobřeží,

v deltách velkých řek a na velkých jezerech ve Švýcarsku. Steiniger se domnívá, že k nákaze racků salmonellami dochází zejména ve vodách při pozření odpadků bohatých na bílkoviny, které skýtají dobrou živnou půdu pro pomnožení bakterií.

Rackové se mohou stát jednak zdrojem nákazy pro drůbež, jednak se mohou při těsném styku s drůbeží sami nakazit salmonellosou nebo ornithosou. To pak přispívá k udržování nákaz v blízkosti kachní farmy, protože se rackové každoročně vrací do míst svých starých hnízdišť.

Bude třeba dalšího komplexního vyšetření, abychom mohli dokonale objasnit epidemiologické souvislosti v okolí hnízdišť racků. Už nyní však můžeme upozornit na závažnost zakládání kachních farem v blízkosti kolonií racků nebo dokonce přímo v přírodních rezervacích. Naše zjištění by však mělo být bráno v úvahu i při zakládání jiných chovatelských zařízení.

S O U H R N

Při epidemiologickém vyšetřování v jedné farmě, kde byla zjištěna u zaměstnanců i u kachen ornithosa a u kachen zároveň i *S. typhi murium*, upoutala pozornost autorů hejna racků, kteří se dostávali do těsného styku s kachnami. Při průzkumu jejich hnízdišť na nedalekém rybníku bylo zjištěno hromadné hynutí mláďat. Ze sleziny a trusu 31 (77 %) racků ze 40 vyšetřovaných byla izolována *S. typhi murium*. Isolační pokusy na bílých myškách byly prováděny z orgánů 15 racků. Ze směsi sleziny a jater dvou mladých racků chechtavých (*Larus ridibundus* L.) při současně izolaci *S. typhi murium*, byl izolován virus, který byl identifikován jako virus ornithosy.

Na podkladě epidemiologického vyšetřování upozorňují autoři na ohrožení chovů drůbeže salmonellosami a ornithosou v blízkosti hnízdišť racků chechtavých.

Р Е З Ю М Е

Орнитоз у салмонеллоз у обыкновенной чайки (*Larus ridibundus* L.).

1. Эпидемиологическое исследование

Во время эпидемиологического исследования на одной ферме, на которой был обнаружен орнитоз у трудящихся и у уток, а у уток вместе с тем также *S. typhi murium*, внимание авторов привлекли слеты чаек, соприкасающаяся с утками. Обследуя их гнезда на недалеком пруду, авторы обнаружили, что молодые чайки погибали массами. Из селезенки и помета 31 чайки из 40 исследованных была выделена *S. typhi murium*. Изоляционные опыты на белых мышах совершались из органов 15 чаек. Из смеси селезенки и печени двух молодых обыкновенных чаек (*Larus ridibundus* L.), при совместной изоляции *S. typhi murium*, был выделен вирус, который был установлен как вирус орнитоза.

На основании эпидемиологического исследования авторы обращают внимание на угрожаемость птицеводства салмонеллозами и орнитозом вблизи гнездовий обыкновенных чаек.

S U M M A R Y

The Incidence of Ornithosis and Salmonellosis in the Black-Headed Gull (*Larus ridibundus* L.)

I. Epidemiological Investigations

While making epidemiological investigations on a poultry farm where ornithosis had been confirmed in employees and, at the same time, a combined infection of ornithosis and *Salmonella typhi murium* in ducks, the attention of the authors was called to flocks of Black-Headed gulls, which came into close contact with the ducks. On investigating their nesting grounds in the vicinity of a not very distant pond, perishing of the young en masse was discovered. *Salmonella typhi murium* was isolated from the spleen and faeces of 31 of the 40 gulls examined, i. e. of 77%. Fourteen isolation experiments were made on white mice from the organs of 15 gulls. Simultaneously with isolating *Salmonella typhi murium* from a mixture of spleen and liver of two young gulls (*Larus ridibundus* L.) a virus was isolated which was identified as the virus of ornithosis.

On the basis of their epidemiological investigations the authors call attention to the danger of salmonellosis and ornithosis infections in poultry farms situated in the vicinity of the breeding places of the Black-headed gull.

L I T E R A T U R A

1. Adams (cit. podle Van Dorsena): Tijdskr. Diergeneeskd., 62, 1263, 1935. — 2. Babudieri, B., Moscovici, C.: Nature, 1, 195, 1952. — 3. Babudieri, B., Suzzi Valli, E.: R. C. Ist. Sup. San., 14, 470, 1953. — 4. Castellani, A., Chalmers: Man. Trop. Med., 3 rd ed. 939, 1919. — 5. Edwards, P. R.: Kentucky Agr. Exp. Sta. Bull. 320, 1932. — 6. Edwards, P. R.: Kentucky Agr. Exp. Sta. Bull. 400, 43, 1940. — 7. Edwards, P. R. a spol.: Centr. Agr. Sta. Bull., 499, 1947. — 8. Fallet, G. H.: L'ornithose, Masson Paris 1951. — Haagen, E., Mauer, G.: Zbl. Bakter. Orig. 143, 81, 1938. — 10. Haagen, E., Mauer, G.: Dtsch. med. Wschr. 65, 808, 1838. — 11. Jansen, J.: Z. Infektionskh. d. Hausteire, 52, 11, 1938. — 12. Jansen, J.: Tijdskr. Diergeneeskd. 65, 435, 1938. — 13. Jansen, J.: Z. Hyg., 122, 418, 1940. — 14. Konrád, J., Strauss, J.: Časopis lékařů českých, 16, 413, 1955. — 15. Kubásek, M., Strauss, J.: Referát na sjezdu o anthroozoonosách, Praha 1956. — 16. Kumerloeve, H., Steiniger, F.: Dtsch. tierärztliche Wschr. 39, 313, 1952. — 17. Lichačev, N. V., Ušakov, A. A.: Ornitoz — Bolezni ptic, tom I., 1951. — 18. Le Blaye, Guggenheim: Manuel Pratique de Diagnostic Bacteriologique, 1914. — 19. Lerche, M.: Tierärztliche Rundschau, 44, 713, 1938. — 20. Makatsch, W.: Die Lachmöwe, Leipzig 1952. — 21. Mc Menemy: Ústní sdělení. — 22. Meyer, K. F.: Psittacosis-Lymphogranuloma group in Viral and rickettsial infections of man, edited by T. M. Rivers, J. B. Lipincott Comp. 338, 1948. — 23. Meyer, K. F.: Psittacosis and ornithosis in Diseases of Poultry edited by H. E. Biester and L. H. Schwarte, ed. 2, Ames, Iowa, 313—549, 1948. — 24. Meyer, K. F., Eddie B.: Science 79, 546, 1934. — 25. Meyer, K. F., Eddie B.: Acta trop., 9, 204, 1952. — 26. Moskvín, I. A.: Dokl. An. SSSR, 28, 1940. — 27. Nocard: Cons. Hyg. Pub. Solubr. Dep. Sene, Sénce, Mars 24, 1f83. — 28. Olitsky, K., Casals, J.: Viral Encephalitis in Viral and rickettsial infections, edited by Rivers T. M., 165, 1955. — 29. Pattyn, S. R. a spol.: Bull. W. H., 12, 581, 1955. — 30. Pavlovskij, J. N.: Parazitolog. Dal. Vostoka, Moskva 1947. — 31. Rasmussen-Ejde, R. K.: Zbl. Bakter. I. Orig., 143, 89, 1938. — 32. Raška, K.: Epidemiologie (II. vyd.), Praha 1954. — 33. Raška, K. a spol.: Českoslov. klíšťová encefalitis, Praha 1954. — 34. Schmidt, U.: Zbl. Bacter. I. Orig., 160, 487, 1953. — 35. Solov'ev V. D.: ŽMEI, 4, 1941. — 36. Stadie (cit. podle Makatsche). — 37. Steinbacher (cit. podle Makatsche). — 38. Steiniger, F.: Schleswig-holst. Ärztebl. 2, 163, 1949. — 39. Steiniger, F.: Zbl. Bakter. I. Orig. 157, 52, 1951. — 40. Steiniger, F., Hahn, F.: Acta Pathol. microbiol. scand., 4, 401, 1953. — 41. Strauss, J.: Referát na sjezdu o anthroozoonosách, Praha 1956. — 42. Strauss, J.: Čs. epidemiologie, mikrobiologie, imunologie, 6, 281, 1956. — 43. Strauss, J., Bednář, B., Šerý, V.: Dosud nepublikováno. — 44. Šírobek, W.: Dtsch. med. Wschr. 79, 176, 1954. — 45. Syrůček, L., Raška, K., Havlík, O., Lím, D., Manych, J.: Čs. hygiena, epidemiologie, mikrobiologie 4, 199, 1955. — 46. Syrůček, L., Raška, K., Havlík, O.: Čs. hygiena, epidemiologie, mikrobiologie 4, 22, 1955. — 47. Šerý, V., Kleinbauer, V., Strauss, J.: Referát na sjezdu o anthroozoonosách, Praha 1956. — 48. Šerý, V., Strauss, J., Frič M., Kleinbauer, V.: Čs. epidemiologie, mikrobiologie, imunologie, 61, 24, 1957. — 49. Van Dorssen, C. A.: Tijdskr. Diergeneeskd. 62, 1263, 1935.

EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE MYŠKY MICROMYS MINUTUS VIRUSEM ČSL. KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY

D. MORNSTEINOVÁ a P. ALBRECHT

Význam různých divoce žijících drobných ssavců při šíření virusových infekcí, charakterisovaných přírodní ohniskovostí, je dobře známý. U nás byl dokázán u drobných ssavců *Apodemus flavicolis*, *Clethrionomys glareolus*, *Sorex araneus* a *Mus musculus* styk s viry klíšťové encefalidity, lymfocytární choriomeningitidy a západoamerické koňské encefalomyelitidy. (1, 2) Dosavadní práce byly zaměřeny především na důkaz přítomnosti viru isolačními a serologickými vyšetřeními. Otázky vnímavosti, případně přirozené odolnosti, koloběh viru v organismu těchto živočichů a virusonosičství — důležité s hlediska epizootologického a epidemiologického — se dosud u nás nesledovaly. K řešení těchto problémů jsme použili myšky *Micromys minutus* žijící v přírodních ohniskách klíšťové encefalidity.

MATERIÁL A METODIKA

Experimentální zvíře. Experimentovali jsme na myškách *Micromys minutus* (dále jako M. m.), které se vyskytují poměrně hojně v jižních oblastech našeho státu. Od jara do podzimu žijí ve vlhkých místech, v rákosinách. V této době přicházejí do styku s *Apodemus flavicolis*, *Sorex araneus*, *Neomys fodiens*, *Microtus arvalis*. Na podzim se stěhují do stohů, kde přezimují a kde se mohou dostat do styku s *Mus musculus*, *Microtus arvalis*. (Za tyto údaje děkujeme inž. J. Noskovi.)

Myši, kterých jsme použili k pokusům, byly chycené v přírodě z jedné lokality v podzimním období (1955). Do nacytání potřebného počtu se udržovaly v neinfekčním zvířinci za podmínek běžných pro chov bílých myší.*) Pro neobyčejnou plachost a živost byla práce s nimi dosti obtížná. Pozorovaná ojedinelá hynutí, která se vyskytla v době před zařazením do pokusů, nemohla být z důvodů kanibalismu diagnostikována. Histologické vyšetření několika mozků M. m. dalo normální histologický nále z bez patologických změn.

Virus a způsob infekce. Použili jsme viru klíšťové encefalidity »O« M 27 (isolovaný Dr. V. Bárdošem a spol. Čs. hygiena, epidemiologie, mikrobiologie, imunologie, III, 2, 1954) ve formě suspense z myších mozků, vytitrované na vnímavých bílých myších subkutánně.***) Myšky M. m. rozdělené do 5 skupin po 10 jedincích se očkovaly subkutánně suspensí po 0,01 ml obsahující množství viru < 1 LD₅₀, < 10 LD₅₀, < 100 LD₅₀, < 1000 LD₅₀. 5. skupiny — neinfikované — jsme použili jako kontroly.

Kontrola viremie. Odběr krve se prováděl krvácením z orbitálního sinusu, které myši dobře snášely a jen v ojedinelých případech vedl k jejich uhynutí. Krev se nassávala do ochlazené stříkačky a okamžitě očkovala i. c. bílým myším vážícím 10 g. Krev od jedné M. m. se očkovala vždy dvěma bílým myším.

Kontrola přítomnosti viru v mozku a způsob histologického vyšetření. Z každé myši M. m. usmrčené chloroformem se vypytlval mozek, z něhož jedna hemisféra sloužila k přípravě suspense (10%), druhá k histologickému vyšetření. Suspense z mozku se očkovala vždy na 4 bílé myši do 12 g i. c. a 0,03 ml a zbytek současně i. p. Přítomnost viru se sledovala v jedné až dvou pasážích na bílých myškách. U každé usmrčené myši se kontroloval mozek a slezina též bakteriologicky.

Polovina mozku, odebraná k histologickému vyšetření, se ihned fixovala po dobu 24 hod. v Bouinově roztoku a po odvodnění a zalití do parafinu se udělaly transversální nebo sagitální se miseriové řezy v odstupu 100–150 μ a barvily se hematoxinem a eosinem.

*) Odchyt myší provedla parasitologická skupina VÚ ČSAV.

**) K titraci a detekci viru se během celé práce používalo vysoce vnímavých myšek z farmy Děčín.

Tabulka 1. Přítomnost viru klíšť. encefalidity v krvi experimentálně infikovaných myši *Micromys minutus*.

Skupina	Množství viru, použitého-k infekci	Vyšetřené M. m. čís.	Kontrola viremie	
			po 21. hod.	po 70. hod.
1.	< 1 LD ₅₀	1.	0/2*)	0/2
		2.	0/2	0/2
2.	< 10 LD ₅₀	1.	0/2	2/2
		2.	0/2	2/2
3.	< 100 LD ₅₀	1.	0/2	2/2
		2.	0/2	2/3
4.	< 1000 LD ₅₀	1.	0/2	2/2
		2.	0/2	2/2

*) Číselník = počet uhynutých } bílých myši, infikovaných krví M. m.
Jmenovatel = počet očkovaných }

Neutralizační test. Směs virus + serum se po jednodinové inkubaci při 37° C očkovala s. c. po 0,02 ml, každé ředění na 4 myši. Kontrolní serum, odebrané před infekcí, i serum po infekci, pocházely od několika myši téže skupiny.

V Ý S L E D K Y

Průběh infekce. Ve skupině myšek, očkovaných množstvím viru < 1 LD₅₀, došlo k uhynutí 4 myšek z 10; z toho u 2 myši dokázán pozitivní bakteriologický nález*) (pravděpodobně jako důsledek odběru krve z orbity), a u 2 myši pro vyskytnuvší se kanibalismus příčina smrti se nezjistila.

Ve 2. skupině myšek, očkovaných množstvím viru < 10 LD₅₀, došlo k uhynutí 2 myši z 10. Souvislost uhynutí s etiologií klíšťové encefalidity se neprokázala.

Ve 3. skupině, očkované množstvím viru < 100 LD₅₀, nalezeny 21.—24. den po infekci 3 uhynuté myši z 10. Souvislost uhynutí se etiologií klíšťové encefalidity je možná. Nebylo však dokázáno opět z důvodů kanibalismu.

Ve 4. skupině myši, očkovaných < 1000 LD₅₀ viru, došlo k uhynutí 3 myši z 10. Virologickým vyšetřením dokázán u jedné myšky virus klíšťové encefalidity v mozku, u 2 dalších vysloveno podezření.

Myši, které přežily, se sledovaly celkem 31 dní. Během této doby nejevily zjevných chorobných příznaků.

Srovnáme-li hynutí po infekci virusem klíšťové encefalidity u myšek M. m. se souběžně infikovanými vnímavými bílými myškami, zjistíme nápadné rozdíly. Zatím co bílé myši hynou po infekci < 10 LD₅₀—< 1000 LD₅₀, a to po inkubační době 8—10 dnů, většina myšek M. m. očkovaných stejným způsobem přežívá.

Kontrola viremie. Pro poměrně malý počet myši, které jsme měli možnost zařadit do pokusu, se viremie zkoušela jen ve 2 časových obdobích, a to 21 a 70 hodin po infekci. Z každé skupiny se kontrolovaly vždy 2 myšky. Zatím co 21 hodin po infekci se nepodařilo dokázat virus v krvi, zjišťujeme jej po 70 hodinách, a to u myši očkovaných dávkou < 10 LD₅₀ i vyšší. Ve skupině myšek M. m., očkovaných < 10 LD₅₀ viru došlo v jednom případě k uhynutí obou

*) *Staphylococcus aureus haemolyticus*.

Tabulka 2. Přehled isolačních a histologických nálezů u myšek *Micromys minutus* 10. a 31. den po infekci virusem klíšťové encefalidity.

Skup.	Množství virusu použitého k infekci	10. den			31. den			NI ser. 31. den po infekci
		Vyšetř. myšky č.	Isolační nález	Histolog. vyšetření	Vyšetř. myšky č.	Isolační nález	Histolog. vyšetření	
1.	< 1 LD ₅₀	1.	nespecifický nález		1.	neg.	neg.	3
		2.	neg.	neg.	2.	neg.	neg.	
2.	< 10 LD ₅₀	1.	posit.	neg.	nedělalo se			—
		2.	posit.	neg.				
3.	< 100 LD ₅₀	1.	posit.	neg.	1.	neg.	posit.	1 996
		2.	neg.	neg.	2.	posit.	posit.	
					3.	posit.	neg.	
4.	< 1000 LD ₅₀	1.	posit.	neg.	1.	neg.	posit.	15 850
					2.	neg.	posit.	
		2.	posit.	posit.	3.	neg.	neg.	
					4.	posit.	posit.	

infikovaných bílých myši, ve druhém případě obě b. myši 13. den onemocněly s příznaky paralysy. Ve skupině s dávkou virusu < 100 LD₅₀ krev z obou myši M. m. usmrtila všechny infikované bílé myši po inkubační době 6–10 dnů, ve skupině < 1000 LD₅₀ po inkubaci 3–8 dnů. Přehled o tom podává tab. 1.

Přítomnost virusu klíšťové encefalidity a histologické změny v mozku myšek M. m. 10. den po infekci.

Z každé skupiny se vyšetřovaly 2 myšky M. m. současně isolačně i histologicky. V 1. skupině myši (< 1 LD₅₀) virus nebyl izolován, ani se nedokázaly histologické změny v mozku. Ve 2. skupině (< 10 LD₅₀) suspense z mozku jedné myšky M. m. usmrtila jednu z infikovaných bílých myši a u další vyvolala po 14 dnech onemocnění; ve druhém případě uhynula v 1. pasáži 1 bílá myš ze 4 infikovaných. Ve 2. pasáži byl prokázán z uhynutých bílých myši virus klíšťové encefalidity. Histologický nález byl u obou vyšetřovaných myšek M. m. negativní. Ve 3. skupině (< 100 LD₅₀) vedla suspense mozku jedné myšky M. m. k uhynutí všech 4 infikovaných bílých myši, vyšetřovaný mozek z druhé myši M. m. téže skupiny onemocnění na bílých myších nevyvolal. Histologické vyšetření obou myšek M. m. bylo negativní. Konečně vyšetření myšek M. m. ze 4. skupiny (< 1000 LD₅₀) vedlo v jednom případě s negativním histologickým nálezem v mozku k uhynutí 3 ze 4 očkovaných bílých myši, ve druhém případě s pozitivním histologickým nálezem v mozku myšky M. m. k uhynutí všech 4 očkovaných bílých myši (viz tab. 2).

V případě s pozitivním histologickým nálezem šlo o lehké zmnožení endoteliálních a adventiciálních buněk některých kapilár a venul mozku (obr. 1). V žádném případě nedokázáno bakteriální znečištění.

Positivní isolační nálezy virusu v mozku, provázené negativním histologickým obrazem, souvisejí pravděpodobně s transportem virusu do mozku ve vire-

mickém období, aniž zatím došlo k většímu uchycení virusu v samotné mozkové tkáni.

Přítomnost virusu klíšťové encefalitidy a histologické změny v mozku myšek *M. m.* 31 dní po infekci.

Stejným způsobem prováděné isolační a histologické vyšetření jako výše dalo tyto výsledky: V 1. skupině vyšetřovaných myši *M. m.* ($< 1 LD_{50}$) nedokázán ani virus ani histologické změny v mozku. Vyšetření 2. skupiny se z technických příčin neprovádělo. Ve 3. skupině ($< 100 LD_{50}$) izolován ve 2 případech ze 3 virus, při čemž histologické změny v mozku zjištěny v 1 případě s pozitivním isolačním nálezem a v 1 případě s negativním isolačním nálezem. Ve 4. skupině ($< 1000 LD_{50}$) ze 4 vyšetřovaných myši *M. m.* v 1 případě dokázán virus v mozku současně s pozitivním histologickým nálezem. U 3 dalších myšek, kde se nepodařila izolace virusu, dokázány u 2 zápalové histologické změny (tab. 2.)

Histologicky pozitivní případy jsou charakterisovány vcelku mírnými změnami, které postihují kapiláry, venuly anebo ložiskovitě mozkovou tkáň. Jsou co do počtu i rozsahu skromné, přítomné jen v některých sériových řezech. Vaskulární změny spočívající v proliferaci endoteliálních buněk a pericytů s exsudací lymfocytů a plasmatocytů do perivaskulárních prostor (obr. 2). V samotné mozkové tkáni tvoří proliferovaná glia spolu s plasmatocyty a lymfocyty infiltráty malého rozsahu, nervové buňky a základná hmota v těchto místech bývá porušena (obr. 3). Místy přestupují infiltráty z pathologicky změněných cév přímo na mozkovou tkáň (obr. 4).

Přítomné histologické změny bez izolace virusu z mozku připisujeme odezvnávajícímu infekčnímu procesu. Důkaz virusu bez histologických změn v mozku, zjištěný v jednom případě, si opět vysvětlujeme jeho zavlečením do mozku v období viremie bez intenzivnějšího zachycení ve vlastní mozkové tkáni.

Protilátková odpověď infikovaných myšek *Micromys minutus*.

Porovnávaly se směsi ser z jednotlivých skupin, a to z období před infekcí a 31. den po infekci na přítomnost neutralizačních protilátek. Výsledky zachycuje tab. 2. Z tabulky vyplývá, že u myši očkovanych dávkou virusu $< 1 LD_{50}$ nedošlo k protilátkové odpovědi, zatímco u myši ze skupiny $< 100 LD_{50}$ a $< 1000 LD_{50}$ protilátková odpověď svědčí pro překonání latentní infekce.

DISKUSE

Mikromys minutus žije v přírodních ohniskách klíšťové encefalitidy. I když dosud u něho nebyl dokázán styk s virusy klíšťové encefalitidy isolačními a serologickými vyšetřeními, výsledky našich orientačních pokusů ukazují, že i tento druh drobných ssavců by mohl mít a pravděpodobně má význam v koloběhu virusu klíšťové encefalitidy v přírodě.

Ze srovnávacích pokusů vyplynulo, že *Micromys minutus* je méně vnímavý na infekci virem klíšťové encefalitidy než bílé myši a onemocní i po poměrně velkých dávkách virusu většinou jen latentní infekcí. Uhynutí následkem infekce bylo potvrzeno jen v jednom případě, a to po dávce $< 1000 LD_{50}$, při čemž inkubační doba byla značně dlouhá, více než 20 dnů. Přítomnost virusu v krvi zjištěna mezi 20–70 hod. po infekci subkutánní dávkou $< 10 LD_{50}$, nasvědčuje tomu, že se nejedná o prostý koloběh virusu zavlečeného do oběhu krevního, ale se vši pravděpodobností o množení virusu v organismu. Přitom je zajímavé, že ve vlastní mozkové tkáni se virus zachytává relativně pozdě: proto svědčí poměrně časté pozitivní isolační a současně negativní histologické vyšetření mozku 10. den po infekci. Je možné, že se v této době virus zachycuje a množí v endothelu mozkových kapilár.

V pozdějším období, t. j. 31 dnů po infekci, kdy byl histologický nález mozku častěji pozitivní, naproti tomu isolační důkaz vzácnější, bychom mohli usuzovat, že virus, který proniknul krevně mozkovou bariérou, vyvolal vcelku lehký encefalitický proces, jehož známky zůstaly i po eliminaci virusu zachovalé. O tom, že je oprávněné hledat souvislost mezi histologickými změnami a účinkem podaného virusu, svědčí fakt, že u kontrolních *Micromys minutus* chyběly jakékoli histologické změny v mozku a chyběly rovněž u *Micromys minutus* očkovaných dávkou virusu $< 1 \text{ LD}_{50}$. Rovněž vzestup specifických neutralizačních protilátek po infekci svědčí pro to, že myšky prodělaly nákazu, jejíž příčinou byl virus klišťové encefalitidy.

Celkový průběh nákazy virem klišťové encefalitidy u *Micromys minutus* ukazuje tedy na lehký ráz infekce s možností déletrvajících virusonosičství.

S O U H R N

V přírodě volně žijící myšky *Micromys minutus* jsou poměrně resistantní na podání virusu klišťové encefalitidy. Většinou onemocní jen latentní infekcí. Virus se přitom v jejich organismu množí, dostává se do oběhu krevního a zachycuje se i v mozkové tkáni, aniž, co je závažné, vyvolává nápadných zjevných neb smrtelných příznaků. Virus může přetrvávat v organismu *Micromys minutus* podle našich zjištění 31 i více dnů po infekci. Získané výsledky nasvědčují tomu, že se myšky *Micromys minutus* v přírodních ohniskách klišťové encefalitidy mohou uplatňovat jako virusonosiči.

Р Е З Ю М Е

Экспериментальная инфекция мышки *Micromys minutus* вирусом чехословацкого клещевого энцефалита

Мышки *Micromys minutus* свободно живущие в природе, относительно устойчивы к вводимому вирусу клещевого энцефалита. В большинстве случаев они заболевают только латентно. Вирус же в их организме размножается, проникая в кровь и задерживаясь даже в мозговой ткани, но не вызывает — что именно важно — смертных или вообще привлекающих внимание признаков. Вирус может перзистовать в организме *Micromys minutus* по нашим данным 31 и больше суток после инфекции. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в природных очагах клещевого энцефалита мышки *Micromys minutus* могут играть роль как вирусоносители.

S U M M A R Y

Experimental Infection of the Mouse *Micromys minutus* with the Virus of Czechoslovak Tick-Borne Encephalitis

In the free nature living mice *Micromys minutus* are relatively resistant after application of the virus of tick-borne encephalitis. Most of them undergo a latent infection only. The virus multiplies in the organism at the same time, penetrates into the blood circulation and is trapped also in the brain tissue without — and that is important — evoking any remarkable manifest or mortal symptoms. The virus is able to persist in the organism of *Micromys minutus* during 31 or more days after infection, according to our observations. The gained results bear witness to the possibility that the mice *Micromys minutus* may function in the natural foci of tick-borne encephalitis as carriers of the virus.

L I T E R A T U R A

1. Libíková, H.: Brat. lékařské listy, XXXIV, 10—11: 1176, 1954. — 2. Sborník »Epidémia encefalitidy v Rožňavskom prírodnom ohnisku nákaz« (redigoval D. Blaškovič), SAV, Bratislava, 1954.

Čs. epidemiologie,
mikrobiologie, imunologie
VI - 3 - 1957

Ústav lékařské mikrobiologie KU, Praha, přednosta prof. Dr. Fr. Patočka

KULTIVACE VIRUSU ENCEPHALOMYELITIS ENZOOTICA SUUM V HOMOLOGNÍ TKÁNI I.

FR. PATOČKA, VL. KÜBELKA, B. KORYCH

Úkolem, který jsme si vytyčili po prostudování biologických znaků viru obry vepřů, jeho schopností imunogenních a částečně pathogenese choroby jím vyvolané, bylo prověřit schopnost tohoto viru množit se v homologní vepřové tkáni. Tato řada experimentů, dosud pro technické obtíže neukončená, měla za cíl doplnit nám dosud známé vlastnosti viru i po této stránce a kromě toho vést v případě úspěchu k propracování metodiky produkce viru ve velkých kvantech, aby ho mohlo být použito jako základu očkovací látky obsahující inaktivovaný virus, tedy analogické s tou, jež se dnes vyrábí na celém světě jako úspěšná součást boje proti poliomyelitidě. Vedlejším a dlouhodobým smyslem experimentů tohoto druhu má být studium variability námi standardně používaného kmene viru Těšínské choroby ve smyslu snížení jeho pathogenních schopností protražovanou ev. modifikovanou kultivací tak, aby, je-li možno, byl získán kmen, jehož by bez nebezpečí mohlo být použito jako živé vakciny v dalším vývoji této práce. Pokud nám bylo přístupno světové písemnictví, neměli jsme mnoho předchůdců. Horstmannová (1) ve své souborné práci z r. 1952 naznačila, že měla pocit, jako by se virus vepřové obry množil v explantátech Maitlandova typu kuřecích embryí. Tento fakt považujeme za nepravděpodobný. Larski (2) dosáhl velmi pravděpodobného pomnožení téhož viru v explantátech kultivovaných podle Maitlanda z ledvin vepřových embryí. Na efektivní množení viru v druhé pasáži usuzuje hlavně ze zkrácení inkubační doby pokusného onemocnění vyvolaného mediem z této tkáňové kultury. Práci Mayra a Schwöbela (3) známe pouze z citace Fortnerovy, neboť nám v originále nebyla přístupná. Podle Fortnera (4), který neudává jejich pracovní metodiku ani přesné výsledky, dopracovali se kladného výsledku.

Sami jsme pracovali s kultivací vepřové tkáně od r. 1954 a to nejprve s embryonálními fibroblasty, později pro nepravidelný přísun této tkáně jsme se pokusili o pěstování fibroblastů z testes čerstvě kastrováných vepřů.

Částičky tkáně uloženy do kuřecí plasmy, jako živného media užíváno tehdy 50% Hanksova roztoku, 10% dvacetiprocentního kuřecího embryonálního extraktu a 40% koňského sera. Příležitostně bylo užito místo tohoto roztoku hovězí amnióvové vody a extraktu z hovězích embryí. Množení fibroblastů v těchto typech media bylo velmi dobré. Infekce kultury v první pasáži provedena 0,1 ml 10^{-1} suspence míchy obsahující virus. V jednom případě 2 pasáží v tkáňových kulturách tohoto typu obsahovala virus v takovém množství, že stačil k vyvolání smrtelné encefalomyelitidy po i. c. aplikaci.

O těchto orientačních pokusech referováno dvěma z autorů v listopadu 1955 na virologickém semináři v Budapešti.

Plynulejší a systematická práce s tkáňovými kulturami s novou a přesně vypracovanou metodikou obnovena v polovici r. 1955.

Materiál — metody: K infekci kultur bylo užito standardního viru kmene vepřové obry, se kterým pracováno v laboratoři od roku 1949 a který od této doby prodělal řadu desítek i. c. pasáží. Biologické a imunogenní vlastnosti tohoto viru popsány v práci 5, 6 a 7. PD_{50} tohoto viru při i. c. inokulaci v roce 1951 byla stanovena na $10^{-3,1}$. Dalšími pasážemi od té doby se o něco zvýšila, ale nikdy nedosáhla hodnoty $PD_{50} 10^{-4}$. Cervikální a lumbální části mích, obsahující podle

citovaných pokusů největší kvanta virusu byly konzervovány až do použití zpravidla na suchém ledu, někdy též v lednici při -15°C . Četnými i. c. pasážemi nabyt tento ústavní kmen virusu velmi výrazných neurotrofních vlastností, výrazné a těžké symptomy onemocnění po vstříknutí 0,5 ml míšní suspence 10^{-2} nastupovaly zpravidla mezi 8. až 14. dnem po inokulaci, při čemž váha selat v rozmezí od 25 do 50 kg nehrála prakticky žádnou roli.

Tkáňové kultury: Ke kultivaci v prvním orientačním pokusu užito dospělá tkáň ledvinné (1955) a v roce 1956, počínaje měsícem červnem, vesměs vepřové tkáň embryonální, zejména kůže, plíce a celé ledviny. Tkáňové kultury byly kultivovány metodou popsanou Wellerem a spol. (8) ve formě fragmentů. Tkáň byla před nasazením (obzvláště u tkáň dospělých zvířat) mnohonásobně promyta, aby byly odstraněny ev. přítomné protilátky. Dobře rozrostlá tkáň byla po propláchnutí Hankovým roztokem infikována množstvím 0,1 ml 2×10^{-1} suspensí míchy obsahující virus, 10 min. ponechána v horizontální poloze a medium doplněno do objemu 1 ml. Jako media bylo užito práškového laktalbuminhydrolysátu (Nutritional Biochem. Corp., Ohio) 0,5% v Hankově roztoku s 5% koňského sera, antibiotiky v množství po 50 jednotkách penicilinu a 50γ streptomycinu na 1 ml media. pH bylo upraveno natriumbikarbonátem na 7,5. Medium z infikovaných zkumavek bylo vybíráno a smícháno po 4denní inkubaci při $36,5^{\circ}\text{C}$ ve stationární poloze. Před přenesením na další kultury uchovávalo v lednici při -20°C . Medium po vynětí bylo zkoumáno na bakteriologickou sterilitu,

Výsledky pokusů z roku 1955: Rozrostlé tkáň kortexu ledviny dospělého vepře infikovány 0,1 ml suspensí 10^{-1} shora uvedených infekčních mích. Po 4denní inkubaci vyňato medium a vstříknuto i. c. v kvantu 1 ml vepři č. 939. Typické symptomy těšínské choroby se vyvinuly po 9denní inkubační době, zvíře v paralysách zabito. Histologicky potvrzena diagnosa encephalomyelitis enzootica suum. Tento orientační pokus ukázal persistenci masivních dávek virusu ředěného 10^{-2} při teplotě 37°C trvajících po výše uvedené dobu. Jelikož podle dřívějších zkušeností je zachování aktivity virusu po tuto dobu při této teplotě nepravděpodobné, považovali jsme již tento pokus za určité potvrzení, že virus se pomnožuje na homologní tkáni. Tím spíše, že inkubační doba infikovaného zvířete mediem z kultury byla stejná jako při užití vysoce virulentních mích.

Výsledky pokusů z roku 1956: Kultury embryonálních tkání získaných shora popsaným způsobem infikovány míšní suspensí 2×10^{-1} z vepře č. 939 v množství 0,1 ml na jednu kulturu. Podotýkáme, že dodatečným experimentem z 30. IX. 1956 ukázala se tato mícha tak infekční, že 1 ml 10^{-1} suspence i. c. injikované seleti vyvolal rychle postupující smrtelnou paralysu po inkubační době 8 dnů s typickým histologickým nálezem. Medium vyňaté z kultury po 4 dnech inkubace uloženo až do další pasáže při -20°C .

Mediem z první pasáže infikována pasáž druhá a podobně z tohoto media pasáž třetí.

Experimentální ověření výsledků kultivace virusu na tkáňových kulturách pokusem na zvířeti: 30. XI. 1956 vstříknut 1 ml media z třetí pasáže na tkáňových kulturách i. c. seleti č. 209. Po 8denní inkubaci nástup prvních symptomů vepřové obrny, které vyústily v rychlou paralysu, takže zvíře druhého dne zabito. Při pitvě orgány nalezeny beze změn, mozek i mícha sterilní, histologický nález z míchy potvrdil diagnosu typické vepřové encefalomyelitidy Kloboukovy.

Pokus opakován 12. XII. 1956 s jinou ampulkou též šarže 3. pasáže jako v prvním případě. Infikováno sele č. 787. Současně sele č. 788 dostalo i. c. 1 ml téhož media ředěného 10^{-1} . Sele č. 787 onemocnělo již 7. den typickou symptomatologií Kloboukovy nemoci, druhý den zabito, pitváno a mícha poslána k histologickému vyšetření.

Sele č. 788 onemocnělo za stejných symptomů až 10. dne a zpracováno jako předchozí. Histologický nález v obou případech potvrdil diagnosu encephalomyelitis enzootica suum. Histologická vyšetření byla provedena laskavostí Doc. Dr. B. Bednáře.

Není třeba zvláště uváděti, že veškeré zkoušky bakteriologické sterility centrálního nervového systému zůstaly negativní.

D i s k u s e

Experimenty na zvířatech z konce roku 1956 potvrdily naprosto jasně skutečnost, prokázanou námi předběžně již dříve, že virus vepřové obrny se velmi efektivně (podobně jako u lidské polio) množí na explantátech z homologní tkáně. Ani první experiment, při němž k infekci použito přímo media ze 3. pasáže na tkáňových kulturách, nemůže být vykládán pouhým přetrváváním infekčního kvanta virusu v uvedeném mediu, neboť konečné ředění virusu v poslední tkáňové pasáži počítáno od výchozího inokula, bylo 1:5 000. Toto ředění přesahuje totiž infekční titer našeho virusového kmene, jak ho známe z dřívějších titračních pokusů, k čemuž ještě musíme připočítat škodlivý vliv teploty 37° C působící celkem po dobu 12 dnů na progresivně ředěný virus. Uvážíme-li pak, že i desateronásobné ředění poslední tkáňové kultury vyvolalo prudké a smrtící onemocnění v rozmezí našich běžných experimentálních dob (zde by šlo již o diluci původní míchy 1:50 000), nemůže být o faktu množení nejmenších pochyb.

Naše zjištění, které mimo jiné potvrzuje také dřívější námi citované práce, má pochopitelně kromě své základní hodnoty také eminentní praktický význam, jak v úvodu naznačeno: Metodika, které jsme použili, se prakticky neliší od běžně používané metodiky pomnožování poliomyelitických virusů na vnímavých tkáních a stejně tak snadno může být propracována pro produkci velkých kvant vysoce účinného a při tom velmi čistého virusu těšinské nemoci. Prvé pokusy o kultivaci virusu v Roux láhvích na thypsinované tkáni jsme již metodicky úspěšně realizovali.

Vzhledem k tomu, že jako základní tkáň pro kultivaci ve velkém se může použít vepřové tkáň embryonální, která je při porážce vlastně odpadem, bylo by možno vyrábět, stejně jako u lidské poliomyelitidy, z tkáňových kultur očkovací látku jak inaktivovanou, tak po případě po modifikaci živou, nesmírně lacinou a přitom optimální kvality.

S O U H R N

Autoři prokázali schopnost virusu encephalomyelitis enzootica suum množit se na explantátech z homologní tkáňe buď embryonální nebo dospělé, pěstované podle základní metodiky udané Wellerem a spol. Koncentrované medium z 3. pasáže tkáňových kultur usmrcovalo sebe za typické symptomatologie po inkubační době 7 dnů, totéž ředěno 10X po inkubační době 10 dnů. Autoři navrhuji přezkoušení takto získaného virusu jako základu k velmi čisté a levné očkovací látce proti obrně vepřů a v případě, že by se osvědčila, její výrobu z tkáňových kultur ve velkém.

В ы в о д ы

Культивация вируса инфекционного энцефаломиелиита свиней (болезни Тешена) в гомологической ткани I.

Авторы доказали способность вируса инфекционного энцефаломиелиита свиней (болезни Тешена), культивированного по основному методу Веллера, Эндра, Роббинса, размножаться в explantатах гомологических эмбриональных или взрослых тканей. Концентрированная питательная среда, взятая от третьего пассажа на тканевых культурах оказалась летальной для поросят, которое умерли на седьмой день инкубации при наличии типичных признаков данного заболевания. Та же среда, разведенная в десять раз привела к такому же исходу на десятой день инкубации. Авторы предлагают испробовать вирус, полученный таким путем, как основу дешевой и очень чистой вакцины против болезни Тешена, а в случае успешности апробации выработку ее в большом масштабе.

SUMMARY

Cultivation of the Encephalomyelitis enzootica suum Virus in Homologous Tissue I.

The authors have demonstrated the ability of the encephalomyelitis enzootica suum virus to propagate in explants of homologous tissue, either embryonic or adult, cultivated according to the basic technic devised by Weller, Enders, and Robbins. Concentrated tissue culture medium taken from the third passage killed farrows which evinced typical symptoms after a seven days incubation period. When a ten-fold dilution of the same medium was applied, the incubation lasted ten days. The authors suggest to test the virus thus cultivated for use as a basis for an inexpensive and pure vaccine against hog paralysis, and if it proves mass its good production,

LITERATURA

1. Horstmann, D. M.: J. Immunol. 69, 379, 1952. — 2. Larski, Z.: Med. Vet. (Polsko) 11, 589, 1955. — 3. Mayr, A., Schwöbel, W.: Mh. Tierheilkunde 8, 49, 1956. — 4. Fortner, J.: Arch. exp. Veterinärmed. 10, 7, 713, 1956. — 5. Patočka, Kubelka, Slavík: Věstník československé akademie zemědělské 1951, XXV, 461. — 6. Patočka, Kubelka, Boháč: Českoslov. hyg. epidemiol. mikrobiol. 2, 22, 1953. — 7. Kubelka, Vl. Patočka, F.: Arch. exp. Veterinärmed. 8, 666, 1954. — 8. Wellen, T. H., Enders, J. F., Robbins, F. C.: J. Immunol. 69, 6, 1952.

Čs. epidemiologie,
mikrobiologie, imunologie
VI - 3 - 1957

Ústav lékařské mikrobiologie KU, Praha, přednosta prof. Dr F. Patočka

KULTIVACE VIRUSU ENCEPHALOMYELITIS ENZOOTICA SUUM V TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH HOMOLOGNÍ TKÁNĚ II.

B. KORYCH, FR. PATOČKA, VL. KUBELKA

V předchozích pracích bylo prokázáno, že virus Těšínské choroby vepřů se pomnožuje v tkáňových kulturách homologní tkáně (1, 2, 3). V literatuře nám dostupné jsme nenašli žádnou zmínku o cytopathogenním účinku virusu této nemoci, ačkoli Horstmannová (4) a Larski (1) popisují pravděpodobně pomnožení virusu v tkáňových kulturách — v prvním případě embryonálních kuřecích, v druhém případě homologních ledvinných, v obou případech kultivovaných způsobem podle Maitlanda. V naší práci, v níž k průkazu virusu v homologních tkáních jsme většinou užívali tkáně vykazující fibroblastový růst a standardně jsme vybírali 4. den medium, výrazný cytopathogenní účinek virusu na tkáň nebyl patrný. Jen u tkání ledvinných byly vyznačeny změny, ukazující poškození buněk, ale k tak výrazným změnám, jako u poliomyelitidy lidské nedocházelo. Vzhledem k tomu, že tyto ledviny, jichž bylo užito v předchozí práci k pomnožování virusu, byly brány z dospělých zvířat a měly tendenci k spontánní degeneraci při delší době kultivace, nepokládali jsme tyto změny za dostatečně průkazné pro cytopathogenní účinek virusu vepřové obrny. Proto pro tento průkaz jsme zvolili homologní embryonální tkáň ledvinnou, kultivovanou ve formě monolayerů.

Materiál — metody: Vzhledem k tomu, že metodika zpracování vepřové tkáně není běžně rozšířena, popisujeme ji do všech podrobností.

Virus: Užito stejného virusového kmene jako v práci předchozí (3). Před inokulací na tkáňové kultury v tomto experimentu byl pasážován na vepřových tkáních s fibroblastovým charakterem růstu (kůže, plíce) ve třech pasážích a pak intracerebrálně inokulován v mediu z tkáňových kultur seletí. Míchy selete usmrčeného za příznaků paralys po 7 dnech inkubace, bakteriologicky sterilní a s diagnosou obrny vepřů potvrzenou histologicky, bylo užito jako zdroje virusu.

Tkáňové kultury byly připravovány z kortexu ledvin vepřových embryí metodikou podle Bodiana (5) s malou modifikací. Embrya vyňata z gravidní dělohy ne déle než 3 hodiny po porážce zvířete. Východnější pro nás byla embrya z druhé poloviny gravidity, kdy byly ledviny již větší a vhodnější ke zpracování. Po vynětí ledvin a jejich dekapulaci byl odstřížen kortex, který byl nastříhán na malé kousky o průměru ne větším než 2 mm. Nastříhaná tkáň mnohonásobně promytá Hanksovým roztokem za přidání antibiotik penicilinu a streptomycinu po 50 j. ev. μg na 1 ml, až byla supernatantní tekutina úplně čirá. Na tkáň po odsátí poslední promývací tekutiny nalito 150 ml 0,25% trypsinu (Organofarma č. š. 1202/4,5) v Hanksově roztoku za přidání stejného množství antibiotik jako při promývání. pH trypsinu upraveno 1,4% Na bikarbonátem na 7,5. Tkáň s trypsinem nalita pak do 500 ml širokohrdlé Erlenmeyerovy láhve s 6 zářezy na bocích a otvorem pro pipetování na straně. Do láhve horem zavedena skleněná tyčinka tvaru T nasazená na ose vertikální míchačky, která se otáčela rychlostí asi 350 otáček za min. Trypsinováno 2 hodiny při pokojové teplotě (22° C), supernatant odssát a na sedimentované fragmenty nalito znovu 150 ml trypsinu s antibiotiky, pH 7,5. Trypsinováno za stejných obrátek a za stejné teploty další dvě hodiny. Po této době byl supernatant postranním otvorem odpipetován do centrifugačních nádobek o objemu 65 ml v množství 50 ml do jedné nádobky, centrifugován a sedimentované buňky promyty. Na zbývající fragmenty byl přidán opět trypsin ve stejné koncentraci a množství a trypsinování pokračovalo po další dvě hodiny. Zpravidla po tomto třetím trypsinování tkáně byly kompletně rozvolněny do buněk.

Při promývání bylo první centrifugování prováděno na horizontální centrifuze při 800 rpm po 5 minut, supernatant zpravidla dosti kalný, dekantován. Na sedimentovanou tkáň nalit stejný objem Hanksova nárazníkového roztoku, buňky promíchány pipetou a centrifugovány po dobu

5 minut při stejném počtu obrátek jako při první centrifugaci. Supernatantní tekutina dekantována, na sediment nalit stejný objem Hanksova roztoku, buňky promíchány a centrifugovány při 800 rpm. Třetí proprání bylo provedeno v polovičním objemu Hanksova roztoku a centrifugováno 1 min. při 800 rpm. Tímto postupným centrifugováním docíleno poměrně velmi čisté buněčné suspence bez příměsí krvinek a buněčné drtě. Po dekantaci posledního supernatantu buňky resuspendovány v mediu a určeno jejich množství na 1 ml. Počítání buněk prováděno v Bürkerově komůrce po nabarvení trypanovou modří 0,5% v poměru 1 díl buněčné suspence na 2 díly barviva. Konečná suspence buněk v mediu upravena pak na hodnotu 200 000 živých buněk na 1 ml.

Medium, jehož jsme užili ke kultivaci buněk, bylo jednak čisté laktalbuminhydrolysatové (0,5% laktalbuminhydrolysat práškový v Hanksově roztoku, 2,5% koňského sera, antibiotika penicilin a streptomycin po 50 j. ev. μg , pH upraveno 1,4% natriumbikarbonátem na hodnotu 7,5) nebo medium laktalbuminhydrolysatové smíchané stejným dílem s hovězí amniovou tekutinou a 5% koňského sera. Toto druhé medium mělo výhodu v lepších nárazníkových vlastnostech. Výměna media prováděna zpravidla 4. den. Šestý den po nasazení byly buňky rozrostlé tak, že vytvářely souvislý jednovrstevný epitheliální povlak. V tuto dobu, po propláchnutí tkání alkalickým Hanksovým roztokem pH 7,6, prováděna infekce 10^{-1} suspenzí míšni v Hanksově roztoku v množství 0,1 ml na zkumavku. (Suspence před tím centrifugována 15 min. při 3.000 rpm, k infekci použito supernatanta.) Po 10min. inkubaci v horizontální poloze při pokojové teplotě přidáno medium do celkového objemu 1 ml. Inkubováno stationárně při teplotě $36,5^{\circ}\text{C}$. Kontrola tkání prováděna denně, užité zvětšení 50X a 100X. Při ukončení experimentu prováděna zkouška bakteriologické sterility na krevním agaru a bujonu.

Jako kontroly postaveny kultury, ke kterým bylo stejným způsobem přidáno 0,1 ml supernatantu 10^{-1} suspence normálních myších mozků a kultury se samotným mediem.

V ý s l e d k y

72 hodin po infekci byly patrný první změny, odlišné od intaktních kontrolních tkání. Ohraničené skupiny buněk, obklopené normálními zdravými buňkami, nabývaly na svém objemu, jejich povrch se stával vyhlazený a buňky jakoby prominovaly nad okolní epitheliální tkáň. Po 96 hodinách bylo viděti ostrůvky buněk, které byly ve svém průměru větší než buňky epitheliální, zaokrouhlené s tmavším středem odděleným od buněčné blány úzkou světlou zónou. Mimo tyto velké buňky bylo vidět buňky malé, zaokrouhlené, s granulacemi. Oba tyto typy buněk ztrácely soudržnost s okolní neporušenou tkání. Rozsah změn se rozšiřoval do plochy. Po 120 hodinách granulace buněk význačná na četných místech, buňky ztrácejí soudržnost, v mediu drf.

Kontrolní zkumavky v tutéž dobu bez degenerativních změn. Medium bakteriologicky sterilní.

Změny vyvolané cytopathogenním agens na monolayeru epitheliální tkáně derivované z kortexu embryonálních vepřových ledvin, postupují v tomto sledu: buňka nejprve nabývá na objemu, její zevní struktura se postupně vyhlazuje a zaokrouhluje. Centrum buňky tmavne, je odděleno od buněčné blány úzkou zónou normální transparence, buněčná blána je jakoby ztlustělá. Následuje granulace buňky a její zmenšování, takže se jeví jako malý okrouhlý a tmavý útvar s granulární strukturou. Posledním stadiem je pak kompletní desintegrace buňky s rozpadem.

Pokusy tohoto druhu založeny celkem třikrát v různých časových intervalech v rozmezí 4 měsíců, a to po každé s přibližně stejným výsledkem.

Diskuse a závěry: V předcházejícím popsán sled změn na jednovrstevném epitheliálním buněčném povlaku vepřové embryonální ledvinné tkáně infikovaném materiálem obsahujícím vysoká kvanta viru vepřové obrny. (Titr přibližně $10^{-3,1}$ při intracerebrální titraci na zvířeti.) Podle výsledků experimentem ověřených na zvířeti, popsáných v předchozí práci (3), máme jistě podstatné oprávnění soudit (i když experiment sám v tomto případě z technických důvodů nebyl možný), že jde o důsledek množení viru těšínské choroby na těchto buňkách. Netroufáme si,

i když jsme fenomen v prakticky stejné míře opětovaně pozorovali, činiti striktní paralelu mezi ním a cytopathogenním efektem známým u převážné většiny lidských poliovirusů na vnímavých tkáních. Nemůžeme se však ubránit dojmu, že jde o fenomen podobný, i když kvalitativně a kvantitativně méně výrazný při přibližně stejných titrech užitého inokula. Jelikož není vyloučeno, že by se změny námi pozorované mohly stát zřetelnějšími adaptací tohoto viru na tkáňových kulturách, učinili jsme přípravy k dalším plynulým pasážím na kulturách popsaného typu, zaměřeným také k titračnímu ohodnocení tohoto zjevu; tyto pasáže pak samozřejmě musí být doplněny experimentem na zvířeti.

Kvůli úplnosti stojí za zmínku i to, že jsme se pokusili popsaný fenomen inhibovat serem rekonvalescentního zvířete. Stejně jako předcházející, i tato část práce si vyžádá dalších a opětovaných pozorování s příslušným systémem kontrol.

S O U H R N

V práci popsána metodika kultivace jednovrstevného povlaku epitheliální tkáně derivované z kortexu embryonálních vepřových ledvin. Použito v podstatě metody popsané Bodianem s malou modifikací. Dobře rozrostlé epitheliální tkáně tvořící jednovrstevný povlak byly infikovány supernatantem 10^{-1} suspence mích obsahující virus encephalomyelitis enzootica suum. Po 3 dnech inkubace pozorovány na epitheliálních buňkách degenerativní změny celkem pomalu postupující, jejichž charakter je v práci blíže rozveden a které vedly k postupnému rozrušení buněk dobře odlišitelnému od kontrolních tkání. O povaze tohoto fenomenu a dalším pracovním postupu se v práci diskutuje.

В Ы В О Д Ы

Культивация вируса инфекционного энцефаломиелита свиней (болезни Тешена) в тканевых культурах гомологических тканей II.

Описана методика культивации эпителиальных тканей полученных из коры почек свиных эмбрионов. Авторы в основном пользовались методом Бодiana с некоторыми модификациями. Эпителиальные ткани разросшие в одном слое были инфицированы 10^{-1} суспензией спинного мозга, содержавшего вирус инфекционного энцефаломиелита свиней (болезнь Тешена). После трехдневной инкубации в эпителиальных клетках были отмечены медленно распространяющиеся дегенеративные изменения. Эти изменения вели к постепенному разрушению клеток хорошо отличному от контрольных тканей. Широко описан характер изменений. Обсуждены процесс работы и характер этого цитологического явления.

S U M M A R Y

Cultivation of the Encephalomyelitis enzootica suum Virus in Tissue Culture of Homologous Tissue II.

A technic of cultivation of epithelial tissues derived from the cortex of embryonic porcine kidneys is described in this report. Fundamentally with slight modifications the method devised by Bodian was employed. Epithelial tissues growing in one layer were infected with a 10^{-1} suspension of spinal cord containing the encephalomyelitis enzootica suum virus. After three days of incubation slowly progressing degenerative changes were observed in the epithelial cells. These changes lead to gradual desintegration of the cells unequivocally distinguishable from control tissues. An extensive description of the nature of the changes is given in this article. The further procedures and the nature of this phenomenon are discussed.

L I T E R A T U R A

1. Larski, Z.: Med. Vet. (Polsko) 11, 589, 1955. — 2. Mayr, A., Schwöbel, W.: Mh. Tierheilkunde 8, 49, 1956. — 3. Patočka, F., Kubelka, Vl., Korych, B.: Epidem., mikrobiol., imunol., 3, 2, 1957. — 4. Horstmann, D. M.: J. Immunol. 69, 379, 1952. — 5. Bodian, D.: Virology 2, 579, 1956.

Mikrobiol. oddělení OHES v Havlíčkově Brodě, Veterinární středisko v Čáslavi

CORYNEBACTERIUM PYOGENES BOVIS — SROVNÁNÍ KMENŮ ZVÍŘECÍHO PŮVODU S LIDSKÝMI VARIANTAMI

JOSEF DUBEN, MILOSLAV NEUBAUER a ZDENĚK DUBEN

Podnětem k naší práci o *Corynebacterium pyogenes*, které jsme při vyšetřování patologického materiálu ze zvířat velmi často zjišťovali, byla studie Patočkova o lidských variantách tohoto druhu. V dostupné literatuře nebyla pyogenní korynebakteria zvířecího původu detailně studována, zejména po stránce toxicity. U kmenů námi izolovaných jsme si proto prověřili jednak známé údaje, jednak jsme se pokusili rozřešit problém toxicity, který tak podrobně prostudoval Patočka u svých lidských variant.

K pokusům jsme použili 32 kmenů *Corynebacterium pyogenes*, které jsme během půl roku isolovali z různých zvířat. Získané kmeny jsme identifikovali morfologicky, biochemicky a pokusem na zvířeti. Při izolaci toxinů a jejich bližším určení přidrželi jsme se metodiky uvedené v Patočkově práci (1), aby bylo umožněno přesnější porovnání mezi kmeny původu lidského a zvířecího.

MORFOLOGIE

Morfologicky se korynebacteria z primokultury jevila jako polymorfní nepohyblivé převážně G + krátké až středně dlouhé, většinou štíhlé tyčinky. Rozdíly jsme nacházeli i v síle tyčinek. V subkulturách ztrácely často gram pozitivitu a vyrůstaly mnohdy v krátkých tyčinkách až kokobacilárních kapkovitých útvech. Výskyt metachromatických granul byl výjimečný. Plasma se anilinovými barvivy barvila většinou homogenně, ve starších kulturách nepravidelně.

Kmeny vyrostlé na krevním agaru s beraní krví za podmínek mikroaerofilních až anaerobních jsou nápadně podobné koloniím *C. diphtheriae* typu *mitis*. Jednotlivě dosahují za 48 až 72 hodin průměrné velikosti 1–1,5 mm. Jsou mazlavé konsistence. Za 24 hodin při aerobní kultivaci jsou zprvu bodovité a připomínají streptokokové »minute« kolonie. Vždy je obklopuje dosti široká zóna úplné beta hemolysy.

Biologické vlastnosti

Na hloubkových agarech podle Veillon se nám potvrdila výrazná mikroaerofilie. Hemolysa na krevních agarech byla jasnější a větší za mikroaerofilních, a zejména za anaerobních podmínek. Všechny kmeny byly v primokultuře i v dalších pasážích zřetelně serofilní. Tuto vlastnost podle našich zkušeností nemůžeme považovat za obligátní, poněvadž jsme u všech kmenů docílili růstu na neobohaceném 2% agaru, i když tento růst byl málo patrný. V játrovém bujonu se serem rostly všechny kmeny v zrnitém sedimentu, někdy s přechodným zákalem. Na telluritové půdě vyrostlo slabě do 9 dnů jen 7 ze 32 kmenů. Želatina bez jater byla zkapalňována při 37° C většinou do dvou dnů. Na koagulovaném seru jsme pozorovali výrazné zkapalnění povrchu už do 24 hodin. Lakmusové mléko bez jater bylo okyseleno většinou za 24 hodiny s následnou koagulací, retrakcí a konečnou digescí. Ostatní biologické vlastnosti vyplývají z tabulky 1. Všechny tekuté půdy byly po inokulaci převrstveny parafinovým olejem.

Všechny kmeny, jejichž citlivost na antibiotika byla stanovena standardní plotnovou metodou, byly enormně vnímavé na penicilin a velmi dobře na streptomycin.

EXPERIMENTÁLNÍ PATHOGENITA

Pathogenita několika vybraných kmenů je zachycena na tabulce 2. Použité kultury byly pěstovány v bujonu se serem za aerobních podmínek po 48 hodin.

Tabulka 1.

Kmen č.	902	1041	1047	1094	1121	1167	1170	23	39	148	149	154	156	162	167	169	170	178	
Glukosa	+3	+3	+2	+3	+3	+3	+3	+2	+2	+3	+4	+	+	+2	+3	+2	+2	+5	
Laktosa	+3	+4	+2	+14	+3	+14	+3	+2	+2	+3	+2	+	+6	+6	+3	+2	+2	+5	
Maltosa	+3	+14	+3	+3	+3	+3	+3	+	+	+	+	+	+	+2	+2	+2	+2	+	
Sacharosa	+3	-	-	-	+3	+14	+14	+4	+3	+3	+	+	-	-	+2	+2	+2	+8	
Trehalosa	+3	+14	-	-	+5	-	+4	-	+3	+8	+	+	+8	+10	+8	+10	+2	+10	
Xyloza	+5	+6	+5	+4	+7	+5	+5	+7	-	-	-	-	-	+2	+2	+4	-	+	
Manit	+3	×10	-	-	-	-	-	-	-	-	+6	+4	-	-	-	-	-	-	
Inosit	+14	+14	-	+14	+14	-	-	-	-	-	+4	+4	-	-	-	+7	-	+14	
Glycerol	+14	-	×4	-	+14	+5	+5	+6	-	+10	+6	×6	-	+5	-	+8	-	+10	
Škrob	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+	+	+2	+	+	+	+2	+2	+2	+3	+	
Dextrin	+3	×4	+6	×8	+3	+3	+3	+	+	+2	+	+	+	+2	+4	+2	+5	+	
Inulin	-	-	-	-	+7	-	-	-	-	-	+4	-	+8	-	-	-	-	-	
Salicin	-	+14	-	-	-	+3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	
Acidita	+	+	+	+	+	+	+	+2	+	+4	+4	+5	+5	+	+2	+	+	+2	
Koagul.	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+4	+3	+5	+6	+7	+6	+2	+3	+2	+2	+3	
Digestce	+4	+3	+3	+4	+4	+4	+3	+5	+4	+6	+7	+9	+8	+3	+4	+3	+4	+4	
Zkapal. želat.	+2	+	+3	+3	+2	+2	+3	+	+	+	+2	+2	+	+2	+2	+2	+2	+2	
	+4	+2	+5	+5	+14	+8	+5	+7	+8	+5	+7	+8	+3	+5	+5	+6	+2	+5	
Telur. půda	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	(+)	
Kataláza	-	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
U všech kmenů	Rhamnosa, raffinosa, duleč, aeskulin, indol, H ₂ S, urea, VPT, MPT, KNO ₃ , Redukce meth. modři																		
	Zkapalnění koag. sera za 24 hod., serofilie, mikroaerofilie, β haemolýsa, exp. pathogenita																		

Tabulka 2. Experimentální patogenita Cor. pyogenes bovis.

Pokusná zvířata				Lab. kmen	ccm buj. kult.	Apikace	Klinický průběh	Smrt za dní	Pitevní nálezy	Zpět. kult.		Závěr
králík č.	myš č.	morče č.	krysa č.							orgány	hnis	
1				902	2	i.v.	progresivní kachexie vzestup. paresy	64	Degenerace jater	-		Mors toxica
2				1041	2	i.v.	tumorosní združení obou karpálních kloubů	21 usmrcen	Abcesy v obou karpálních kloubech, komunikující s dutinou kloub.	-	+	Arthritis metastatica
3				1047	2	i.v.	progres. kachexie vzestup. paresy	18	Degenerace jater	-		Mors toxica
4				1094	2	i.v.	progres. kachexie vzestup. paresy	76	Degenerace jater	-		Mors toxica
5				1121	2	i.v.	progres. kachexie vzestup. paresy	18	Degenerace jater	-		Mors toxica
	1			902	0,5	i.p.	křeče, paralyzy zadních končetin	2	Hyperemie jater a sleziny, colitis	+		Sepsis
	2			1041	0,5	i.p.	paresy zadních končetin	9	Hyperemie jater a sleziny, colitis, hnisavá peritonitis	+	+	Peritonitis purulenta diffusa
	3			1047	0,5	i.p.	křeče, paralyzy zadních končetin	2	Hyperemie jater a sleziny, colitis	+		Sepsis
	4			1094	0,5	i.p.	-	31	nihil			
	5			1121	0,5	i.p.	-	usmrc.	nihil			
		1		902	1	i.p.	-	31 usmrcena	nihil			
		2		1041	1	i.p.	-		nihil			
		3		1047	1	i.p.	-		nihil			
		4		1094	1	i.p.	-		nihil			
		5		1121	1	i.p.	-		nihil			
			1	902	1	i.p.	-	31 usmrceny	nihil			
			2	1041	1	i.p.	-		nihil			
			3	1047	1	i.p.	-		nihil			
			4	1094	1	i.p.	-		nihil			
			5	1121	1	i.p.	-		nihil			
6				1041 isol. z pokus. král. č. 2	2	i.v.	Před smrtí třes a přechod. znám. ochrnutí	10	Degenerace jater	-		Mors toxica
	6				0,5	i.p.	Paresy zadních končetin	8	Hyperemie jater a sleziny, colitis, hnisavá peritonitis	+	+	Peritonitis purulenta diffusa
		6			1	i.p.	-	31	nihil			
			6		1	i.p.	-	usmrc.	nihil			

Tabulka 3. Koncentrace a purifikace hemolysinu.

Kmen 1121	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192	1:16384
Bujon zbavený bakt.										—	—	—	—	—
Bujon po rozbití mikrobů (-15°/+37°) 3×												—	—	—
Bujon zbylý po srážení (NH ₄) ₂ SO ₄					—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Surový koncentrát (ve fys. roztoku)														—
Purifikát po dialyse													—	—

TOXINY

Pro identifikaci toxinů inkubovali jsme kmeny v 10% serovém bujonu. Inkubační doba 72 hodin se nám osvědčila jako optimální. K uvolnění většího množství toxinů rozbitím bakteriálních těl jsme použili metody střídavého zmrazování při -15° C a rozmrazování kultur. Titrace hemolysinu byla prováděna v dvojnásobných ředěních. Po přidání stejného dílu 1% suspence červených krvinek jsme inkubovali 1 hodinu ve vodní lázni při 37° C a 1 hodinu při pokojové teplotě. Jako konečný titr jsme hodnotili zkumavku s 50% hemolysou. V první části pokusů jsme souběžně vyzkoušeli různé druhy krvinek. Jako nejvhodnější se ukázaly koňské, dále králíčí, lidské a nakonec beraní. V dalších titracích jsme užívali výhradně krvinek koňských. Dekantát zbavený bakterií centrifugací, jehož sterilitu jsme si ověřili, byl zkoušen na přítomnost rozpustného hemolysinu. Titraci jsme si ověřili, že hemolysin má charakter exotoxinu.

Většina našich kmenů na rozdíl od Lovella (2) měla titr kolem 1:64, ačkoli v našem nejzdařilejším pokusu jsme zjistili titr 1:512. Proto jsme se pokusili o uvolnění většího kvanta toxinu rozbitím bakteriálních těl.

Při rozmrazování se použilo teploty 37° C. Centrifugát jsme sráželi nasyceným roztokem amonium sulfátu aa a sediment, rozpuštěný v malém množství fyziologického roztoku, jsme purifikovali dialysou přes celofán, a čistotu preparátu jsme kontrolovali baryum chloridem. Hodnoty titrací jsou uvedeny v tabulce 3.

V další části práce jsme se pokusili o zjištění povahy hemolysinu.

Zahřátím na 56° C po 5 minut byl hemolysin prakticky úplně zničen. Přidáním cholesterolu, cysteinu a peroxydu vodíku jsme ovlivňovali jednak tvorbu hemolysinu na krevních agarech, jednak hemolytickou aktivitu čistého toxinu. Souběžnou kultivací s kvasinkovým extraktem jsme zjišťovali jeho vliv na zvýšení hemolytického titru. Čistý toxin byl v kontaktu se substancemi 15 minut při +4° C. Výsledky pokusů jsou uvedeny v tabulkách 4. a 5.

Opakovanou titrací jsme sledovali klesání titru koncentrovaného hemolysinu uloženého při +4° C. Tabulka 6.

S aglutinačním fenomenem při titracích jsme se setkávali jen výjimečně a nepravidelně.

Vycházejíce z předpokladu Lovellova (3), že hemolysin je patrně identický s letálním toxinem, vstříkovali jsme nitrožilně 5 ml dekantátu nerozbité bujonové kultury s titrem 1:512 asi 1,5 kg těžkému králíku. Kromě přechodného zvýšení teploty do tří hodin po injekci nepozorovali jsme jiných změn ani po delší době. V těchto opakovaných pokusech jsme došli k závěru, že produkce letálního toxinu nestoupá paralelně s produkcí hemolysinu, jak tvrdí Lovell (3). Hemolysin není patrně totožný s letální složkou, která nemá charakter exotoxinu. Způsob

Tabulka 4. Ovlivnění tvorby hemolysinu na krevním agaru.

Kmen čís.	Kultivace						
	aerob.	anaerob.	v hloub. krev. ag.	+ 5 ⁰ / ₀₀ kvas. ext.	+ 5 ⁰ / ₀₀ cystein	+ 5 ⁰ / ₀₀ cholester.	
						za 24 hod.	za 6 dní
902	+	$\frac{m}{m}$	$\frac{m}{m}$	++	-	-	++
1041	+	$\frac{m}{m}$	$\frac{m}{m}$		-	(+)	++
1047	+	$\frac{m}{m}$	$\frac{m}{m}$	+	(+)		
1094	$\frac{m}{m}$	$\frac{m}{m}$	$\frac{ }{m}$	++	(+)		
1121	++	++	$\frac{m}{m}$	+	-	-	+
1167	$\frac{m}{m}$	$\frac{m}{m}$	$\frac{ }{m}$	$\frac{ }{m}$	-	-	++
1170	++	++	$\frac{m}{m}$	++	-	++	++
23	++	++	$\frac{m}{m}$	$\frac{m}{m}$	-	+	++
39	$\frac{m}{m}$	$\frac{m}{m}$	$\frac{ }{m}$	$\frac{ }{m}$	-	$\frac{m}{m}$	$\frac{ }{m}$
148	$\frac{m}{m}$	$\frac{m}{m}$	$\frac{ }{m}$	$\frac{m}{m}$	-	++	$\frac{m}{m}$
149	++	++	$\frac{m}{m}$	$\frac{m}{m}$	-	$\frac{m}{m}$	$\frac{ }{m}$
154	$\frac{m}{m}$		$\frac{ }{m}$	$\frac{m}{m}$	-	$\frac{m}{m}$	$\frac{ }{m}$
156	$\frac{m}{m}$		$\frac{ }{m}$	$\frac{m}{m}$	+	++	$\frac{m}{m}$
162	$\frac{m}{m}$	++	$\frac{ }{m}$	$\frac{m}{m}$	+	++	$\frac{m}{m}$
167	$\frac{m}{m}$	$\frac{m}{m}$	$\frac{ }{m}$	$\frac{m}{m}$	(+)	++	$\frac{m}{m}$
169	++	++	$\frac{m}{m}$	$\frac{m}{m}$	(+)	++	$\frac{m}{m}$
170	$\frac{m}{m}$	$\frac{m}{m}$	$\frac{m}{m}$	++	+	+	+
178	$\frac{m}{m}$	++	$\frac{ }{m}$	$\frac{m}{m}$	+	++	$\frac{m}{m}$

uhynutí některých zvířat při zkouškách patogenity nás naopak přesvědčoval o existenci toxické látky charakteru endotoxinu. K uvolnění větších kvant této předpokládané letální složky jsme použili k intenzivnější desintegraci bakteriálních těl rozmrazování při 56⁰ C. Koncentraci a purifikaci jsme prováděli výše uvedeným způsobem. Titrační hodnoty hemolysinu byly nulové.

Důkaz existence letálního toxinu jsme provedli pokusem na králících, který je zachycen na tabulce 7.

Na rozdíl od hemolysinu, který byl zahřátím úplně zničen, ukázala se letálně toxická složka relativně thermostabilní, čímž jsme dokázali zásadní odlišnost obou komponent.

DISKUSE

Ve srovnání s Patočkovým popisem se nám zdají po stránce morfologické naše kmeny shodné s lidskými variantami až na to, že se nám zvířecí korynebakteria zdají vcelku subtilnější. Kultivačně se převážnou většinou velmi podobají

Tabulka 5. Ovlivnění aktivity koncentrovaného hemolysinu.

	č. 1121		č. 1047		č. 170	
	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏
Purifikát hemolysinu	1 : 256	1 : 512	1 : 128	—	1 : 256	1 : 512
+ cholesterol 5‰	1 : 128	1 : 256	1 : 64	1 : 128	1 : 256	—
+ cystein 5‰	1 : 128	1 : 256	1 : 64	1 : 128	1 : 128	1 : 256
+ H ₂ O ₂ 1‰	1 : 128	1 : 256	1 : 64	1 : 128	1 : 256	—
Souběžně kultivováno:						
+ kvas. extr. 5‰	1 : 256	1 : 512	1 : 128	—	1 : 256	1 : 512

C. diphtheriae typu mitis. Na rozdíl od lidských variant, které se většinou spíše podobají přechodu mezi typem gravis a intermedius a vykazují z počátku alfa hemolysu, měly všechny naše kmeny dobře vyznačenou zonu úplné beta hemolysy, a to i za aerobních podmínek už během 24 hodin.

Charakteristickou vlastností našich kmenů byla výrazná mikroaerofilie. Na rozdíl od lidských variant, které jsou v prvních pasážích přísně serofilní, nezdá se nám být serofilie zvířecích kmenů tak výrazná. Na telluritových půdách jeví lidské varianty po 5 dnech většinou sotva viditelný růst, zatím co z našich 32 kmenů jen 7 ukázalo slabý růst do 9 dnů za mikroaerofilních podmínek. Růstem v bujonu se kmeny nelišily. Celkově kmeny živočišného původu vykazovaly pronikavější proteolytické vlastnosti. Dokazuje to rychlé zkapalnění želatiny bez jater, které proběhlo většinou úplně do 2 dnů při 37° C a částečné ztekutění koagulovaného sera už do 24 hodin. Atypická korynebakteria naproti tomu zkapalňovala želatinu do 10 dnů, zatím co Loefflerovo serum vůbec neatakovala. V lakmusovém mléce docházelo k okyselení za 1–2 dny, ke koagulaci průměrně za 2–3 dny s následnou retrakcí a digescí koagula. Lidské varianty mléko pouze okyselovaly a koagulovaly během 10 dnů.

Ve svých sacharolytických vlastnostech byly zvířecí kmeny daleko aktivnější než lidské. Vedle glukosy, laktosy a maltosy zkvašovaly naše kmeny pravidelně

Tabulka 6. Klesání titru konc. hemolysinu stáním při + 4° C.

Purifikovaný hemolysin č. 170	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024
Po dialyse	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	—
za 3 dny	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	—	—
za 5 dní	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	—	—	—
za 12 dní	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	—	—	—	—
za 21 dní	⏏	⏏	⏏	⏏	⏏	—	—	—	—	—
za 28 dní	⏏	⏏	⏏	⏏	—	—	—	—	—	—

Tabulka 7. Experimentální průkaz letálního endotoxinu.

Králík č.	Pohlaví	Váha v kg	Lab. kmen	cem tox. i. v.	Teplota °C			Smrt za dní	Klinický průběh	Pitevni nález	Histologický nález	Závěr
					norm.	za 1 hod.	za 3 hod.					
1	♀	2	1121	5	40	39,5	39,2	10	Po inkubační době několika dní netečnost, snížená pohyblivost, nechutenství, progresivní kachexie, vzestupné parezy s terminál. paralysami, těžké dýchání, salivace, smrt	Degenerace jater a myokardu, nadledvinky a ostatní orgány b. p. n.	Toxické poškození jater a myokardu	Mors toxica
2	♀	2	1047	5	39,8	38,9	39,2	10				Mors toxica
3	♂	1	1121	2	39	39,7	40,5	12				Mors toxica
4	♂	1,5	1047	5	39,8	39,6	40,7	10				Mors toxica
5	♀	1	1041	1,5	40,2	39	39,3	11				Mors toxica

také škrob a dextrin. Ve shodě s Merchantsem (4) a na rozdíl od Lovella (2) měly naše kmeny vždy MRT negativní. Rovněž KNO₃ na rozdíl od Topleye a Wilsona (5) bylo vždy negativní.

Všichni autoři se shodují v tom, že nejcitlivějším zvířetem je králik. Merchants (4) uvádí dále morče a myš, Lovell (2) myš a méně krysu, kdežto morče jako nevnímavé. Ward (6) považuje morče a myš za málo vnímavé, krysu za nevnímavou. V našich pokusech byl nejnímavější k čerstvě izolovaným kmenům králik, méně bílá myš, a morče a krysa byly resistantní. Patočkovy varianty byly pathogenní pro králíka i morče.

Při srovnávání vlastností hemolysinů pyogenních korynebakterií a atypických variant vidíme, že jsou si podobné v tom, že oba patří k pravým exotoxinům. Jsou thermolabilní a lze je irreversibilně zrušit už zahřátím na 56° C po 5 minut. Oproti Hewittovu sdělení (7), že hemolytická aktivita zvířecích kmenů není cysteinem dotčena, zjistili jsme v našich pokusech s purifikovaným hemolysinem podobné snížení jako u kmenů Patočkových. K stejnému efektu došlo vlivem cholesterolu a peroxydu vodíku. Přidáním zmíněných substancí do pevných půd vyvolali jsme cysteinem trvalé potlačení tvorby hemolysinu u většiny kmenů, cholesterolem z počátku potlačení hemolysy různého stupně. Po několika dnech se hemolysa na těchto půdách vyrovnala intenzitou kontrolním plotnám. Zdá se nám, že kyslík ovlivnil hemolysu méně, než vysvítá z údajů Patočkových. Kvasinkový extrakt, který obsahem ribonukleinových kyselin podporuje tvorbu S streptolysinu, se ukázal bez účinku. Na rozdíl od lidských variant, které působily nejlépe na králičí krvinky, dále pak na lidské a koňské, účinkoval náš hemolysin nejvíce na koňské, králičí, lidské a beraní.

Pokud možno shrnout poznatky z provedených pokusů, je hemolysin *Corynebacterium pyogenes bovis* thermolabilním exotoxinem, pravděpodobně proteinové povahy. Je velmi podobný hemolysinu lidských variant s tím rozdílem, že je produkován v daleko větších kvantech, že stáním jeho titr rychle klesá a že se zdá odolnějším vůči O₂.

Zkoušky thermoresistence na izolovaný toxický systém prokázaly, že hemolysin není totožný s letálním toxinem, jak předpokládá Lovell (3). Neproklázali jsme opakovaně paralelní vzrůst hodnot hemolysinu a letálního toxinu. Kromě toho se ukázal hemolysin jako netoxický ve smyslu účinku letálního toxinu podle

Lovella (2). V normální bujonové kultuře jsme opakovaně existenci letálního exotoxinu vůbec neprokázali. Dostatečná kvanta toxické látky jsme získali teprve rozbitím bakteriálních těl s následnou koncentrací a purifikací. I. v. aplikace takto připraveného toxinu usmrtila králíky průměrně do 10 dnů. Po inkubační době několika dní objevila se u zvířat netečnost, nechutenství a za příznaků vzestupných pares s terminálními paralysami a těžké kachexie zvířata hynula. Při pitvě vedle nápadně lomivých jater a ochablého srdečního svalu byly nadledvinky a ostatní orgány beze změn. Histologicky byly prokázány v játrech a myokardu známky toxického poškození.

Poněvadž toxická látka působí po zřetelné inkubační době, uvolňuje se až po rozpadu bakterií, působí pomalu ve velké smrtící dávce a poněvadž je relativně thermostabilní, považujeme ji za letální endotoxin. Údaje Lovellovy (2) o uhybnutí zvířat v několika minutách po aplikaci předpokládaného toxinu nezdaří se nám správně hodnoceny a domníváme se, že jde o šokové projevy. Svými pokusy jsme prokázali na rozdíl od Lovella (3), že hemolytický exotoxin a letální endotoxin jsou dvě odlišné složky a že jejich množství v jedné kultuře *C. pyogenes* nemusí vzrůstat paralelně, což závisí výhradně na toxicitě kmene. Porovnáme-li vlastnosti našeho endotoxinu s Patočkovým, zjišťujeme rozdíl nejen ve velikosti smrtící dávky a v době účinku podávaného toxinu, nýbrž i v následcích objevujících se na orgánech. Proti našemu preparátu působil Patočkův toxin po i. v. aplikaci 0,5 cm smrt králíka do 24 hodin. Při pitvě upozorňuje Patočka na mírně zvětšené nadledvinky, což jsme my nezjistili. Viděli jsme naopak poškození jater a myokardu, což Patočka u svých zvířat nepozoroval. Tyto změny jsme nenacházeli u myši inokulovaných živou kulturou v těch případech, kde fatální průběh byl velmi rychlý.

Po zhodnocení všech uvedených vlastností pyogenních korynebakterií zvířecího a lidského původu zdají se přes uvedené vzájemné rozdíly ve svých základních vlastnostech podobné. Tyto nálezy zdají se podporovat Patočkovu domněnku o možném vývoji lidských variant ze zvířecích kmenů přenosem a adaptací na člověka.

S O U H R N

Autoři studovali morfologii, kultivaci, biologii, patogenitu a toxicitu 32 kmenů *Co. pyogenes bovis*, izolovaných z různého patologického materiálu ze zvířat. Srovnávají je s lidskými variantami studovanými Patočkou.

Na rozdíl od Patočky mají všechny kmény výraznou beta hemolysu i za aerobních podmínek. Jsou méně serofilní, silněji proteolytické jak na želatině, tak na koagulovaném seru. Lakmusové mléko okyselují a koagulují rychleji s následnou retrakcí a peptonisací koagula. Uhlohydráty atakují intenzivněji; zkvašují pravidelně glukosu, laktosu, maltosu, škrob a dextrin. Indol, H_2S , acetylmethylkarbinol, urea, KNO_3 a MRT jsou vždy negativní. Všechny kmény jsou enormně citlivé na penicilin a velmi dobře na streptomycin.

Nejnevímavějším zvířetem k infekci je králík a méně bílá myš. Krysa a morče jsou nevímavé.

Hemolytický i letální toxický princip byl uvolněn ve velkých kvantech rozbitím bakterií střídavým zmražením a rozmražením. Koncentrace provedena amonium sulfátem a purifikace dialýsou.

Hemolysin je thermostabilním exotoxinem. Nejvyšší dosažený titer byl 1 : 8192. Teplota 56° C jej ireverzibilně ničí za 5 minut. Podobá se Patočkovu hemolysinu, ale je produkován ve větším množství. Vůči kyslíku je resistentnější a stáním v lednici jeho titer rychle klesá. Nemá vlastnosti letálního toxinu.

Letální složka je relativně thermostabilním endotoxinem. I. v. aplikace 5 ml usmrcuje králíka za 10 dnů za příznaků progresivní kachexie a vzestupných pares s terminální paralýsou. Při pitvě vidíme degeneraci jater a myokardu a histologicky zjišťujeme toxické poškození těchto orgánů. Na rozdíl od Patočkova toxinu působí pozvolněji, ve větších dávkách a odlišuje se účinkem.

Corynebacterium pyogenes bovis se částečně liší od atypických variant izolovaných Patočkou z lidského materiálu.

РЕЗЮМЕ

Corynebacterium pyogenes bovis — сравнение штаммов происходящих от животных с вариантами от человека

Авторы изучали морфологию, культивацию, биологию, патогенность и токсичность 32 штаммов *Co. pyogenes bovis*, изолированных из разного патологического материала от животных. Они сравнивают их с вариантами выделенными из человека, изучаемыми Паточка.

В отличие от штаммов Паточка эти штаммы имеют сильный бета гемолиз даже при аэробных условиях. Они в меньшей степени серофильные, более протеолитические как на желатине так и на коагулированной сыворотке. Они окисляют лакмусное молоко и коагулируют быстрее, с последовательной ретракцией и пептонизацией коагула. Угловоды они атакуют более интенсивно; спраживают регулярно глюкозу, лактозу, мальтозу, крахмал и декстрин. Индол, H_2S , Ацетилметилкарбинол, мочевины, KNO_3 и MRT всегда негативны. Все штаммы в высшей степени чувствительны к пенициллину и очень хорошо к стрептомицину.

Самым восприимчивым животным к инфекции является кролик, менее — белая мышь. Крыса и морская свинка невосприимчивы.

Гемолитический и летальный токсический принцип освобожден в великих количествах разбитием бактерий чередованием замораживания с размораживанием. Концентрация была проведена аммонием сульфатом а пурификация — диализом.

Гемолизин является термостабильным эксотоксином. Самый высокий титр был 1:8192. Температура $56^{\circ}C$ его необратимо уничтожает через пять минут. Этот гемолизин похож на гемолизин Паточка, но он продуцируется в большем количестве. Он является более устойчивым к кислороду и его титр быстро понижается помещением в холодильнике. Он не имеет свойств летального токсина.

Летальная составная часть является относительно термостабильным эндотоксином. I. v. аппликация 5 мг умерщвляет кролика через 10 суток с признаками прогрессивной кахексии и повышающихся парес с терминальным параличем. При вскрытии мы наблюдаем дегенерацию печени и миокарда а гистологически обнаруживаем токсическое повреждение этих органов. В сравнении с токсином Паточка, этот эндотоксин действует медленнее, в больших дозах и отличается эффектом.

Corynebacterium pyogenes bovis отчасти отличается от атипических вариантов изолированных Паточка из материала от человека.

SUMMARY

Corynebacterium pyogenes bovis — A Comparison of the Strains of Animal Origin with Human Variants

The authors have studied the morphology, cultivation, biology, pathogenity, and toxicity of 32 strains of *Corynebacterium pyogenes bovis*, having been isolated from various pathologic material from animals, and they compare them with variants investigated by Patočka.

All strains — what makes the difference from those studied by Patočka — display pronounced beta haemolysis also under aerobic conditions. They are less serophilic, more proteolytic in gellatine as well as in coagulated serum. They acidified and coagulated the litmus milk more rapidly with a following retraction and peptonization of the coagulum. They attack the carbohydrates more intensively. The glucose is regularly fermented by them as well as lactose, maltose, starch, and dextrin. Indol, H_2S , acetylmethylcarbinol, urea, KNO_3 , and MRT are always negative. All strains are extremely sensitive to penicillin and very good for streptomycin.

The animals most sensitive to the infection are the rabbit, and a little less the white mouse. The rat and the guinea pig are insensitive.

The haemolytic and letal toxic factor has been set free in big quantities by disrupting of Bacteria by repeated freezing and thawing. The factor was concentrated by means of ammonium sulphate, and purified by dialysis.

The haemolysin is a thermolabile exotoxin. The highest titre attained was 1:8192. It is destroyed at $56^{\circ}C$ in 5 minutes. It resembles to Patočka's haemolysin, but is produced in higher quantities. It is more resistant to oxygen and after keeping in icebox its titre falls down rapidly. It does not possess the properties of a lethal toxin.

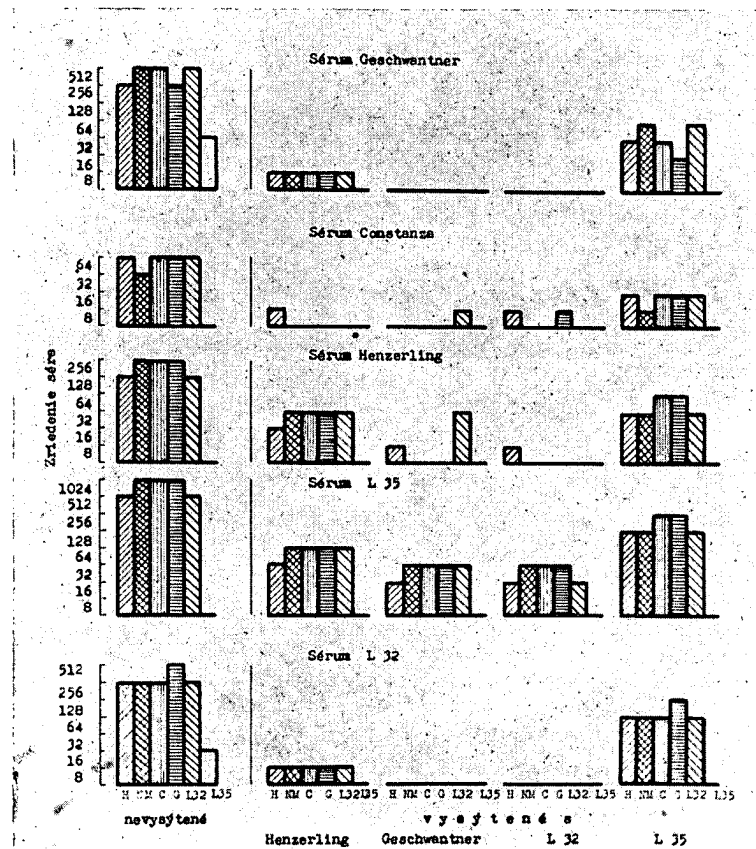
The lethal component is a relatively thermostable endotoxin. I. v. application of 5 ml kills a rabbit in 10 days with symptoms of a progressive and ascendent paresis with a terminal paralysis. When examining post mortem we observe degenerative changes in liver and myocardium, and histologically we find a toxic injury of those organs. Differently from Patočka's toxin, its activity is more protracted, it acts in greater amounts, and the result of its action is different.

The *Corynebacterium pyogenes bovis* differs partly from the atypic variations isolated by Patočka from human materials.

LITERATURA

1. Patočka, F.: Časopis lékařů českých XCIV, 1323, 1955. — 2. Lovell, R.: J. Path. Bact., 45, 339, 1937. — 3. Lowell, R.: J. Path. Bact. 56, 525, 1944. — 4. Merchants, J.: J. Bacteriol. 30, 95, 1935. — 5. Wilson, G. S. — Miles, A. A.: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. Vol. I., 469, 1948. — 6. Ward, A. R.: J. Bacteriol. 2, 619, 1917. — 7. Hewitt, L. F.: J. Path. Bact. 59, 145, 1947.

Oprava
Graf č. 1.



Výsledky absorpcie komplementfixačných protilátok so 4 kmeňmi *C. burneti*.

V 1. čísle tohto ročníka nášho časopisu nedopatrením vypadol z práce Brezina, R., Tábořská, D.: Antigenne vlastnosti kmeňov *C. burneti* izolovaných na Slovensku, na str. 39 graf 1, ktorý uverejňujeme.

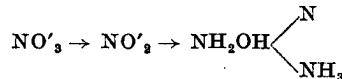
Ústav epidemiologie a mikrobiologie, Praha, ředitel prof. Dr K. Raška

MIKROTECHNIKA PRO RYCHLÉ ZJIŠŤOVÁNÍ REDUKCE NITRÁTŮ

JOSEF MOTTL

Zjišťování redukce nitrátů zavedl na základě svých pozorování do laboratorní praxe Maassen (1) už roku 1902. Od té doby je literatura plna protichůdných nálezů zaviněných většinou nesprávně a neúplně prováděnými testy.

Reakce probíhá podle schématu:



Podle uvedeného schématu probíhá tedy redukce nitrátů přes nitrity až na hydroxylamin a eventuálně dále až na dusík nebo amoniak. Proto v testu nestačí jen zjišťování radikálu $-\text{NO}_2^-$, neboť reakce už může být ve stadiu redukci vzniklého hydroxylaminu, jehož produkce je pro bakteriální redukci nitritů charakteristická [Blom (2), Lindsey a Rhines (3)]. Potom však, přestože nitráty byly zredukovány, nitrity nedokážeme a výsledky označíme nesprávně negativními. Proto je nutno v nepřítomnosti nitritů se vždy ještě přesvědčit o nitrátech, nejlépe podle doporučení ZoBella (1) redukční metodou se zinkem, a teprve v přítomnosti nitrátů můžeme označit kulturu za NO_3^- — negativní. Rychlost průběhu jednotlivých fází celé reakce není vždy stejná a záleží především na délce inkubační doby a aktivitě vyšetřovaného kmene. Inkubační doba u makrotechnického uspořádání testu je 4—5 dní.

Účelem této práce bylo vypracování mikrotechniky pro zjišťování redukce NO_3^- v době co nejkratší a s potřebou minimálního inokula.

M E T O D I K A

Při vypracovávání mikrotechniky jsme vyšli z dřívějších zkušeností a snažili jsme se techniku pro zjišťování redukce NO_3^- založit na stejném principu jako předchozí mikrometody pro zjišťování oxydativní desaminace tryptofanu v diagnostice skupiny Proteus-Providencia (Mottl, Schuh) (4) a tvorby indolu (Mottl) (5).

M e d i u m: Byly zkoušeny 2 půdy. Jednak obyčejný masopeptonový bujon s obsahem 0,1% KNO_3 , tak jak se běžně užívá v makrotestu, jednak pufovaný fyziologický roztok s tímž obsahem dusičnanu.

Během zkoušek však druhé medium ukázalo určité výhody. Především intenzita barevné reakce byla mnohem silnější v bezbarvém a čirém syntetickém substrátu než v zabarveném bujonu. Kromě toho se červená barva vyvíjela zřetelně rychleji, zvláště při redukci zinkem, kde byl rozdíl až 10 minut. Nejzávažnějším důvodem k vyloučení bujonu však, byla možnost nespecificky pozitivních výsledků, které jsme pozorovali někdy u neočkovaných kontrol nebo negativních kmenů (streptokoků). Tyto nespecifické výsledky je možno vysvětlit stopami nitritů v peptonu (Logie) (6) a masové infusi (Jordan a Burrows) (7), z nichž je bujon připravován. Možnost kontaminace syntetického media nitrity nehrozí, použijeme-li chemikálií analytické čistoty.

Složení půdy a příprava: Na_2HPO_4 0,1 g, KH_2PO_4 0,1 g, fyziologický roztok 100 ml. Po rozpuštění upravit pH na 7,2—7,3, povařit v proudící páře 30 minut, sfiltrvat přes papír, přidat 0,1 g KNO_3 a po rozpuštění vsterilizovat 30 min. zahřátím v páře pod tlakem.

Roztok vydrží v lednici asi 14 dní.

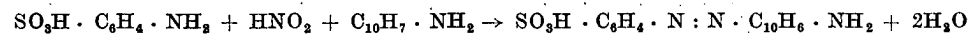
D e t e k č n í s y s t é m: V současné době se nejčastěji užívá k detekci nitritů Griessovy metody, tak jak ji navrhl a do mikrobiologie zavedl Conn a spol. (8) s α -naftylaminem a kys. sulfa-

nilovou (p-aminobenzensulfonovou) nebo metody užívající dimethyl- α -naftylaminu, jak ji doporučil Wallace a Neave (9). Toto druhé činidlo jsme však nemohli vyzkoušet, neboť se nám nepodařilo opatřit dimethyl- α -naftylamin, který se u nás běžně nevyrobí.

Příprava činidla: 0,8 g kys. sulfanilové rozpustíme ve 100 ml zředěné kys. octové (5n-CH₃COOH) a 0,5 g α -naftylaminu rovněž ve 100 ml 5n-kys. octové.

Je-li po rozpuštění roztok α -naftylaminu fialově zabarven, postupujeme při přípravě následovně: 0,5 g substance rozpustíme ve zkumavce s 20 ml vroucí dest. vody a bezbarvý roztok α -naftylaminu odpipetujeme od červenofialového zbytku, který ulpívá v podobě olejovité kapky na dně zkumavky. Odpipetovaný roztok zředíme 100 ml 5n-kys. octové. Oba roztoky (kys. sulfanilové a α -naftylaminu) uchováváme v dobře těsnících lahvičkách z hnědého skla.

Reakce s kys. sulfanilovou (p-aminobenzensulfonovou) a α -naftylaminovým činidlem (α -naftylaminacetát) je velmi citlivá a v přítomnosti aniontu NO₂ vzniká červená barva tvorbou p-sulfobenzenazo- α -naftylaminu:



Při negativní reakci byl zjišťován aniont NO₃⁻ v substrátu pomocí redukce práškovým zinkem.

Pracovní postup: K provedení testu stačí přenést kličkou jedinou kolonii a emulgovat ji v 0,3 ml fosfátového substrátu v aglutinační zkumavce. Inokulum má být dostatečně silné, aby dalo lehkou, ale zřejmou opalescenci tekutině prohlížené proti tmavému pozadí. Absolutní sterilita při práci není nutná, jen relativní je nezbytná. Zkumavka se pak umístí do vodní lázně 37° C přesně na 3 hodiny. Otvor zkumavky se nemusí uzavírat vatovou zátkou, stačí jen přikrýt listem čistého papíru, aby vodní pára, srážející se na viku vodní lázně, neskapávala do zkumavky. Po 3 hodinách se zkumavka vyndá a přidá se po 1 kapce roztoku kys. sulfanilové a roztoku α -naftylaminu. V přítomnosti nitritů se vyvine okamžitě červené zabarvení substrátu, které při zvláště silné reakci pozvolna hnědne. Nejsou-li nitrity přítomny (substrát zůstane bezbarvý), neoznačujeme ještě výsledek za negativní, ale přidáním několika mg práškového zinku (prostého dusitanů) do téže zkumavky se přesvědčíme o přítomnosti dusičnanu v mediu. Je-li dusičnan přítomen, zinek jej zredukuje na dusitan a po chvíli se objeví červené zabarvení. V tom případě je výsledek negativní. Neobjeví-li se zabarvení ani po zinku, znamená to, že redukce už proběhla přes nitrity a výsledek je pozitivní.

Vzhledem k tomu, že reakce je velmi citlivá, musí mít test vždy jako kontrolu jednu neočkovanou zkumavku.

Inkubační doba: V našem uspořádání testu byla průměrná inkubační doba potřebná k dosažení maxima reakce v rozmezí 1–2 hodin. Celá řada kmenů dávala pozitivní výsledek už po několika minutách a jen několik málo kmenů vyžadovalo 2,30 hod. inkubace (tab. 1). Proto 3hodinovou inkubaci považujeme za dostatečnou záruku spolehlivých výsledků.

V Ý S L E D K Y

Tabulka 1.

Kmen	Inkubace								
	0	15'	30'	1 h.	2 h.	3 h.	4 h.	5 h.	
Pseudomonas aeruginosa	1/33	—	—	+	++	+++	++++	++	—
	2/33	—	—	—	++	++++	++++	—	—
	3/33	—	+	++	+++	++++	++++	—	—
	4/33	—	—	—	++	++++	++++	+	—

Výsledky v tabulce 1. ukazují průběh reakce u 4 kmenů pseudomonas, které se během naší práce ukázaly jako nejméně aktivní ve schopnosti redukovat nitráty. Maximum reakce je u 2–3hodinové inkubace. Po této době nitrity rychle mizí, takže je nutno si průběh redukce nitrátů přes nitrity ověřit metodou se zinkem.

Mikrotechnické uspořádání testu bylo prověřeno celkem na 410 sbírkových kmenech.

Kontrolou byl u nás rutinně užívaný makrotest podle Ilosvaye (10) (bujón s 0,1% KNO₃, inkubace 4 dny, 0,5-ml rozt. kys. sulfanilové a 0,5 ml rozt. α -naftylaminu, event. zinek). Jako ne-

gativní kontroly bylo užito streptokoků různých serologických skupin (kromě enterokoků, které jsou NO₃-pozitivní) a vždy ještě jedné zkumavky neočkované.

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 2. a byly ve všech případech identické.

Tabulka 2.

Kmen	Počet kmenů	Mikrotest		Makrotest	
		posit.	neg.	posit.	neg.
Salmonella	30	30	—	30	—
Arizona	22	22	—	22	—
Escherichia (vč. Pc. coliforme)	88	88	—	88	—
Bethesda-Ballerup (vč. Pc. intermedium)	57	57	—	57	—
Klebsiella	37	37	—	37	—
Cloaca cloacae (vč. Pc. aerogenoides)	20	19	1	19	1
Shigella	30	30	—	30	—
Proteus	81	80	1	80	1
Providencia	26	26	—	26	—
Pseudomonas	19	17	2	17	2
Celkem kmenů	410				

DISKUSE

Test na redukci nitrátů je v rámci zjišťování biochemické aktivity mikroorganismů pro časté nesrovnalosti ve výsledcích mnohdy opomíjen. O nespolehlivosti výsledků bylo často diskutováno [ZoBell a Meyer (11), Tittler (12), Conn (8), Wallace a Neave (9)] a vždy se ukázalo, že byla zaviněna nesprávnou testovací technikou.

Nejčastější příčinou je neúplné provádění testu, tak jak jej popisuje na př. Hauduroy (13) a celá řada jiných, bez redukční metody se zinkem. V takovém případě nám uniká 20—30% pozitivních výsledků. Jinou příčinou nesprávných výsledků je použití nevhodných substancí při přípravě testovací pudy a detekčního činidla. Často pepton obsahuje nitrity (Logie) (6) nebo specifický substrát (KNO₃, NaNO₃) je kontaminován stopami nitritů v dostatečném množství, aby byly detegovány citlivým činidlem. V takovém případě dostáváme pozitivní výsledky i u negativních kultur. Rovněž prodloužení inkubace přes 4 dny je příčinou falešně pozitivních reakcí. Jednak Logie (6) dokázal akumulaci stop nitritů v tekutinách vystavených delší dobu účinku vzduchu, jednak je možné, že se nitrity uvolňují následkem autolysy přímo z bakteriálních těl.

Tyto důvody nás vedly především k upuštění od reprodukce jediné mikrotechniky (spíše semimikrometody) pro zjišťování redukce nitrátů, vypracované Bachmannovou a Weaverem (14). Tato metodika vyžaduje použití bujonu jako základního media a velké inokulum (3 plné kličky agarové kultury).

Naše mikrotechnické uspořádání testu se těmito zdroji chyb vyhýbá. Medium neobsahuje pepton ani jiný snáze přístupný zdroj dusíku a inkubační doba je relativně velmi krátká. Při prověřování navržené techniky 410 sbírkových kmeny byly ve všech případech výsledky identické s kontrolním makrotestem (tabulka 2.), i v případě dvou kmenů provisorně určených jako Pr. morgani a Pc. aerogenoides. Oba tyto kmeny dávaly opakovaně negativní výsledky, čímž se lišily od ostatních zástupců těchto skupin. Později provedená revize biochemických vlastností obou kmenů také ukázala, že se nejedná o kmeny patřící do zmíněných skupin.

Při provádění testu, mikro i makrotechnického, dochází někdy při pozitivní reakci k pozvolnému blednutí červené barvy, takže po nějaké době (3—5 minut) je medium opět bezbarvé. Tuto skutečnost pozorovali i jiní pracovníci a Buchanan

s Fulmerem (15) se zmiňují o nápadně velké korelaci mezi nestálostí červené barvy a neschopností testovaného organismu produkovat sirovodík. Proto je nutno reakci odečítat hned po přidání reagensů.

Za technickou spolupráci děkujeme M. Buděšinské.

S O U H R N

Autor popisuje mikroreakci na zjišťování mikrobiální redukce nitrátů pro rutinní diagnostické účely.

Reakce se provádí v 0,3 ml pufovaného fyziologického roztoku s 0,1% KNO_3 a po naočkování se inkubuje 3 hodiny ve vodní lázni. Potom se přidá Griessovo činidlo, 1 kapka rozt. kys. sulfanilové a 1 kapka rozt. α -naftylaminu, event. zinek. Positivní reakce je červená, při negativní zůstane substrát bezbarvý. Absolutní sterilita při práci není nutná.

Mikrotechnika byla prověřena na 410 sbírkových kmenech, převážně z čeledi Enterobacteriaceae.

Р Е З Ю М Е

Микротехника для скорого обнаружения редукции нитратов

Автор описывает микрореакцию на обнаружение микробной редукции нитратов для обыкновенных диагностических целей.

Реакция совершается в 0,3 мл пуфферованного физиологического раствора с 0,1 % KNO_3 и после инокуляции инкубируется в течение 3 часов в водяной бане. Затем добавляется реагент Гриесса, одна капля раствора сульфаниловой кислоты и одна капля раствора α -нафтыламина, при случае цинк. Положительная реакция является красной, при отрицательной — субстрат остается безцветным. Совершенная стерильность при работе не обязательна.

Техника проверялась на 410 штаммах из коллекции, большей частью из семейства Enterobacteriaceae.

S U M M A R Y

Micromethod for Quickly Detecting the Nitrate Reduction

The author describes a micromethod for detecting the microbial reduction of nitrates for the use of routine diagnostic.

The reaction is carried through in 0,3 ml of buffered saline with 0,1 % KNO_3 , and after inoculation the test tubes have to be incubated during 3 hours in water bath. Then the Griesse agent, 1 drop of sulphanil acid solution, and 1 drop of α -naphtylamin solution, eventually zinc, are to be added. The positive reaction is red; when it is negative, the substrate remains colourless. There is no need for an absolute sterility of the manipulation.

L I T E R A T U R A

1. Maassen A., cit. podle: ZoBell C. E., J. Bact., 24:273, 1932. — 2. Blom J., Biochem. Z. 194:392, 1928. — 3. Lindsey G. A., Rhines Ch. M., J. Bact., 24:489, 1932. — 4. Mottl J., Schuh V., EMI, 3:147, 1956. — 5. Mottl J., Čs. epidemiologie, mikrobiologie, imunologie 4:190, 1956. — 6. Logie J., J. Hyg., 10:143, 1910. — 7. Jordan, E. O., Burrows, W.: Textbook of Bacteriology, 14. vyd., str. 16., Philadelphia, 1945. — 8. Conn, H. J., et al.: J. Bacteriol. 3:115, 1918. — 9. Wallace, G. I., Neave, S. L.: Bacteriol. 14:377, 1927. — 10. Ilosvay, L.: Manuel technique, Washington, 1941. — 11. ZoBell, C. E., Meyer, K. F.: Proc. Soc. exp. Biol. Med., 29:116, 1931. — 12. Tittsler, R. P.: J. Bacteriol. 19:261, 1930. — 13. Hauduroy, P.: Microbiologie générale et technique microbiologique, str. 574., Paris, 1947. — 14. Bachmann, B., Weaver, R. H.: Amer. J. clin. Path., 21:195, 1951. — 15. Buchanan, R. E., Fulmer, E. I.: Physiology and Biochemistry of Bacteria, sv. 3., str. 191., London, 1930.

Z PRAXE

Mikrobiol. odděl. KHES v Havlíčkově Brodě
Veterinární středisko, Čáslav

PASTEURELLOVÁ ANGINA

MILOSLAV NEUBAUER, JOSEF DUBEN a ZDENĚK DUBEN

Pasteurella multocida jako vyvolavatel hemoragické septikémie zvířat, mezi nimiž je velmi rozšířena, se vyskytuje u lidí poměrně vzácně, jak o tom svědčí nevelký počet případů uvedených v písemnictví našem i cizím Meyer (1).

U nás popsal případ lidské pasteurellosy flegmonosního typu Patočka a Wagner (2), případ otitidy Blaškovič [cit. podle Rašky] (3). V cizí literatuře se uvádějí nejčastěji onemocnění flegmonosní [Allot a spol. 6 případů po pokousání psem a kočkou] (4). Jiní autoři uvádějí septikémie [Rivoalen] (5) a Sauter (6), často s následnou lokalizací v meningách [Levy-Bruhl (7), Sauter (6), Lewis (8)] nebo v kloubech [Pizey] (9). Případ bronchopneumonie uvádí Ohnesorge a Schroer (10). Gastroenteritis popisuje von Baer (11). Ludlam (12) isoloval *P. multocida* z apendikálního abscesu. První případ bakteriologicky diagnostikované pasteurellosy u člověka uvádí Brugnatelli (13). Anginosní formu, kterou popisujeme, jsme zatím v dostupné literatuře nezjistili. Regamey (14) se sice zmiňuje o Meyerově případě ženy prohlížitele masa, která trpěla zánětem sliznic provázeným tonsilitidou. Z hnisavého obsahu pustulek byla izolována kultivačně *Pasteurella*, která však nebyla prokázána na tonsillách. Blíží druh určení chybí. Ve svém přehledu původců angin neuvádí *Pasteurella multocida* ani Přecechtěl (15, 16), ani Patočka (17).

Počátkem července min. roku byla přijata ušním oddělením OÚNZ v Havlíčkově Brodě 20letá zemědělská pracovnice J. Č. (č. oš. 6108/56) s klinickou diagnosou angina lacunaris. Pacientka udávala bolesti v krku a obtížné polykání. Teplota 39,4° C. Tonsilly byly překrvené, prosáklé, na mediálních plochách byly šedavé povlázky místy splývající. Podčelistní uzliny byly nehmatné. Po aplikaci penicilinu se stav rychle upravoval, povlaky tonsillární ustupovaly a po 5 dnech pacientka propuštěna domů bez potíží.

Kultivačně z tonsillárních výtěrů zjištěny za 24 hodin na krevním agaru vedle málo četných kolonií alfa streptokoků a neisserií četné asi 1/2 mm kolonie připomínající kolonie *H. influenzae*. Endův agar zůstal sterilní. Mikroskopický nález z podezřelých kolonií ukázal drobné g-ovoidní tyčinky až kokobacily uniformního tvaru, bipolárně se barvící s naznačeným pouzdrem. V první subkultuře chyběl satelitní fenomen charakteristický pro *H. influenzae*. Kolonie byly již větší, průměrně 1 mm. Zprvu byly průhledné, později se v centru kalily a okraje byly šedavé. Celkový vzhled kolonií byl mukosně lesklý. Na Endo agaru opět nerostly. V dalších pasážích rostly už daleko lépe, dosahovaly až 3 mm a v blízkosti se slévaly. Mukosně lesklý charakter zůstal zachován. Na Endově agaru vyrůstaly později ve velmi drobných koloniích. V játrovém bujonu jsme pozorovali difusní zákal středního stupně bez blanky, později hustý viskosní sediment. Na želatině byl velmi drobný a pomalý růst podél vpichu. Rovněž šikmý agar vykázal pomalý a slabý růst. Pohyb zůstal negativní při 37° i 22° C.

Isolovaný kmen produkoval kyselinu bez tvorby plynu z glukosy, sacharosy a manitu, kdežto laktosa, maltosa, trehalosa, xylosa, raffinosa, salicin, dulcitol,

inosit, škrob a glycerin zůstaly beze změny. Tvorba indolu, sirovodíku, katalázy a redukce nitrátů byla pozitivní. Lakmusové mléko a MRT beze změny.

Ze 24hodinové bujonové kultury jsme inokulovali dospělé myšce 0,2 ccm i. p. Myška uhynula do 24 hodin na perakutní sepsi bez výrazných orgánových změn. Zpětná kultivace z orgánů byla pozitivní v čisté kultuře. Isolovaný kmen si podržel růst v mukosní fázi i virulenci za půl roku, kdy jsme pokus na myšce opakovali se stejným výsledkem. Meyer uvádí, že mukosní kolonie zůstávají stabilními i po 20 i více pasážích (18).

Mikroskopický nález, souhrn vlastností kultivačních i fyziologických a průkaz experimentální pathogenity svědčí, že izolovaný kmen je *Pasteurella multocida*.

Diferenciálně diagnosticky přichází v úvahu *Pasteurella pseudotuberculosis*, *Haemophilus influenzae* a laktosu nekvasící enterobacteriaceae. *Pasteurella pseudotuberculosis* je pohyblivá. Má negativní indol, alkalizuje lakmusové mléko a podle některých autorů (19) vykazuje lepší růst na Endu. V experimentu vyvolává změny charakterisované jako pseudotuberkulosní. *H. influenzae* je mikroskopicky z kultury velmi polymorfní, potřebuje trvale růstové faktory V a X a biochemicky je za běžných podmínek inaktivní. Od laktosu nekvasících enterobacteriaceí se *P. m.* liší podle Patočky (19) symptomovým triasem: špatným růstem na Endo agaru, negativní laktosou a produkcí indolu spolu s nepohyblivostí. Nověji se prokázalo (20), že většina virulentních kmenů je vedle penicilinu, aureomycinu, chloramfenikolu a polymyxinu B, na které je in vitro dobře citlivá, poměrně rezistentní na streptomycin, neomycin a bacitracin. Potvrzuje to i úspěšná léčba naší pacientky, kde po užití penicilinu se stav rychle upravil, a Patočková zpráva (19), že většina virulentních kmenů *P. m.* je relativně dosti citlivá na penicilin (zkušenost u gramnegativního mikroba poměrně překvapující).

Pasteurellosy jsou typickou a běžnou zoonosou. *Pasteurella multocida* považujeme za velmi rozšířeného mikroba nejen u divoce žijících zvířat, ale i u domácích. Patočka uvádí, že kočky mívají pasteurely v tlamě v 90 % a psi asi ve 30 % (3). Sami jsme ji isolovali velmi často z polních zajíců uhynulých zejména v jarních měsících, ale i ze zajíců klinicky zdravých. Z domácích zvířat jsme měli příležitost zachytit četné kmeny téměř ze všech druhů i z drůbeže. Jako nejzajímavější uvádíme případy zmetání u klisny a krávy v jedné stáji ve dvou dnech. V obou zmetcích byla izolována *P. m.* v čisté kultuře. Rovněž v čisté kultuře byla získána *P. m.* z jater ve dvou případech žloutenky vepřů.

Překvapuje nás, že přes veliké rozšíření *P. m.* mezi zvířaty, dochází k onemocnění člověka relativně vzácně, a to nejčastěji u lidí nejvíce exponovaných, t. j. u chovatelů drůbeže a pěstitelů domácího zvířectva. Mikrobiologická diagnostika hemoragických pasteurellos u zvířat je snadná, poněvadž *P. m.* roste celkem dobře na běžných kultivačních půdách i z materiálu více dní starého. Soudíme však, že diagnostika lidských onemocnění bude daleko obtížnější, poněvadž adaptací na lidského hostitele dochází zřejmě u některých kmenů ke změnám růstového charakteru. Zpomalený růst a růst v trpasličích koloniích, jako u námi izolovaného kmene, jistě stěžují diagnostickou práci. Trpasličí růst je podle Meyera (1) vzácný a je blízký M fázi, do které pasážováním náš kmen přešel.

S O U H R N

Je popsán případ lakunární anginy u zemědělské pracovnice. Vyvolávajícím agens byla *Pasteurella multocida*, rostoucí v primokultuře v trpasličích koloniích, které pasážováním přešly v typickou M fázi. Onemocnění bylo zvládnuto úspěšně penicilinovou terapií.

РЕЗЮМЕ

Пастерелловая ангина

Авторы описывают случай лакунарной ангины у земледельческой работницы. Возбуждающим агенсом была *Pasteurella multocida*, растущая в примокультуре в миниатюрных колониях, которые при помощи пассирования превратились в типичную М фазу. Заболевание было с успехом ликвидировано пенициллиновой терапией.

SUMMARY

Angina due to Pasteurella

The authors describe a case of lacunar angina in a woman working in agriculture, where *Pasteurella multocida* was found as its agent. In primoculture, it was growing in dwarf colonies changing during passages into the typical M-phase. The infection was successfully treated by penicillin.

LITERATURA

1. Meyer, K. F.: *Pasteurella ex Dubos R. J.: Bacterial and Mycotic Infections of Man II. vyd.* 450, 1952. — 2. Patočka, F., Wagner, V.: *Časopis lékařů českých* 82, 997, 1943. — 3. Raška, K.: *Epidemiologie II. vyd.*, 556, 1954. — 4. Allot, E. N., Cruickshank, R., Cyrilas-Williams, R., Glass, V., Meyer, I. H., Straker, E. A. and Tee, G.: *J. Path. Bact.* 56, 411, 1944. — 5. Rivoalen, A.: *Bull. Soc. Path. exot.* 709, 1936. — 6. Sauter, E. K.: *Kinderaerzt. Praxis* 21, 488, 1953. — 7. Levy-Bruhl, M.: *Ann. Méd.*, 44, 406, 1938. — 8. Lewis, M. L.: *Amer. J. clin. Path.*, 3, 241, 1953. — 9. Pizey, M. C. D.: *Lancet*, 324, 1953. — 10. Ohnesorge, Schroer: *Dtsch. med. Wschr.* 1025, 1940. — 11. von Baer, W.: *Zbl. Bakter. Orig.* 390, 1917. — 12. Ludlam, K. G.: *J. Path. Bact.* 56, 307, 1944. — 13. Brugnattelli, E.: *Zbl. Bakter. Orig.* 337, 1913. — 14. Regamey, R.: *Schweiz. med. Wschr.*, 19, 666, 1938. — 15. Přecechtěl, A.: *Třídění a hodnocení angin, Thomayerova sbírka č. 10–11*, 1953. — 16. Přecechtěl, A.: *Sborník streptokokové nákazy*, s. 115, 1954. — 17. Patočka, F.: *Sborník streptokokové nákazy*, s. 196, 1954. — 18. Meyer, K. F.: *Pasteurella v Dubos R. J.: Bacterial and Mycotic Infections of Man II. vyd.* 452, 1952. — 19. Patočka, F. a kol.: *Mikrobiologie spec. I. d. Praha* 1954. — 20. Neter, E.: *Gorzynski, G. A., Cass. W. A., Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 76, 493, 1951.

Cs. epidemiologie,
mikrobiologie, imunologie
VI - 3 - 1957

Hygienický a epidemiologický ústav lékařské fakulty v Brně. Ústav epidemiologie a mikrobiologie
v Praze

ZKUŠENOSTI S PARASITOLOGICKÝM VYŠETŘOVÁNÍM OBYVATELSTVA PROVINCE SEVERNÍ HAMGEN V KOREJI

IKVĚTUŠE BRÁZDOVÁ a EVA ALDOVÁ-KLEČKOVÁ

Chceme seznámit naši odbornou veřejnost se zkušenostmi z oblasti parasitologie, které jsme nashromáždily během dvouleté práce v Koreji. Dr. Klečková zařídila a vedla mikrobiologickou laboratoř československé nemocnice v Čondžinu od května 1954 do května 1955, Dr. Brázdová pokračovala po jejím odjezdu v její práci až do konce r. 1955; kromě této práce zastávala ještě funkci epidemiologa.

Klimaticky je provincie Sev. Hamgen, jejímž hlavním městem je Čondžin, sídlo čs. nemocnice, odlišná od našeho mírného středoevropského pásma. Leží na 40° sev. šířky a tato jižní poloha udává ráz celému podnebí i přes vliv studeného mořského proudu na severovýchodním pobřeží. Nejvyšší letní teplota dosáhla 45° C, nejnižší zimní -32° C. Přejídné období, jaro a podzim, jsou velmi krátké. V červnu, červenci a srpnu — v období dešťů v jižních provinciích — spadne také v provincii Sev. Hamgen značné množství srážek. Toto klima umožňuje místnímu obyvatelstvu pěstování rýže jako hlavního zdroje výživy. Vyjmenované přírodní podmínky umožňují sice výskyt parazitů, ale mnohem větší význam pro stupeň infestace obyvatelstva má nízká hygienická úroveň života. Zvláště nyní po zničující válce, kdy ještě musí Korejci žít v minimálních bytových prostorech bez příslušenství, je šíření infekčních chorob i parazitárních onemocnění velmi usnadněno. Celkovou hygienicko-epidemiologickou situaci zhoršují některé zakořeněné zvyky obyvatelstva, na př. shromažďování lidských výkalů v nekrytých nevelkých nádobách, jejichž okolí bývá vlhké a fekalie znečištěné (významné pro přenos ankylostomiase), dále používání čerstvých lidských výkalů ke hnojení rýže, zeleniny a jiných plodin. Také zvyk, že děti nepoužívají záchodů, vede ke značnému zamoření půdy v okolí domů vajíčky různých helmintů. Výskyt *Taenia solium* je umožňován tím, že pěstování vepří běžící volně po osadách, požírají lidské výkaly a maso pak není při korejském způsobu úpravy důkladně propékáno. Nekryté záchody, používání povrchových vod k vaření, mytí a často i k pití, požívání syrové zeleniny a dále zvýšený výskyt hmyzu jsou základními příčinami rozšíření střevních infekcí,

Tabulka 1.

Stolic celkem vyšetřeno	Nalezená vajíčka helmintů	Positivních	
		počet	%
6094	<i>Ascaris lumbricoides</i>	4112	67,5
	<i>Trichuris trichiura</i>	609	10,0
	<i>Ancylostoma duodenale</i>	360	5,9
	<i>Taenia</i>	71	1,1
	<i>Clonorchis sinensis</i>	6	—
	<i>Strongyloides stercoralis</i>	3	—
	<i>Fasciolopsis buski</i>	1	—

Tabulka 2.

Stolic na amoeb. dysenterii	Nalezené vegetativní formy protozoí	Positivních	
		počet	%
336	<i>Entamoeba histolytica</i>	135	41
	<i>Lambliia intestinalis</i>	12	3,5
	<i>Trichomonas intestinalis</i>	88	26,0

zvláště bacilární a amoebové dysenterie. Rozsáhlá rýžoviště dávají příležitost k množení anofelů a práce v nich znamená také nebezpečí nákazy ankylostomatem. Ve vnitrozemských krajích, kde se hojně požívají polosyroví říční krabi, je zvýšená nemocnost plicní distomatosou. Poměrně řídkým onemocněním v naší přímořské provincii byla jaterní distomatoso (clonorchiasis).

V tab. 1 uvádíme počet námi vyšetřených stolic a pro hlavní helminty stupeň zamoření obyvatelstva.

Kromě seriového vyšetřování stolic ambulantních i hospitalisovaných pacientů jsme vyšetřovali záměrně stolice nemocných, u nichž bylo klinické podezření na amoebovou dysenterii. V přehledu uvádí tyto výsledky tabulka 2.

6094 stolic uvedených v tab. 1 bylo vyšetřeno na přítomnost vajíček helmintů přímou mikroskopií. Kromě toho k získání obrazu skutečného zamoření obyvatelstva bylo vyšetřeno 200 stolic (školní mládež) koncentračními metodami Tellemannovou a Füllebornovou s těmito výsledky:

Ascaris nalezena u 98 % a *Trichuris* u 30 %. Ze 200 stolic horníků z blízkého hnědouhelného dolu, vyšetřovaných Füllebornovou metodou, zjištěno 20 % vajíček *Ancylostoma duodenale* kromě běžných parazitů (*Ascaris* a *Trichuris*).

Čísla získaná námi při použití koncentračních metod odpovídají údajům J. S. Simmonse (Global Epidemiology, 1945), který udává pro Koreu tato procenta zamořenosti: *Ascaris* 95 %, *Ancylostoma duodenale* a *Necator americanus* 25–30 %. Tento autor však neudává ani počet vyšetřených stolic, ani oblast, ve které bylo vyšetřování provedeno.

Při mikroskopické diagnóze sputa na BK jsme vyšetřovali krvavá sputa a sputa nemocných s klinickým podezřením na plicní distomatosu také v nativním preparátu na přítomnost motolice plicní *Paragonima westermani*.

Tabulka 3.

Počet vyšetřených sput		nález vajíček <i>Paragonimus</i> <i>Westermani</i>	%	% z celkového počtu sput
celkem	sputa suspektní na distomatosu			
3893	128	85	66,4	2,2

m a n i. Výsledky jsme uvedli v tab. 3. Naši pacienti byli většinou bývalí vojáci, kteří se infikovali na frontě v oblastech u 38. rovnoběžky a pokud podle anamnestických údajů se nakazili v provincii Sev. Hamgen, pocházeli z vnitrozemského okresu Mjoncong, kde se požívají hojně říční krabi. V celkovém počtu vyšetření na plicní onemocnění však distomatoso v naší provincii činila poměrně nízké procento.

Čs. epidemiologie,
mikrobiologie, imunologie
VI - 3 - 1957

Hematologická laboratoř III. interní kliniky KU v Praze, přednosta akademik J. Charvát

VLIV GAMA GLOBULINU NA MOTILITU LIDSKÝCH LEUKOCYTŮ

H. POLÁK, J. NĚMEC, J. NEUWIRTH, P. BLAŽKOVÁ a Z. ZITA

Převážná většina protilátek je obsažena v gama globulinové frakci sera. Proto se gama globulinu v medicíně používá tam, kde chceme dodáním protilátek umožnit nebo posílit specifické imunitní procesy mezi určitým antigenem a příslušnou protilátkou.

V posledních letech se objevilo několik prací, které se zdály nasvědčovat tomu, že příznivý vliv gama globulinu u infekčních onemocnění nespočívá pouze na dodání protilátek, které jsou v něm obsaženy.

Allgöwer a Süllmann (1950) zjistili, že gama globulinová frakce lidského sera má stimulační účinek na migraci lidských leukocytů *in vitro*. Na základě svých pokusů tito autoři uzavírají, že imunologicky důležitá úloha proteinů, které jsou obsaženy v gama globulinové frakci, je ještě doplněna jejich stimulačním účinkem na leukocyty.

Při sledování vlivu Cohnovy frakce II obsahující takřka výhradně gama globuliny, jsme nezjistili její pozitivní vliv na motilitu dětských leukocytů. (Polák, Poláková, Škvařil, 1956.) Zůstávala však možnost, že se vliv gama globulinů na motilitu leukocytů projevuje jinak u dětí a jinak u dospělých.

Přistoupili jsme proto k pokusům, v nichž jsme sledovali vliv lidského gama globulinu na motilitu leukocytů dospělých lidí, a to jak po jeho přidání *in vitro*, tak po jeho intramuskulární aplikaci.

METODIKA

Pokusy *in vitro*. Ke 2 ml krve smíšené s 2 γ heparinu (NOVO) obsaženého ve 20 mm³ fyziologického roztoku přidáno: 1. 0,2 ml fyziologického roztoku jako kontrola. 2. 0,2 ml roztoku gama globulinu neředěného na průměrnou koncentraci v plasmě. 3. 0,2 ml roztoku gama globulinu, naředěného na 4X koncentraci v plasmě. 4. 0,2 ml roztoku gama globulinu v takové koncentraci, která zvýší obsah gama globulinu po přidání ke 2 ml krve přibližně na dvojnásobek. 5. 0,2 ml roztoku gama globulinu v takové koncentraci, která zvýší obsah gama globulinu po přidání ke 2 ml krve přibližně na čtyřnásobek.

Po protřepání byla krev plněna do silikonovaných komůrek a zpracovávána dále metodikou popsanou v předchozích publikacích (Polák, Poláková 1956). Velikost migrace odečítána pod mikroskopem v thermostabilní komoře za 3, 6 a 24 hodin inkubace. Z každé zkumavky plněny 2 komůrky, ze kterých vzat aritmetický průměr.

Pokusy *in vivo*. Pokusy byly provedeny na 12 zdravých dobrovolnících, ve věku od 16 do 30 let. Z nich bylo 9 žen a 3 muži.

Stanovena kontrolní migrace. Po ní aplikováno 3 ml 10% Gamma-globulinum humanum normale Biogena. i. m. a za 24, 48 hodin a po 7 dnech zjišťovány migrační hodnoty. Migrace odečítána opět za 3, 6 a 24 hodin inkubace.

VÝSLEDKY

V pokusech *in vitro* byly zjišťovány difference motility leukocytů v μ v komůrkách s gama globulinem proti kontrolním migracím. Výsledky hodnoceny nulovým t- testem podle Craméra (1946). Takto byly hodnoceny rozdíly hodnot po 3, 6 a 24 hodinách inkubace. Výsledky jsou shrnuty v tab. 1.

Tabulka 1.

		Kontrola	γ_2	γ_4	2γ	4γ
3 hod. inkubace	n	12	11	11	11	9
	ΔM	1498,0	-14,7	+47,0	-25,0	+4,7
	σ	554,4	135,7	410,2	321,9	105,2
	t		0,34236	0,32224	0,2455	0,1263
	P		0,9	0,9	0,9	> 0,9
6 hod. inkubace	n	12	11	11	11	9
	ΔM	2305,4	+9,5	-33,1	+23,6	-82,2
	σ	578,3	245,0	344,5	235,5	437,7
	t		0,1226	0,30380	0,22923	0,5310
	P		> 0,9	0,9	0,9	0,9
24 hod. inkubace	n	11	11	11	11	9
	ΔM	4344,3	-59,8	+28,8	+71,5	-420,2
	σ	1116,8	304,3	461,8	362,9	611,9
	t		0,62145	0,19718	0,56808	1,9472
	P		0,9	> 0,9	0,9	0,1

Z tabulky 1. vyplývá, že difference ve všech 4 pokusných seriích s přidáním různých koncentrací gama globulinu jsou statisticky neprůkazné.

V pokusech in vivo vzata za základ kontrolní migrace a zjišťovány opět difference za 24 a 48 hodin a 7 dní po aplikaci gama globulinu v příslušných odečítacích intervalech (3, 6, 24 hod.). Výsledky hodnoceny nulovým t- testem. Viz tab. 2.

Tabulka 2.

		Kontrola	za 24 hodin	za 48 hodin	za 7 dní
3 hodiny inkubace	n	12	10	10	8
	ΔM	1498,0	-29,2	-121,2	-91,5
	σ	554,4	630,3	535,6	230,4
	t		0,13897	0,6788	1,0502
	P		0,9	0,9	0,5
6 hodin inkubace	n	12	11	11	9
	ΔM	2305,4	-64,0	-182,2	-157,9
	σ	578,3	746,5	610,8	311,6
	t		0,27235	0,4433	1,4329
	P		0,9	0,5	0,5
24 hodin inkubace	n	11	10	10	8
	ΔM	4344,3	-361,8	-93,1	-355,6
	σ	1116,8	986,3	775,8	549,3
	t		1,1004	0,35998	1,7128
	P		0,5	0,9	0,5

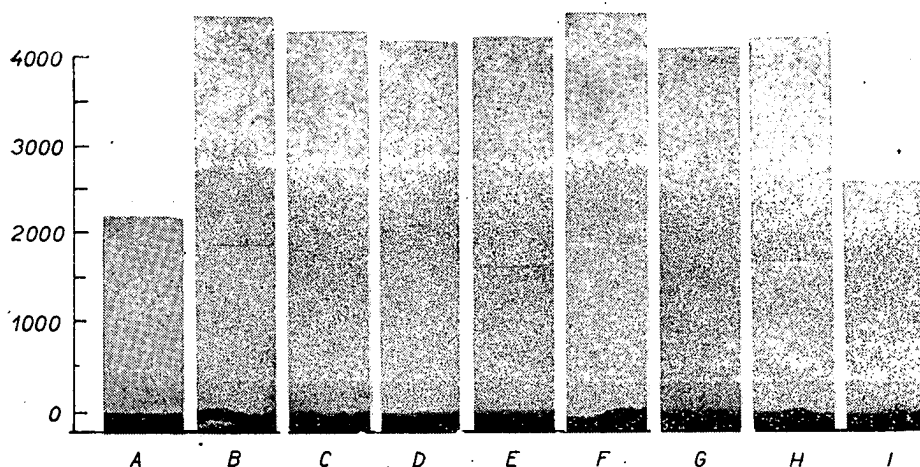
V tabulkách n = četnost, Δ = difference proti kontrolní migraci, σ = standardní deviace, t = hodnota t-testu, P = pravděpodobnost.

Migrace u jedné z pokusných osob po přidání gama globulinu in vitro a po jeho aplikaci in vivo jsou zachyceny na obr. 1.

ROZPRAVA

Úkolem této práce bylo zjistit, zda gama globulin v té formě, v jaké je připravován pro humánní aplikaci, ovlivňuje imunitní stav lidského organismu i jinak než přísunem protilátek. Konkrétně, zda má stimulační účinek na leukocyty.

Friedmann a Schönfeld (1917) zjistili, že při vyřazení sera z prostředí, v němž sledovali motilitu leukocytů, se jejich pohyblivost značně snižuje nebo úplně



Obr. 1.

Mikrofotografie migrací ve sklíčkových komůrkách u pokusné osoby N. H. (23 roků). Zvětšeno 28X. Na ose y velikost migrace v μ . A: kontrola před inkubací bezprostředně po zcentrifugování komůrky. — B: migrace za 6 hodin inkubace, kontrolní stanovení s fysiologickým roztokem. — C: migrace za 6 hodin inkubace po přidání gama globulinu ve stejné koncentraci jako v plasmě. — D: migrace za 6 hodin inkubace po přidání gama globulinu v 4násobné koncentraci. — E: migrace za 6 hodin inkubace po přidání gama globulinu v koncentraci, která zvýší hladinu gama globulinu v testované krvi na dvojnásobek. — F: migrace za 6 hodin inkubace po přidání gama globulinu v koncentraci, která zvýší hladinu gama globulinu v testované krvi na čtyřnásobek. — G: migrace za 6 hodin inkubace za 24 hodin po i. m. aplikaci gama globulinu. — H: migrace za 6 hodin inkubace za 48 hodin po i. m. aplikaci gama globulinu. — I: migrace za 6 hodin inkubace za týden po i. m. aplikaci gama globulinu.

ustává. Obdobné pozorování učinil Merchant (1950), který zjistil, že je motilita leukocytů v Lockeově roztoku mnohonásobně menší než ve vlastní plasmě. Z těchto pokusů vyplývá, že homologní serové bílkoviny jsou nezbytně nutné pro optimální funkční stav leukocytů. Merchant ve svých pokusech rovněž ukázal, že jde o hlubší biologický význam serových bílkovin, neboť k úpravě leukocytárních funkcí nedošlo ani tehdy, byla-li viskóznost vybalancovaného roztoku solí upravena arabskou gumou.

Jestliže na př. Allgöwer a Süllmann (1955) zjistili, že v Tyrodově roztoku dochází ke snížení motility leukocytů, a že se jejich pohyblivost po přidání gama globulinů zvyšuje více než po přidání ostatních plasmatických proteinů, lze z takto uspořádaného pokusu jen ztěžji usuzovat na to, že gama globuliny stimulují migraci leukocytů.

Naše metodika nám umožnila sledovat motilitu leukocytů v celé krvi, t. j. za přítomnosti celého spektra plasmatických bílkovin. Změny, které by nastaly v motilitě leukocytů přidáním gama globulinu za našich experimentálních podmínek, by musely být vyvolány jeho specifickým účinkem na leukocyty a ne normalizačním prostředím.

Jak ukázaly výsledky našich pokusů, nevedlo přidání gama globulinu ke zkoumané krvi in vitro ke zvýšení motility leukocytů. Rovněž v pokusech in vivo nebyly zjištěny změny v motilitě leukocytů.

S O U H R N

Autoři sledovali u 12 dospělých zdravých jedinců vliv humánního gama globulinu na motilitu leukocytů po jeho přidání in vitro a jeho intramuskulární aplikaci.

Zjistili, že jak po jeho přidání in vitro v různých koncentracích v celé lidské krvi, tak po jeho i. m. aplikaci nedochází ke změnám pohybové schopnosti leukocytů.

Р Е З Ю М Е

Влияние гамма глобулина на подвижность лейкоцитов у человека

Авторы наблюдали у 12 взрослых лиц влияние человеческого гамма глобулина на подвижность лейкоцитов после его добавления in vitro и его интрамускулярной аппликации.

Они установили, что как после его добавления in vitro, так и после его i. m. аппликации изменения подвижности лейкоцитов не встречаются.

S U M M A R Y

The Influence of Gamma-Globulin on the Motility of Human Leucocytes

The influence of human gamma-globulin exercised on the motility of leucocytes was investigated after its adding in vitro and after its intramuscular application.

The authors found that nor its addition in vitro in various concentrations into human blood, nor its intramuscular application lead to any changes of the motility of leucocytes.

L I T E R A T U R A

Allgöwer, M., Süllmann, H.: *Experientia*, 6:107, 1950. — Cramér, H.: *Mathematical Methods of Statistics*, Princeton, Princeton University Press, 1946. — Friedeman, N., Schönfeld, A.: *Biochem. Z.*, 80:312, 1917. — Merchant, D. J.: *J. inf. Dis.* 87:275, 1950. — Polák, H., Poláková, K., Škvařil, F.: *Čs. pediatrie*, 11:464, 1956. — Polák, H., Poláková, K.: *Če. pediatrie*, 11:321, 1956.

Krajská hygienickoepidemiologická stanice KNV Praha

MYKOLOGICKÉ NÁLEZY VE SPUTU PŘI PLICNÍ TUBERKULOSE

O. ABSOLONOVÁ, P. FRÁGNER a V. PATERA

První případy plicní kandidosy popsal Castellani (1905) na Ceyloně, Boggs a Pincoffš (1915) v USA. Pózdější práce jsou od Steinfelda (1924), Törnella (1946), u nás Viklického, Vorreitha, Ningerové, Pospíšila, Vlčka a jiných. Candidu albicans nalezl Rossier ve sputu u 10 % zdravých osob, Viklický u 29 %. Trágerová uvádí pozitivní nálezy při kataru horních cest dýchacích u 63 % pacientů. Častější nálezy udává písemnictví při těžkých, kachektisujících chorobách (tuberkulóza, karcinom) a zvláště u lidí starších.

(Blíže údaje o kandidosách — zvláště pak klinické obrazy, terapii a seznam písemnictví — nalezne čtenář v monografii Obrtela a spol.: Onemocnění vyvolaná kvasinkovitými mikroorganismy, Stát. zdrav. nakl. 1956, Praha.)

V tomto sdělení chceme se zabývat mykologickými nálezy ve sputu tuberkulosních pacientů u nás, především se zřetelem k výskytu *C. albicans*.

V únoru až květnu 1955 vyšetřovali jsme sputum 125 tuberkulosních*) pacientů, mikroskopicky i kultivačně.

Naším nejčastějším nálezem mykologickým byla *Candida albicans* (Robin Berkhout (62 nálezů); na druhém místě různé jiné kvasinkovité mikroorganismy (61 nálezů), na třetím pak saprofytické plísňe vláknité (31 nálezů). Jejich výpočet uvádíme v tabulce 1.

Počet vzorků pozitivních a negativních je uveden v tabulce 2.

Candida albicans byla tedy zjištěna ve sputu poloviny všech vyšetřovaných pacientů. Její nálezy rozdělili jsme podle množství zárodků v 1 ccm sputa do tří skupin (tabulka 3.)

Tabulka 1.

Nálezy	Počet nálezů
<i>Candida albicans</i>	62
<i>Candida tropicalis</i>	8
<i>Candida pulcherrima</i>	2
<i>Candida parapsilosis</i>	1
<i>Candida sp.</i>	2
<i>Torulopsis glabrata</i>	13
<i>Saccharomyces sp. div.</i>	22
<i>Geotrichum candidum</i>	13
<i>Penicillium sp. div.</i>	26
<i>Blastotrichum sp.</i>	1
<i>Hormodendrum resinae</i>	1
<i>Verticillium sp.</i>	1
<i>Aleurisma sp.</i>	1
<i>Mucor globosus</i>	1
Celkem	154

*) Děkujeme za spolupráci MUDr J. Halaškovi, řediteli tuberkulosní léčebny v Prosečnici, v jehož ústavě se vyšetřování provádělo.

Nálezů ojedinělé, až 300 zárodků na 1 ccm sputa, považujeme za nálezy náhodné; u infekcí přes 10 000 zárodků/lccm se domníváme, že *C. albicans* se jistě účastňuje chorobného procesu; nálezy 350–10 000 z/ccm jsou nám nejasné. Pokud byla prováděna bronchoskopie, sledujeme u pacientů s nálezy vyššími než 1000 z/ccm význačné nespecifické změny na sliznici trachey a bronchů.

Tabulka 2.

Nález	Počet vzorků
<i>Candida albicans</i>	62
Jiné mykologické nálezy	30
Negativní	33
Celkem	125

Všechny vyšetřované pacienty jsme rozdělili podle věkových skupin (tabulka 4.). Porovnáme-li procenta výskytu *C. albicans* u pacientů různého stáří (tabulka 5.), vidíme, že nálezy se pohybují kolem 45 až 55 %. Nezdá se proto, že by šlo o patrnější závislost výskytu *C. albicans* na stáří tbc pacientů.

Tabulka 3.

Skupina	Počet zárodků <i>C. albicans</i> na 1 ccm sputa	Počet vzorků
I.	Ojedinělé až 300	22
II.	300 až 10 000	33
III.	více než 10 000	7
	Celkem	62

Ze soustavy, uspořádané podle pohlaví pacientů (tab. 6.), je patrné, že *Candida albicans* byla nalezena asi u 44% mužů a 61% žen; ostatní mykologické nálezy jsou však naopak u mužů častější: 19% vzorků sputa s nálezem jen kvasinovitých organismů (jiných než *Candida albicans*) připadá na muže a jen asi 2% na ženy. Pro úplnost poznamenáváme ještě jednu zajímavou zkušenost. Při tomto i jiných šetřeních jsme zjistili, že *Candida tropicalis* (*Cast.*) Berkhout doprovází

Tabulka 4.

Věková skupina	<i>C. albicans</i>			<i>C. albic.</i> celkem	Jen jiné kvas. org.	Jen vláčk. plísň	Negat.	Celkem
	I	II	III					
do 20 let	1	—	—	1	1	1	1	4
21–30 let	7	9	—	16	4	1	8	29
31–40 let	4	9	2	15	4	4	8	31
41–50 let	6	10	3	19	5	3	9	36
51–60 let	4	5	2	11	4	3	6	24
nad 60 let	—	—	—	—	—	—	1	1
Celkem	22	33	7	62	18	12	33	125

Tabulka 5.

Věková skupina	Počet nálezů C. albicans	Počet všech vyšetřených	%
do 20 let	1	4	25,0
21—30 let	16	29	55,2
31—40 let	15	31	48,4
41—50 let	19	36	52,6
51—60 let	11	24	45,8
nad 60 let	—	1	—
Celkem	62	125	

Tabulka 6.

	C. albicans			C. albic. celkem	Jen jiné kvas. org.	Jen vlák. plísň	Negat.	Celkem
	I	II	III					
Muži	12	22	4	38	17	9	22	86
Ženy	10	11	3	24	1	3	11	39
Celkem	22	33	7	62	18	12	33	125

skoro pravidelně *C. albicans* a jen vzácně bývá nálezem samostatným. Poměr množství *C. tropicalis* ku *C. albicans* ve sputu bývá 1 : 10 a je pozoruhodně stálý při opakovaných vyšetřeních i během terapie.

Závěrem lze říci, že jsme stanovili nejběžnější mykofloru ve sputu tuberkulosních pacientů. Překvapující je častý nález *C. albicans* (50%). Pokoušeli jsme se nalézt nějaké souvislosti s klinickým obrazem onemocnění s dosavadní terapií (antibiotika) a anamnesou pacientů. Tyto souvislosti se však nepodařilo nalézt a rovněž epidemiologické šetření v léčebně a pokusy s aeroskopem v pokojích nemocných neobjasnily 50% výskyt *C. albicans* u pacientů.

S O U H R N

U 50% (ze 125) nemocných plicní tuberkulosou byla ve sputu kultivačně prokázána *Candida albicans* (Robin) Berkhout 1923 v různém množství. Souvislosti s klinickým obrazem a průběhem onemocnění, jakož i s dosavadní terapií a anamnesou pacientů nebyly nalezeny.

P E З Ю М Е

Микологические находки в мокроте при легочном туберкулезе

У 50% (из 125) больных легочным туберкулезом было доказано культуральным образом присутствие *Candida albicans* (Robin) Berkhout 1923, в разном количестве. Связи с клинической картиной и течением заболевания, как и с до сих пор существовавшей терапией и анамнезом больных не были найдены.

S U M M A R Y

Mycological Findings in Sputum of Patients with Lung Tuberculosis

In the sputum of 50% (from the total number 125) of patients with lung tuberculosis *Candida albicans* (Robin) Berkhout 1923 was proved by cultivation in various quantity. No connections with the clinical feature and the course of the illness, nor with the existing therapy and patient's history were found.

Parazitologická laboratoř KHES České Budějovice

ONDATRA PIŽMOVÁ RESERVOÁREM LEPTOSPIR
V ČSR

J. VOŠTA

V posledních letech na celém světě, i u nás, stává se výzkum leptospiros, typických antropozoonos, středem pozornosti a zájmu četných pracovníků. Proto jsou prováděna v endemických oblastech pečlivá leptospirologická šetření, zaměřená k odkrytí nových rezervoárových zvířat a zachycení nových domácích kmenů.

V rámci dlouhodobého leptospirologického výzkumu v již. Čechách vyšetřili jsme v říjnu 1956 na leptospiry 73 kusů ondatery, z nichž bylo šest pozitivních.

Roku 1905 k nám kníže Colloredo Mansfeld ze severní Ameriky dovezl 3 samičky a 2 samce ondatry pižmové (*Ondatra zibethica* L.) a vysadil je na dobříšském panství. V neuvěřitelně krátké době rozšířila se ondatra pižmová tak, že roku 1938 vyskytovala se už na území 200.000 km². Její rychlé rozšíření bylo umožněno silným množením, sklonem ke stěhování a nedostatkem nepřátel, neboť v úvahu přicházejí pouze liška, tchoř, výr a jestřáb. Ondatra pižmová žije ve stojatých vodách bohatých na rostlinstvo, z nouze však obývá také klidná, rákosím zarostlá ramena řek, kde se živí výhradně vodními rostlinami a jenom výjimečně sáhne po zvířeti. Je ovšem dokázáno, že ondatry požirají škeble. Mohou způsobit velké škody, které však nevznikají požíráním rostlin, nýbrž jejich hrabáním. Ondatra dělá totiž chodby mnoho metrů dlouhé, které vedou celým během. Hráze rybníků bývají často tak proděravělé, že se protrhnou. Následek toho jsou velké ztráty ryb. V září nebo říjnu staví si ondatry na zimu ve vodě hradíště z rákosy, přesličky, puškvorce a kusů bláta v průměru asi dva metry. Vrcholek převyšuje hladinu až o metr. Tato stavba je pravděpodobně budována a obývána členy jedné rodiny a slouží jako ochrana před zimou a zároveň jako zásobárna. Na podzim a na jaře ondatra se stěhuje, však nikoli z nedostatku potravy nebo přemnožení, nýbrž zřejmě pro svůj stěhovavý pud. Doba vrhu u ondatry je od dubna do října, až na výjimky, a množí se velmi silně, neboť má až čtyři vrhy po 2–14 mladých.

Nález leptospir u ondatry u nás uvádějí V. a M. Jelínkové v práci »Rozšíření leptospiros v různých částech ČSR« bez bližších údajů. Leptospiry u ondatry byly nalezeny také v Polsku při leptospirologické akci u Lublina a také v Bulharsku (Parnas a Angelov, ref. na Mezinárodním mikrobiol. sjezdu v Praze r. 1956). Tím se řadí ondatra pižmová (*Ondatra zibethica* L.) k jiným členům podčeledi *Microtinae* známým již dříve jako rezervoár leptospir.

Materiál 73 kusů ondatery jsme získali od sběračů národního podniku »Sběrné suroviny« v Českých Budějovicích a pocházel z rybníků kolem Třeboně. Všechna zvířata byla vyšetřena na leptospiry mikroskopicky (nativní preparát), serologicky, histologicky a kultivačně.

Ondatra <i>zibethica</i> L.	Mikrosko- picky	Serologicky		Histologicky	Kultivačně
		L. grippothy- phosa 44 kmen Turňa, kmen Hluboká 55	L. bovis		
č. 1	neg.	1 : 5000	1 : 1000	+	neg.
č. 4	neg.	1 : 20000	1 : 5000	+	neg.
č. 6	neg.	1 : 40000	1 : 20000	+	neg.
č. 9	neg.	1 : 40000	1 : 20000	+	neg.
č. 33	neg.	1 : 5000	1 : 100	neg.	neg.
č. 64	neg.	1 : 1000	1 : 100	+	neg.

Pro serologické vyšetření jsme sterilně vypreparovali srdíčko, které jsme vložili do zkumavek s 2 cc m 0,9% fys. roztoku, čímž jsme získali přibližně ředění 1 : 10. K serologickým reakcím jsme použili těchto kmenů: *L. icterohaemorrhagiae* kmen Lebe a Fryšava, *L. grippotyphosa* kmen Turňa a Hluboká 55, *L. bovis*, *L. sejroe*, *L. canicola* C7, *L. pomona* kmen Mezzano, *L. mitis*, *L. australis* A, *L. hyos*. Serologicky bylo pozitivních šest zvířat, na *L. grippotyphosa* za koagulinace *L. bovis* v nižším titru.

Kousky ledvin, fixované v 10% formalinu, byly zpracovány histologicky stříbrčící metodou Levaditiho v modifikaci Dobellově. Histologicky bylo pozitivních pět ledvin.

Mikroskopické vyšetření suspence ledvin v zástinu bylo negativní. Také kultivace kousku ledvin v Korthoffově půdě založené ze všech zvířat měly negativní výsledek. Negativní výsledek kultivací byl však jistě ovlivněn tím, že zvířata nebyla ke zpracování dodána ihned po odchytu. Z technických důvodů to nebylo možné.

Z Á V Ě R

Vyšetřili jsme celkem 73 kusů ondatry pižmové (*Ondatra zibethica* L.), z nichž bylo šest pozitivních serologicky na *L. grippotyphosa* při koagulinaci *L. bovis* v nižším titru. Pět zvířat bylo pozitivních histologicky. Vyšetření mikroskopické a kultivační bylo negativní hlavně pro pozdní dodávání chycených zvířat. Tím se stává ondatra pižmová, která se setkává na svých lokalitách v jižních Čechách s jinými členy podčeledi *Microtinae*, známými leptospirovými reservoáry (*Microtus agrestis*, *Arvicola terestris*), reservoárem leptospiry *L. grippotyphosa*.

S O U H R N

Vyšetřili jsme na leptospiry 73 kusy ondatry pižmové (*Ondatra zibethica* L.) mikroskopicky, serologicky (aglutinace — lyse), histologicky a kultivačně. Šest zvířat bylo pozitivních serologicky na *L. grippotyphosa* při koagulinaci *L. bovis* v užším titru, pět histologicky.

Р Е З Ю М Е

Ondatra zibethica L. — резервуар лептоспир в Чехословакии

Мы исследовали 73 штуки *Ondatra zibethica* L. микроскопическим, серологическим (агглютинация — лизис), гистологическим и культивационным методами на присутствие лептоспир. Шесть животных были позитивны серологически на *L. grippotyphosa* при коаггутинации *L. bovis* в невысокий титр, пять — гистологически.

S U M M A R Y

Ondatra zibethica L. as a Reservoir of Leptospirae in Czechoslovakia

The presence of Leptospirae in 73 individuals of *Ondatra zibethica* L. was investigated on the microscopical, serological (agglutination — lysis), and histological way and by cultivating. In six animals, antibodies (agglutination — lysis) against *Leptospira grippotyphosa* were found by the serological investigation. Five animals were histologically positive.

L I T E R A T U R A

Barták, F., Pokorný, B.: Leptospiry u hrabošů v pánvi českobudějovické v roce 1949. — Věstník Čs. zoologické společnosti XV., 1951. — Gerber, R.: Nagetiere Deutschlands. Akademische Verlagsgesellschaft, Geest u. Portig K.-G., Leipzig 1952. — Jelínek, V., Jelínek, M.: Rozšíření leptospiros v různých částech ČSR. Sborník ČSAZV, řada B, č. 6, 1954, str. 721—730. — Jírovec, O., Pokorný, B.: Další zprávy o leptospirách v Čechách a na Moravě v letech 1944—48. Praktický lékař, č. 13, 1949. — Kathe, J.: Z. Immunitätsf. Bd. 103, 1943, Heft 1. — Kmety, E.: Bratislavské lékařské listy, r. XXXI, str. 118, 1951. — Kmety, E.: Zbl. Bakter. Orig. 161, r. 1954. — Kmety, E., Chylo, E., Kratochvíl, J.: M. agrestis reservoár leptospir v přírodě. Zool.-entomologické listy, č. 4, r. 1955. — Mucha, V.: Poľná horúčka na Slovensku. Bratislavské lékařské listy, roč. XXIV, soš. 1, 1944.

Katedra mikrobiologie Lékařské fakulty hygienické Karlovy university v Praze, přednosta doc. MUDr. Jiří Sedlák — Klinika nemocí vnitřních Lékařské fakulty hygienické Karlovy university v Praze, přednosta prof. MUDr. Vratislav Jonáš

PRÍSPĚVEK K DIAGNOSTICE A THERAPII POSTDYSENTERICKÉ ARTRITIDY

JIRÍ SEDLÁK a VĚRA DVORÁKOVÁ

Je celkem známou skutečností, že akutní shigellosa (bacilární dysenterie) bývá v mnohých případech provázena artralgiemi přechodného rázu, které ustupují ve stejném časovém sledu jako dominující střevní symptomy tohoto onemocnění. Artralgie představuje v takovém případě jeden ze symptomů klinického obrazu akutní shigellosy. Naproti tomu pojem »postdysenterická artritida« (23) zůstává vyhrazen pro kloubní projevy shigellosy, která z jakýchkoli příčin přešla z akutního stadia do stadia chronického. Bei glöck (1) tuto komplikaci chronické shigellosy nazývá celkem výstižně »Ruhreumatismus«. Obecně jsou postdysenterické artritidy řazeny do velké skupiny t. zv. infekčních artritid.

Výskytu tohoto typu artritid ve válečných a poválečných letech si všimla celá řada autorů (4, 5, 9, 13, 23, 24). Chaudhuri (7) a někteří jiní autoři ji pozorovali jen v průběhu některých epidemií shigellos. Frekvenci výskytu této komplikace u shigellos vůbec odhaduje Dorendorf (2) na 0,27%, Schittelhelm a Schlecht (19) na 1–2%, Roemheld (9) a jiní dokonce až na 10%.

Chaudhuri a Kušeleviskij (7, 9) se shodují v tom, že postdysenterických artritid v posledních letech zřetelně ubylo. Tento pokles se datuje od doby, kdy do léčby akutních shigellos byly zavedeny sulfonamidy. Nasvědčuje tomu přímá souvislost postdysenterického postižení kloubů s poznanou či nepoznanou chronickou shigellosou. Chronická shigellosa probíhá, jak známo, pod klinickým obrazem chronické kolitidy někdy až ulcerosního charakteru. Jsou rovněž dobře známy obtíže, se kterými je spojena izolace shigell ze stolic těchto nemocných, stejně jako obtíže spojené s diagnosticky hodnotitelným průkazem specifických protilátek v jejich seru. Proto diagnostika postdysenterických artritid není prosta určitých obtíží a rozpaků, obzvláště v případech klidového období chronické shigellosy, kdy klinik na toto základní onemocnění ani nepomýšlí.

České písemnictví o postdysenterických artritidách je nápadně chudé. S výjimkou Pelnářovy — Lenochovy, Vanýskovy stati a Raškovy stručné zmínky v jeho monografii, jsme nenašli žádnou českou nebo slovenskou práci o tomto tematě.

Dokladem toho, že se i u nás můžeme setkat s postdysenterickými artritidami, je pozorování, jehož popis a rozbor jsme si vzali za podklad tohoto sdělení. Domníváme se, že postdysenterické artritidy nejsou a v blízké budoucnosti zcela určitě nebudou ani u nás takovou vzácností, aby byly předmětem unikátních kasuistických sdělení.

VLASTNÍ POZOROVÁNÍ

Ing. J. Š., 32letý muž byl přijat dne 20. 2. 1954 na naši kliniku. V dětství mival časté otitidy, úraz páteře, v 19 letech otřes mozku a ve 28 letech ischias. Asi 14 dní před přijetím na kliniku dostal nemocný po požití jablek střevní koliku s hlenokrvavým průjmem. Tytéž obtíže měl v posledním roce již opětovaně a to právě po požití ovoce. V dalším týdnu po odeznění střevních příznaků se dostavila nápadná únavnost, teploty kolem 37,7–38,2° C a konečně prudké bolesti v levém kolenním kloubu, které se rychle stupňovaly do té míry, že nemohl chodit. Pro selhání terapie salicylamidem byl tedy lékařem doporučen do našeho nemocničního ošetřování.

Status praesens.

Pacient vyšší postavy, dobré výživy, dobře vyvinuté kostry a svalstva. Fysikální nález na srdci, na plicích a na orgánech dutiny břišní byl normální. Tlak krevní 120/80, lehká tachykardie kol. 90/min.

Levé koleno oteklé, značně bolestivé, pohyblivost v něm takřka žádná. Kůže normální, není zarudlá ani teplá. Ostatní klouby nejevily význačnějších změn.

Rtg nález na obou kloubech kolenních v mezích normy. Rektoskopický nález typický pro chronickou kolitidu.

V průběhu choroby byly bolesti v kloubech skoro trvalé, remise byly vzácné a krátké. Bolesti měly stěhovavý ráz, objevily se v pravém kolenu, v levém kloubu hlezenním a v drobných kloubech jednotlivých prstů vlevo, nejvíce však byly postiženy levé koleno a levý kloub hlezenní, z kloubů význačněji postižených se během dalšího léčení projeví bolesti v pravém kloubu sternoklavikulárním a levém kloubu čelistním.

Subfebrilní teploty byly takřka trvalým projevem onemocnění.

Z laboratorních vyšetření uvádíme: Značně zvýšenou sedimentaci — až 107 za 1 hodinu, krevní obraz: Er 4,800.000, Hb 90, leukocyty 9300, Eo 2, Seg 79, Ly 13, Mo 6. Chemický i mikroskopický nález v moči v mezích normálu. Fibrinogen 660 mg%. Při opakovaném běžném bakteriologickém vyšetření stolice byly vesměs prokázány běžné serotypy E. coli, Streptococcus faecalis a Aerobacter aerogenes. Bakteriologický nález zůstal nezměněn i při pozdějším soustavném a záměrném vyšetřování zaměřeném na izolaci některého ze serotypů shigell. Rovněž serologický průkaz antishigellových agglutininů při užití běžné metodiky (s použitím komerčních antigenů) byl opětovaně negativní.

Za pobytu na klinice se objevovaly kromě kloubních příznaků, jež stály v popředí klinického obrazu, občasné krátkodobé střevní koliky a průjmy, zpravidla po požití ovoce a hlavně jablek. Tyto příznaky odpovídaly předpokládané chronické kolitidě a proto také jsme je z počátku nespojovali se základním onemocněním, pro které byl nemocný na naši kliniku přijat. Původnímu klinickému dojmu odpovídala i naše počáteční terapie, více méně symptomaticky zaměřená. Aplikovali jsme postupně preparáty salicylové, ACTH, Kortison a penicilin s úspěchem málo výrazným.

Poměrně nejlepší terapeutický efekt jsme pozorovali po Acylpyrinu. Jeho analgetický účín se projevil tak, že nemocný pomocí hole mohl alespoň částečně chodit. Salicyl stejně jako penicilin však vůbec neovlivnily teplotu. V tomto směru se ACTH v infusi uplatnil nesporně lépe. Jeho analgetický účín byl sice nepatrný, ale během jeho aplikace byl nemocný prakticky apyretický. Působení Kortisonu bylo podobné, ale ve srovnání s ACTH nepoměrně slabší. Penicilin pro intoleranci a neúčinnost jsme brzy z terapie vyloučili. Stav nemocného po této několikátýdenní terapii byl jen zcela nepatrně zlepšen proti stavu při přijetí. Bolesti kloubů trvaly dále, stejně jako subfebrilita a těstovité infiltry levého kolenního a hlezenního kloubu. Chůze byla obtížná, a to jen pomocí hole.

V tomto období diagnostických a terapeutických rozpaků jsme si všimli jednoho nápadného zjevu. Zhoršení kloubních obtíží se totiž objevovalo v přímé souvislosti s akutní exacerbací chronické kolitidy. Podání sulfaquanidinu sice příznivě ovlivnilo střevní symptomy, ale současně i přechodně zvýšilo kloubní obtíže nemocného. Tuto paradoxní reakci jsme chápali jako obdobu J a r i s c h - H e r x h e i m e r o v y reakce. Zhoršení artralgií při zlepšených obtížích střevních jsme si vykládali jako vliv endotoxinů uvolněných specifickou terapií.

Kromě toho dalším anamnestickým šetřením jsme zjistili, že náš nemocný přestál zhruba před rokem na vojenském cvičení s řadou dalších záložníků akutní střevní infekci s tenesmy a hlenovitými průjmy se značnou příměsí krve. Onemocnění tehdy nehlásili z obavy před oddílovou karanténou, která by je byla vyloučila z nedělních dovolených. Od té doby mival střevní koliky s tenesmy a průjmy, které zpravidla spontánně odezněly. Jejich vznik přičítal nesnášenlivosti syrového ovoce, hlavně jablek, a proto také v této záležitosti nikdy nevyhledal lékaře.

Tyto skutečnosti nás vedly k závěru, že se jedná o infekční artritidu na podkladě nepoznané a neléčené chronické bacilární dysenterie. K laboratornímu potvrzení této klinické diagnózy jsme použili všech dnes známých způsobů přímého kulturačního průkazu shigell, průkazu specifických serových agglutininů

a konečně i kožních alergických testů. Výsledky tohoto šetření jsou shrnuty v tabulce.

Tabulka. Ing. J. Š., 32 r., dg: Arthritis postdysenterica, colitis chron. shigellosis chron. susp.

Způsob vyšetření	Metoda	Výsledek
Stolice kultivačně	V období od 22. 11. 54 do 20. 3. 55 vyšetřováno celkem 22 × v klidovém stadiu i ve stadiu umělé exacerbace. Použita média kultivační: DC agar, Endo-agar, krevní agar.	Vesměs: E. coli běžných serotypů Streptococcus faecalis Aerobacter aero. genes Shigella neprokázána.
Serum modif. Widal	Antigen a titr agglutinační Sh. shigae 0 Sh. schmitzi 0 Sh. parashigae 1-4 0 Sh. flexneri 1-6 0 Sh. flexneri X a Y 0 Sh. boydi 1 0 Sh. boydi 2 0 Sh. boydi 3 1 : 160 Sh. boydi 4 0 Sh. boydi 5 0 Sh. boydi 6 0 Sh. boydi 7 0 Sh. boydi 8 0 Sh. boydi 9 0 Sh. sonnei SR 1 : 40 Polyval. antigen Sh. flexneri (komerční) negat. Polyval. antigen Sh. sonnei (komerční) negat.	
Alergické kožní testy (0,1 ml intrakut.)	Pravé předloktí 1. kontrola (bledý erythem 1 × 2 cm) 2. Boyd 50.000 (bledý erythem 2 × 3 cm) 3. Boyd 100.000 (bledý erythem 4 × 4 cm) Levé předloktí: 1. Sonne 50.000 (bledý erythem 2,5 × 2 cm) 2. Sonne 100.000 (bledý erythem 2,2 × 2 cm)	

Z tabulky jasně vysvítá, že přímý kultivační průkaz shigell se nám nezdařil; což není žádnou překvapující skutečností. Isolace shigell ze stolic chronických dysenteriků, na rozdíl od akutně nemocných, je stále velkou vzácností, bez ohledu na to, zda kultivujeme v klidovém stadiu či ve stadiu akutní exacerbace. Jedním z hlavních zábranných faktorů úspěšné kultivace shigell v těchto případech je přítomnost specifického bakteriofaga ve stolici chronických dysenteriků. Daleko lehčeji podaří se ze stolic těchto nemocných izolace bakteriofaga, čehož je možno využít jako nepřímého diagnostického testu [S e d l á k] (17).

Serologické vyšetření spolu s alergickými kožními testy a s anamnestickými údaji však potvrdily, že náš nemocný s pravděpodobností, hraničící s jistotou, prodělal před rokem akutní shigellosu, vyvolanou u nás méně běžným serotypem Sh. boydi 3, která nebyla rozpoznána, tedy ani léčena a která v důsledku toho přešla do chronického stadia.

V této souvislosti zbývalo vyřešit pouze poslední otázku, a to, do jaké míry souvisí celkem subjektivně i objektivně klinicky málo výrazná postdysenterická kolitida s klinicky výraznou a běžně terapii vzdorující artritidou. Odpověď na

tuto otázku celkem jednoznačnou nám dal výsledek dosažený vakcinou, připravenou z kmenů Sh. boydi 3 a Sh. sonnei.

Vakcína byla připravena běžným způsobem. Spláchnutím agarových kultur kmenů Sh. boydi 3 a Sh. sonnei fyziologickým roztokem byly získány suspence a kmeny usmrceny teplem (56° C po dobu 30 minut). Suspence byly dále smíchány v poměru 4:1 (Sh. boydi: Sh. sonnei). Po centrifugaci byla směs resuspendována do 0,5% fenolfyziologického roztoku a rozdělena à 1 ccm do 30 ampulek, v nichž densita stoupala v geometrické řadě. První ampulka obsahovala zhruba 10.000 zárodků v 1 ml, stoupali jsme až do dávky zhruba 160 mil. zárodků v 1 ml, kterou jsme nepřekročili. Kožní testy byly prováděny vakcinou, jejíž densita odpovídala zhruba 50.000 a 100.000 zárodků v 1 ml.

Terapie byla rozvržena do dvou serií; první po 10 injekcích, probíhající od 24. 2.—20. 4. 1955, druhá po 20 injekcích, probíhající od 4. 6.—27. 11. 1955. Časové rozmezí aplikace jednotlivých vakcin bylo naprosto individuální, zcela podle intenzity reakce pacienta, kolísalo od 3—14 dní. Nemocný reagoval na aplikaci vakciny jedno- až dvoudenní atakou průjmů, kdežto artralgie zůstala z počátku prakticky neovlivněna. Intenzita střevní reakce vzrůstala zhruba v průběhu terapie. Už však během krátké doby při prvních aplikovaných vakcinách došlo k nápadnému ústupu choroby a zlepšování celkového stavu pacienta, především zlepšení pohyblivosti.

Po skončení první serie byl pacient zlepšen do té míry, že se pohyboval zcela normálně, bolesti v kloubech byly velmi mírné a lehce snesitelné, průjmy, pokud se objevily, byly bezbolestné. Tento stav se začal po šesti týdnech zhoršovat a proto bylo rozhodnuto aplikovat ještě jednu serii s dvojnásobným počtem vakcin. Terapie byla prováděna stejně individuálně jako po prvé, skončila v prosinci 1955. Od té doby je pacient pod naší kontrolou, jeho zdravotní stav se udržuje na velmi dobrém stupni, normálně chodí. Bolesti kloubní a obtíže střevní se občas projevují, ale ve zcela snesitelné míře a nenarušují vůbec pracovní schopnost pacienta.

DISKUSE

Podle údajů z písemnictví bývá u postdysenterické artritidy klinický obraz značně pestrý. Nápadné jsou vždy stávající nebo proběhlé obtíže střevní. Afekce kloubní mívají značnou šíři a rozmanitost. Od nejlehčích forem mírných artralgií jde plynulá řada až k těžkým, úporným formám klinicky prokazatelného zánětu, velmi vzdorujícího jakékoli terapii probíhající léta. Tato forma vede až k nemožnosti pohybu, ztrátě pracovní schopnosti a dokonce i neschopnosti vykonávat běžné životní funkce bez cizí pomoci (9, 25).

Se stejným klinickým obrazem jsme se setkali i u našeho nemocného. Neúplné anamnestické údaje, které nemocný sám při přijetí uvedl, nám z počátku neříkaly mnoho o tom, jak vést pátrání o etiopathogenese tohoto onemocnění. Teprve v průběhu onemocnění správně zhodnocené symptomy chronické kolitidy, nijak výrazné, spolu s podrobnější anamnesou a bakteriologickoserologickým vyšetřením nás vedly ke správné diagnóze.

Pokud se týče lokalisace, mohou být postiženy všechny klouby. Projevy jsou buď monoartikulární nebo polyartikulární. (6, 7) Častěji bývá postiženo více kloubů. Kloubní bolesti mívají zpravidla stěhovavý charakter. Vidíme někdy obojí projevy, urputné setrvávání bolesti a otoku v jednom až dvou kloubech, (9) nejčastěji kolenních a na ostatních kloubech jeví změny stěhovavý ráz. Většina autorů se však shoduje v tom, že nejdříve bývají postiženy klouby kolenní, hlezenní, loketní, zápěstní a drobné klouby ruční. (4, 9) Specifická zvláštnost postdysenterických artritid je postižení takového kloubu, který nebývá obvykle při ostatních kloubních chorobách postižen, na př. kloub sternoklavikulární a pod. (1) V některých případech se onemocnění omezí jen na jeden až dva klouby a přechází do chronického stadia. (1, 3) U těžších forem se objevují často rozsáhlé periartikulární infiltráty těstovitého charakteru. (5, 13) Intenzita bolestí může být mírná, ale i taková, že pacient není schopen pohybu. (13) Jsou rovněž popisovány výrony a serosní výpotky v kloubech, (5, 7) obvykle sterilní. Teploty subfebrilní a dokonce i vyšší skoro vždy provázejí onemocnění.

Diagnosa choroby je vždy velmi obtížná. Myslíme často na primární progresivní polyartritidu nebo na infekční artritidu jiné etiologie, zvláště, nejsou-li střevní obtíže výrazně vyjádřeny nebo nejsou-li vůbec udávány. Neúspěch běžné terapie nutí k dalšímu pátrání v anamnése. O obtížích spojených s přímým kultivačním průkazem shigell bylo už svrchu mluveno. Ani serologická diagnosa není zcela jednoduchá, jak se i v našem případě ukázalo. Protilátky se tvoří pozdě v nízkém titru a relativně brzy titr protilátek klesá. (1, 22) Přesto však, jak se i v našem případě ukázalo, podrobná serologická analýza má svou nespornou diagnostickou cenu obzvláště tehdy, je-li doplněna o alergické kožní testy. Jinak o těchto kožních testech, jsou-li užity osamoceně, převládá mínění, že nejsou diagnosticky nijak zvláště významné. Pro serologickou analýzu je však bezpodmínečně nutné užít zjemnělé metodiky a použít oddělených živých antigenů, které představují spektrum dnes známých 27 serotypů shigell.

V písemnictví bývá diskutováno o vzájemném vztahu mezi vážností průběhu akutní shigellosy a frekvencí výskytu postdysenterické artritidy. Na př. Chaudhuri (7) uvažuje o jakési nepřímé závislosti mezi vážností primoinfekce a sekundární artritidou. Gutzeit (5) pak dokonce má dojem, že benigně a lehce probíhající akutní shigellosy inklinují k artritickým komplikacím daleko častěji než shigellosy s těžkým a vážným klinickým průběhem.

Podle našeho uvážení a vlastních zkušeností není rozhodující pro vznik artritických komplikací průběh akutní primoinfekce, nýbrž způsob léčení, který rozhoduje o tom, zda akutní shigellosa přejde nebo nepřejde do chronického stadia. Tím si lze i do jisté míry vysvětlit, proč — jak se obecně tvrdí — u nás chronické shigellosy jsou relativně vzácným onemocněním.

Jak jsme už v úvodu uvedli, považujeme postdysenterickou artritidu za jeden ze symptomů chronické shigellosy. Postdysenterické artritidy nebyly dosud předmětem hlubšího zkoumání. Na nízké nemocnosti chronickou shigellosou u nás se významně podílí dosavadní úspěšnost sulfonamidové léčby akutních shigellos v našem prostředí, na rozdíl od zkušeností udávaných z jiných oblastí světa. Laboratorními vyšetřeními u nás do r. 1952 izolovaných a běžně se vyskytujících serotypů shigell bylo prokázáno, že maximálně 4 % izolovaných kmenů jsou absolutně sulfonamidoresistentní [Kratčovilová - Sedláková] (17). Naproti tomu sulfonamidoresistence kmenů shigell, izolovaných ve valné většině evropských i mimoevropských států, se pohybuje v rozmezí 40—98 %.

S touto otázkou souvisí i otázka časového intervalu mezi akutní fází primárních onemocnění a mezi objevením se kloubních symptomů. Tento interval je s největší pravděpodobností totožný s dobou potřebnou ke vzniku chronické fáze a pravděpodobně i s dobou potřebnou k sensibilisaci nemocného. Zatím co na př. Schittelhelm a Schlecht (19) tuto dobu odhadují na 3—4 týdny, Gounelle a Märche (10) na 2—3 týdny, a Kušelevskij (9) na 10—20 dnů, u našeho nemocného se tento interval prodloužil na jeden rok. Tím se dostáváme k otázce pathogenesy tohoto onemocnění. Starší názor na postdysenterickou artritidu jako na neúplný Reiterův syndrom není v přítomné době uznáván. (1, 20, 22) Stejně tak je dnes odmítán starší názor, že kloubní afekce je způsobena invasí shigell do kloubů, poněvadž punktáty bakteriologicky vyšetřované byly vesměs sterilní. Hegler (6) za primum movens považuje střevní infekci a bakteriální toxiny za přímé vyvolavatele artritidy. My sami v souhlase s Kušelevskijem (9), Beiglböckem (1), Youngem (25) a Gutzeitem (5) považujeme postdysenterickou artritidu za alergickou či hyperergickou reakci sensibilizovaného organismu, při čemž alergen tvoří ložiskové infekce v tlustém střevě chronického dysenterika. Tato naše představa dobře odpovídá Šiklovým nálezům už z r. 1920. Šikl totiž prokázal, že shigelly u chronických dysenteriků i v klidovém stadiu bývají ukryty v hlenových cystách a podslizničních hlízách tlustého střeva.

Pokud se terapie postdysenterických artritid týče, setkáváme se v písemnictví s velkou řadou nejen léčiv, ale i léčebných způsobů. Kromě lokální (methylsalicyl) a fyzikální terapie byla zkoušena vedle nespecifických farmak (salicyl, soli zlata) i specifická chemoterapie (sulfonamidy a antibiotika) stejně jako nespecifická i specifická imunoterapie (12, 21).

Sami jsme užitím smíšené kmenové vakcíny u našeho nemocného sledovali dvojí: Jednak dosíci specifické desensibilisace a jednak ovlivnit chronická infekční ložiska na sliznici tlustého střeva. Výsledek ukázal, že i když se nám zcela nepodařilo nemocného úplně zbavit kolitických obtíží, i předtím málo výrazných, zbavili jsme ho prakticky obtížných alergických symptomů artritických.

V závěru našeho sdělení chceme s hlediska bakteriologického zdůraznit, že bakteriologická diagnosa postdysenterické artritidy, byť byla velmi obtížná, je možná, i když se nepodaří izolovat etiologického původce. Právě u našeho nemocného jsme klinickou diagnosu ověřili serologicky a kožními testy. K serologické diagnostice je nutno bezpodmínečně použít metody agglutinace s použitím živého antigenu s celým spektrem dosud známých serotypů. Výsledků získaných serologickou analýzou použijeme ve výběru antigenů pro kožní testy.

V této souvislosti je možno též uvažovat o izolaci specifického bakteriofaga, kterou jsme neprováděli.

S hlediska klinického chceme upozornit na to, že při běžném vyšetření může primární onemocnění lehce uniknout pozornosti lékaře, stojí-li v popředí symptomy kloubní a neudává-li sám pacient obtíže střevní proto, že jsou minimální, pacient si na ně zvykl a nevidí souvislost mezi oběma projevy choroby. V takovém případě je nutný podrobný klinický rozbor celého onemocnění včetně správné anamnesy u všech artralgií nejasné etiologie a vzdorující běžné terapii.

Domníváme se, že studium výskytu artralgií u zjevných kolitid ve velkém materiálu gastroenterologů stejně jako studium výskytu nevýrazných kolitických symptomů u řady artritid nejasné etiologie ve velkém materiálu reumatologů by ukázalo, že v mnoha případech mají střevní a kloubní obtíže společnou příčinu a že výskyt postdysenterických artritid je daleko častější, než by se v běžné lékařské praxi zdálo.

S O U H R N

Autoři na příkladě vlastního, jimi pozorovaného a léčeného případu postdysenterické artritidy pojednávají o etiopathogeneze, klinickém obrazu, frekvenci výskytu a vztahu tohoto kloubního onemocnění k Reiterovu syndromu.

Autoři diskutují o otázce pathogeneze infekčních artritid neznámé etiologie a domnívají se, že postdysenterická artritida je projevem hyperergické reakce sensibilizovaného organismu, při čemž alergen tvoří ložisková infekce v tlustém střevě chronického dysenterika.

Upozorňují na diagnostické obtíže, klinické i laboratorní.

Na svém příkladě ukazují, že diagnosa v případě selhání kultivačního průkazu etiologického původce je uskutečnitelná zjevnou serologickou metodikou ve spojení s kožními alergickými testy.

Na základě výsledků serologické analýzy i kožních testů zavedena úspěšná terapie smíšenou vakcínou Sh. boydi 3 a Sh. sonnei, kterou se podařilo nemocného desensibilizovat a tím zbavit jeho artritických obtíží, které vzdorovaly dosud používané terapii.

Р Е З Ю М Е

К вопросу диагностики и терапии постдиссентерических артритов

Авторы на примере ими наблюдаемого и леченного случая диссентерийного артрита разбирают вопрос об этиопатогенезе, клинической картине, встречаемости и отношении этого суставного заболевания к синдрому Reiter.

Авторы дискутируют вопрос патогенеза инфекционных артритов незнакомой этиологии и полагают, что постдиссентерийный артрит является проявлением гиперергической

реакции сензибилизированного организма, при чем аллерген является продуктом очаговой инфекции в толстой кишке больного хронической диссентерией.

Авторы обращают внимание на диагностику, клинические и лабораторные трудности.

На своем примере они показывают, что в случае неудачи культивационного доказательства тождества возбудителя, диагноз осуществим уточненной серологической методикой в соединении с кожными аллергическими пробами.

На основании результатов серологического анализа и кожных проб была с успехом введена терапия смешанной вакциной *Sh. boydi* 3 и *Sh. sonnei*, при помощи которой удалось больного десензибилизировать и таким образом лишить его артритических затруднений, которые упорствовали до того времени употребляемой терапии.

SUMMARY

A Contribution to Diagnostic and Therapy of Postdysenteric Arthritis

Taking a case of postdysenteric arthritis observed and treated by themselves for a ground, the authors discuss the etiopathogenesis, the clinical picture, the frequency and the relation of this arthritic disease to the syndrome of Reiter.

They discuss the question of the pathogenesis of infectious arthritis of unknown etiology, and suppose that the postdysenteric arthritis represents a manifestation of hyperergic reaction of sensitized organism, allergen being formed by the focal infection in the colon of a patient with chronic dysentery.

The authors point out the clinical and laboratory difficulties of the diagnostic.

They show on their own case that it is possible to establish the diagnosis by refined serologic methods in connection with allergic skin tests also when the cultivation proof of the etiologic agent fails.

On the ground of results of serologic analysis and of skin tests a successful therapy was introduced by a mixed vaccine of *Shigella boydi* 3 and *Shigella sonnei*, by the use of which it was possible to desensitize the patient and so to set him free from his arthritic trouble which resisted the therapy used up to this time.

LITERATURA

1. Beiglböck, W.: Dtsch. med. Wschr. 69, 803, 1943. — 2. Dorendorf, A.: Med. Klinik (J, 1917). — 3. Gounelle, H., March, J.: Méd. Acad. Chir. 68, 308, 1942. — 4. Guck, J. K.: Amer. J. med. Sci. 224/6, 653, 1952. — 5. Gutzeit, K.: Taschenbuch der ansteckenden Krankheit des Menschen. Urban u. Schwarzenberg, Berlin und Wien 1944. — 6. Hegler, C.: Praktikum der wichtigsten Infektionskrankheiten, G. Thieme, Leipzig 1944. — 7. Chaudhuri, R. N.: 1, 510, 1951. — 8. Kredba, V., Procházka, J.: Infekční choroby, SZN, Praha, 1955. — 9. Kuševskij, B. P.: Infekcionnye zaboljevanija sustavov. Medgiz Moskva, 1945. — 10. Marche, J.: Gaz. med. de France 57/18, 903, 1950. In: Exc. IX, 1045, 1951. — 11. Marche, J. Rev. Rhumatol. 17/18, 449, 1950. In: Exc. IX/879, 1951. — 12. Matis, J. D.: Reiter's disease. N. J. St. J. Med. 47/11, 1274, 1947. In: Exc. IX, 299, 1948. — 13. Pelnář, J., Lenoč, Fr.: Path. a ther. nemocí vnitřních. Nemoci kloubní, kostní a svalové, SZN, Praha, 1953. — 14. Rappaport, E. M.: Arthritis due to intestinal amoebiasis. Ann. int. Med. 34/5, 1224, 1951. — 15. Raška, K.: Epidemiologie, SZN, Praha, 1954. — 16. Raška, K.: Bacilární úplavice, Spol. lék. čes., Praha, 1943. — 17. Sedlák, J.: Enterobacteriaceae, SZN, Praha, 1955. — 18. Seeliger, H.: Die Laboratorium diagnostik der Bakterienruhr, Leipzig, 1953. — 19. Schittelhelm, A., Schlecht, H.: Dtsch. Arch. klin. Med. 126, 329, 1918. — 20. Short, C. L.: Arthritis in the Medieteranean theatre of operations. N. Engl. J. Med. 236/13, 468, 1947. Exc. VI, 390, 1947. — 21. Thiers, H.: Sem. Hop. Paris. 26, 3819, 1950. — 22. Vanýsek, J.: Časopis lékařů českých 85, 343, 1946. — 23. Šikl, H.: Z. Hyg. 90, 337, 1920. — 24. Wepler, W.: Beitr. path. Anat., 106, 289, 1942. — 25. Wachsmuth, H. O., Wirte, K.: Dtsch. Militärarzt 8, 258, 1943. — 26. Young, R. H., McEwen, E. G.: J. Amer. med. Ass. 134, 17, 1456, 1947.

Čs. epidemiologie,
mikrobiologie, imunologie
VI - 3 - 1957

Ústav epidemiologie a mikrobiologie, Praha, přednosta, prof. Dr Karel Raška

ČIŠTĚNÍ KONTAMINOVÝCH KULTUR LEPTOSPIR MEMBRÁNOVÝMI FILTRY

JAN POKORNÝ a OTTO HA VLÍK

Při kultivaci leptospir, ať ve sbírkách kmenů určených pro diagnostiku nebo při isolačních pokusech často zjišťujeme, že kultury jsou znečištěny bakteriemi, plísněmi nebo kvasinkami. Při isolačních pokusech z reservoárových zvířat to bývá zaviněno primárním znečištěním očkovaného materiálu (ledvin), zejména při kultivaci ze zvířat usmrčených nebo uhynulých před delší dobou. Avšak i ve sbírkách kmenů je snadno možná kontaminace buď při přeočkování nebo z nesterilních půd, protože základní složkou všech půd pro pěstování leptospir je nativní králičí serum, které nelze pro tento účel sterilisovat.

Bakteriální znečištění kultury se může projevit potlačením růstu nebo úplným vyhynutím leptospir. Avšak i v případech, že mikroby neovlivňují přímo růst leptospir, je jejich přítomnost nežádoucí zejména při pokusech imunisačních a serologických i při odečítání aglutinace-lyse v zástinu.

Že vyčištění kontaminovaných kultur je pro leptospirologické laboratoře prvořadým problémem, svědčí řada metod, které byly vypracovány na různých pracovištích. Snad nejužívanější metodou čištění je t. zv. filtrace živým filtrem podle Schüffnera. (8) Morčeti se vstříkne intraperitoneálně 0,5–1,0 ml dobře rozrostlé kultury a za 10 minut se odebere krev ze srdce na kultivaci. Využívá se při tom zkušenosti, že leptospiry pronikají z peritoneální dutiny do krevního oběhu daleko rychleji než bakterie. Tato metoda je sice poměrně úspěšná, je však značně nákladná a pozitivní výsledky dosáhneme jen v malém procentu pokusů. Proto použil Těrskich (11) a někteří další pracovníci místo morčat bílých myši. Bílé myši jsou však pro podobné pokusy zásadně nevhodné, protože je známo, že jejich chovy jsou často zamořeny spontánní leptospirosou, buď druhem *L. ballum* [Schüffner-Bohlander] (cit. podle 13), Borst-Ruys-Wolff (1), Frenkel (cit. podle 13), Fraga de Azevedo-Valente-Queiros (4), Kraminskaja-Eksin (6), u nás Kmety a B. Pokorný nebo i *L. sejroe* [Šebek] (10). Tato zjištění nejen že vůbec vylučují možnost použití bílých myši k purifikaci, ale uvádějí v pochybnost i identitu všech kmenů, které byly již touto metodou čištěny.

Stavitsky (9) se pokusil vyčistit kontaminované kultury přidávkem sulfonamidů, které na leptospiry nepůsobí. Bohužel lze tímto způsobem odstranit pouze ty druhy bakterií, které jsou na sulfonamidy citlivé a kultury bývají nejčastěji znečištěny druhy sulfonamidoresistentními (vzdušné sporující mikroby, plísně a pod.). U nás dosáhl určitých úspěchů s čištěním kultur leptospir sulfonamidy Červa (2).

Pokusy s filtrací znečištěných kultur Seitzovými filtry nebo Chamberlandovými svíčkami jsou rovněž neuspokojující, protože vlivem adsorpce prochází pouze nepatrné množství leptospir a nelze proto čistit špatně rostoucí kultury. Kromě toho bylo zjištěno, že filtrace uvedenými filtry nepříznivě ovlivňuje růst leptospir [Pokorný-Jirovec-Havlík] (7).

Jak je vidět, nebyla dosud žádná metoda čištění úplně uspokojující. Z tohoto důvodu jsme se pokusili vyčistit kontaminované kultury leptospir filtrací t. zv. membránovými filtry, jejichž použití v mikrobiologické technice doznalo v poslední době značného rozšíření.

METODIKA *)

Membránové filtry jsou velmi jemné filtry (tloušťka je pouze 150–180 μ) z esterů celulosy o průměru 30–60 mm, s nejrůznější světlostí pórů, od 0,005 μ do 5 μ , vyráběné zatím v několika státech (SSSR, USA, Anglie, NSR). K našim pokusům jsme použili filtry od fy. Sartorius Werke

*) Za čtené rady a technické připomínky k práci s membránovými filtry děkujeme na tomto místě Dr. VI. Šerému z ÚEM.

Kmen	Růst	Kontrola kontaminace		Filtr. var	Filtrát		Subkultura	
		při 37 °C	při 23 °C		lepto- spiry	sterilita	lepto- spiry	sterilita
L. benjamini	++	∅	G-tyčinky, vzdušné, sporul.	č. 3 20 min.	++	negativní	+++	negativní
L. canicola	+++	∅	G-granulovaná vlákna	č. 3 20 min.	++	negativní	+++	negativní
L. canicola Utr. IV.	+++	Staph. albus	Staph. albus	č. 3 20 min.	+++	Staph. albus	+++	Staph. albus
L. canicola Utr. IV.	+++	Staph. albus	Staph. albus	č. 3 3 × 20	+++	negativní	+++	negativní
L. 1507 (bílá krysa)	++	∅	G-, vzdušné sporul. tyčinky	č. 3 3 × 20	++	negativní	+++	negativní
L. bovis	+++	B. coli	B. coli	č. 3 3 × 20	+++	negativní	+++	negativní
L. 2546 (Ap. flavicollis)	+++	∅	bíže neurčená pliseň	č. 3 3 × 20	+++	negativní	+++	negativní
L. cynopteri 3868 C	++	∅	kvasinky	č. 3 3 × 20	++	negativní	+++	negativní
L. sejroe	++	∅	G-, granulovaná vlákna	č. 3 3 × 20	++	negativní	+++	negativní
L. hebdomadis	+++	∅	G-, granulovaná vlákna	č. 3 3 × 20	+++	negativní	+++	negativní
L. grippotyph. Schlessien	+++	Staph. albus	Staph. albus	č. 3 3 × 20	+++	negativní	+++	negativní
L. grippotyph. Moskva	+	Staph. albus	Staph. albus	č. 3 3 × 20	+	negativní	+++	negativní
L. bataviae Van Tienen	+++	∅	G-tyčinky	č. 3 3 × 20	+++	negativní	+++	negativní
L. bifixa ÚEM	+++	∅	G-tyčinky	č. 3 3 × 20	+++	negativní	+++	negativní
L. andamana CH 11	++	∅	G-tyčinky	č. 3 3 × 20	++	negativní	+++	negativní
L. 15 24 (bílá krysa)	++	∅	G-granulovaná vlákna	č. 3 3 × 20	++	negativní	+++	negativní

A. G. Göttingen, které jsou značeny čísla 1—10 s udáním maximální a střední hodnoty pórů. Pro naši práci jsme měli k dispozici filtry č. 1 (střední velikost pórů $0,6 \mu$, maximální $1,0 \mu$), 2 ($0,4 \mu$ — $0,8 \mu$), 3 ($0,3 \mu$ — $0,5 \mu$), 8 ($0,015 \mu$ — $0,025 \mu$) a 10 ($0,005 \mu$ — $0,01 \mu$).

K pokusům s membránovými filtry jsme použili Seitzových přístrojů na filtraci o průměru 30 mm. Celý aparát i s gumovou zátkou, avšak bez gumového těsnícího kroužku a bez filtru, byl sterilisován v autoklávu 30 minut při $1,5$ atm. Těsně před filtrací byl rozbalen a nasazen na sterilní Blackovu nádobu. Potom byl do přístroje vložen měkkou pincetou vysterilisovaný membránový filtr utěsněný gumovou vložkou a připojena vývěva. Membránové filtry (a gumové těsnící kroužky) jsme sterilisovali varem v destilované vodě po dobu 20 minut.

Vlastní filtrace probíhala tak, že nejprve se zapnula vývěva, aby membrána dokonale přilnula k podložce a potom byla pasteurovou pipetou nákapávána zkoušená kultura po malých kvantech do středu filtrů. Tento způsob je výhodný, protože ne vždy se podaří utěsnit dokonale membránu na celém obvodu, která se pak může u kraje zborstit a trhlinami se může tak dostat do filtrátu malé množství kontaminovaného materiálu.

Množství kultury, která byla filtrována, se pohybovalo kolem 1—3 ml, podle stupně kontaminace. Je-li kultura leptospir silně přerostlá, je lepší filtrovat menší kvanta, případně kulturu zředit, protože póry membrány se brzy ucpou a filtr může prasknout.

Při vlastních pokusech jsme postupovali takto: Kultury leptospir byly nejprve prohlédnuty v zástinu a zhodnocen jejich růst. Potom byla kultura naočkována na bouillonu a na krevní agary, které byly inkubovány jednak při 37° C, jednak při 23° C, abychom určili, čím je kultura znečištěna. Po filtraci jsme prohlédli filtrát v zástinu, abychom zjistili, zda leptospiry prošly filtrem. Filtrát jsme současně naočkovali masivně do několika rourek Těrskichovy půdy a opět na bouillon a krevní agar pro kontrolu sterility. Subkultury leptospir byly prohlíženy 4. den, byl zhodnocen růst leptospir a současně provedena ještě jednou zkouška sterility. Po odečtení obou zkoušek sterility a opakované kontroly růstu leptospir byl pokus ukončen.

V Ý S L E D K Y

Hlavním úkolem naší práce bylo nalézt filtr o takové velikosti pórů, aby leptospiry procházely, ale ostatní elementy byly zachyceny. Zahájili jsme pokusy s membránovými filtry č. 10, které mají max. póry $0,1 \mu$ a s filtry č. 8, které mají maximální póry $0,25 \mu$. Už prvé pokusy s purifikací kultury *L. canicola* Utrecht IV, která byla znečištěna *Staph. albus*, ukázaly, že těmito filtry leptospiry neprocházejí.

Proto jsme vyzkoušeli filtry s největšími póry, a to č. 1 (max. 1μ), č. 2 (max. $0,8 \mu$) a č. 3 (max. $0,5 \mu$). K pokusům jsme použili kulturu *L. benjamini*; kontaminovou nepochybně vzdušnou gramnegativní tyčinkou a kulturu *L. canicola*, užitou už v prvních pokusech a znečištěnou *Staph. albus*. Všechny pokusy jsme opakovali třikrát a zjistili jsme, že leptospiry procházejí všemi užitými filtry, gramnegativní tyčinky pouze filtry č. 1 a 2, kdežto filtr č. 3 je spolehlivě zadržuje. Naproti tomu *Staph. albus* procházel i filtrem č. 3. Růst vyčištěné kultury *L. benjamini* byl velmi bohatý, podstatně lepší než v původních kulturách.

Protože jsme neměli k dispozici filtry č. 4, které by patrně byly pro zadržení *Staph. albus* nejvhodnější, pokusili jsme se problém vyřešit jiným způsobem. Opakovaným vyvářením se totiž póry membránových filtrů smršťují a bylo třeba nalézt nejvhodnější dobu vyváření filtrů, aby leptospiry ještě procházely, ale byly zachyceny všechny ostatní mikroby. Řadou pokusů jsme zjistili, že filtry č. 3 mají optimální velikost pórů po trojím vyváření vždy po dobu 20 minut. Takto preparovanými filtry se podařilo zbavit kulturu *L. canicola* příměsí stafylokoků. Stejného výsledku jsme dosáhli i filtrací přes dvě membrány č. 3, vyvářené pouze 20 minut. Zde jsou však ztráty leptospir vlivem větší adsorpce podstatně větší.

Po zjištění nejvhodnějšího filtru jsme zahájili seriové čištění všech kontaminovaných kmenů, které se nalézaly ve sbírce ŮEM. V tabulce jsou shrnuty výsledky čištění 15 namátkově vybraných kmenů, u kterých byl zjišťován druh mikroba, kterým byla kultura kontaminována. Zjistili jsme, že třikrát vyvařo-

vané filtry č. 3 zadrží naprosto spolehlivě znečišťující mikroby bez ohledu na druh, kdežto leptospiry procházejí a v subkulturách rostou velmi dobře.

Vzhledem k tomu, že naše pokusy ukázaly, že preparované filtry zadrží všechny mikroby, nezjišťovali jsme už v další práci druhy kontaminujících mikrobů, ale omezili jsme se pouze na kontroly sterility filtrátu a subkultur. Celkem jsme tímto způsobem vyčistili více než 30 kmenů leptospir z naší sbírky.

Při určování kontaminujících mikrobů jsme zjistili skutečnost, která není bez významu pro práci s leptospirami. Jak je vidět z tabulky, nerostla většina mikrobů vůbec při 37° C, kdežto při 23° C vyrostly všechny, i když růst trvá několik dnů. Domníváme se proto, že kontrola sterility živných půd pro leptospiry inkubací 24 h při 37° C, jak ji doporučují někteří autoři [Wolff] (13), nemá prakticky žádný význam a naopak může vést k omylům. Daleko důležitější je podle našeho názoru několikadenní inkubace půd při 23° C, resp. při pokojové teplotě, nebo ještě lépe vyočkování zkoušených půd do bouillonu, protože zde se eventuální kontaminace projeví daleko zřetelněji (zákal, sediment), než v půdách pro pěstování leptospir.

Závěrem naší práce lze říci, že zkoušená metoda purifikace znečištěných kmenů leptospir pomocí membránových filtrů se plně osvědčila a nad všechny ostatní metody vyniká snadností, rychlostí a jednoduchým provedením.

S O U H R N

1. Protože dosavadní metody čištění kontaminovaných kultur leptospir nejsou uspokojivé, pokusili se autoři o vyčištění kultur pomocí membránových filtrů. K pokusům se užilo filtrů Sartorius-Werke, Göttingen označených čísly 1, 2, 3, 8, 10. Filtrace se prováděla na Seitzových aparátech o průměru 30 mm za užití vývěvy.

2. Pokusy ukázaly, že filtr č. 3 o průměrné velikosti pórů 0,3 μ a maximální velikosti 0,5 μ zadrží spolehlivě plísň, kvasinkovité mikroorganismy a vzdušné sporující tyčinky, ale nezadrží koky (Staph. albus).

3. Leptospiry procházejí těmito filtry velmi dobře, jsou však zcela zadrženy filtry č. 8 (max. velikost pórů 0,025 μ) a č. 10 (max. 0,01 μ).

4. Stafylokoky se podařilo odfiltrovat na membránách č. 3, které byly považeny 3X po dobu 20 minut, čímž se póry filtru zmenšily na optimální velikost. Nejvhodnější by patrně byly filtry č. 4, které však autoři neměli k dispozici.

5. Celkem bylo touto metodou vyčištěno 30 sbírkových kmenů leptospir. Prakticky všechny leptospiry rostly po vyčištění podstatně lépe než v kontaminovaných kulturách. Výsledky 15 pokusů, při kterých byla určována znečišťující flora, jsou shrnuty v tabulce.

6. Kontroly sterility ukázaly, že většina kontaminujících mikroorganismů neroste vůbec při 37° C. Autoři proto doporučují při kontrolách sterility živných půd pro leptospiry inkubaci při 23° C po dobu několika dnů, protože negativní výsledky při 37° C mohou vést k omylům. Ještě lépe je přeočkovat zkoušenou půdu do bouillonu a inkubovat při 23° C po dobu několika dnů, protože zde se kontaminace projeví lépe a zřetelněji než v půdách pro leptospiry.

Р Е З Ю М Е

Очищение контаминированных культур лептоспир с помощью мембранных фильтров

1. Так как до сих пор применяемые методы очищения контаминированных культур лептоспир не являются удовлетворительными, авторы попытались очистить эти культуры при помощи мембранных фильтров. К опытам употреблялись фильтры от Sartorius-Werke, Göttingen, обозначенные номерами 1, 2, 3, 8, 10. Фильтрация совершалась на аппаратах Setza диаметром в 30 мм при употреблении воздушного насоса.

2. Опыты показали, что фильтр № 3 с порами в 0,3 μ в среднем и в 0,5 μ максимальной величины надежно задерживает плесневые грибки, дрожжевые грибки и спорулирующие палочки из воздуха, но не задерживает кокков (Staph. albus).

3. Лептоспир проходят этими фильтрами очень хорошо, но они совсем задерживаются фильтрами № 8 (Максимальный размер пор — 0,025 μ) и № 10 (макс. размер — 0,01 μ).

4. Стафилококки удалось отфильтровать на мембранах № 3, которые были три раза всунуты в кипящую воду на 20 минут, что уменьшает поры фильтра на оптимальный размер. Самыми удобными, повидимому, были бы фильтры № 4, которыми однако авторы не распоряжались.

5. Этим методом очищены всего 30 штаммов лептоспир из коллекции института. Практически все штаммы росли после очищения намного лучше чем в контаминированных культурах. Результаты 15 опытов, при которых определялась загрязняющая флора, поданы в таблице.

6. Испробованный метод пурификации контаминированных штаммов оказался вполне пригодным и в сравнении со всеми до сих пор применяемыми методами отличается удобностью, скоростью и простотой.

7. Проверки стерильности показали, что большинство загрязняющих микроорганизмов не растут вообще при 37° С. Авторы следовательно рекомендуют пользоваться при проверках стерильности питательных сред инкубацией при 23° С в течение нескольких суток, а не при 37° С, как рекомендовано в литературе. Негативные результаты при культивации при 37° С могут довести к ошибкам при оценке стерильности. Еще лучше перенести подопытную среду в бульон и инкубировать в течение пяти суток, так как здесь загрязнение показывается лучше и более ясно чем в средах для выращивания лептоспир.

SUMMARY

Purification of Contaminated Cultures of Leptospirae with Membrane Filters

1. As the usual methods of purifying contaminated cultures are not satisfactory the authors attempted purifying them with membrane filters. In the experiments filters from Sartorius-Werke, Göttingen, marked 1, 2, 3, 8, 10, were used.

2. The experiments showed that the filter No 3 with pores 0,3 μ in diameter on an average and 0,5 μ maximal size safely retain Fungi, yeast-like organisms and sporulating rods from the air, but would not hold back cocci (*Staphylococcus albus*).

3. Leptospirae came through the pores very well, but were reliably captured back with the filter No 8 (maximal size of pores 0,025 μ) and No 10 (maximal size 0,01 μ).

4. Staphylococci were successfully retained by membranes No 3, which were boiled three times for 20 minutes, the pores diminishing thus to the optimal size. Filters No 4 would have probably been most suitable, but the authors were not in possession of them.

5. Thirty strains of Leptospirae from the Institute's collection were purified by this method. Practically all the strains grew substantially better after the purification than in the contaminated cultures. The results of 15 experiments in which the contaminating flora was determined are given in the Table.

6. The tested method for purifying contaminated strains proved to be very good and by reason of its facility, promptness, and simplicity it is superior to all the other methods in use at present.

7. Sterility controls showed that most contaminating microorganisms did not grow at all at 37° C. The authors accordingly recommend an incubation at 23° C for several days in sterility controls of media instead of the incubation at 37° C as advised usually in the literature. It is still preferable to transfer the medium under trial into bouillon and incubate it at 23° C for 5 days, as the contamination shows in it more clearly and is more distinct than in media for growing Leptospirae.

LITERATURA

1. Borst, J. G. G., Ruys, A. Ch., Wolff, J. W.: Neder. tijdschr. geneesk. 92:2920, 1948. —
2. Červa.: nepublikované sdělení. — 3. Diagnosis and typing in leptospirosis. WHO Technical Report Series No 113, Geneva 1956, p. 1—10. — 4. Fraga de Azevedo, J., Valente, J. S., Queiros, J. J. de S.: Ann. inst. Med. Trop., 8:621, 1951. — 5. Jírovec, O., Havlík, O.: Laboratorní diagnostika leptospiros; ve Standartisace diagnostických metod mikrobiologických. St. zdrav. nakl. Praha 1957, v tisku. — 6. Kraminskaja, N. N., Eksin, V. A.: ŽMEI, 9:63, 1956. — 7, Pokorný, B., Jírovec, O., Havlík, O.: Čs. biologie, 1:21—31, 1952. — 8. Schüffner, W.: Zblt. Bakr. Abt. I. Orig. 154:341, 1940. — 9. Stavitsky, A. B.: J. inf. Dis. 76:179, 1945. — 10. Šebek, Zd.: Čs. epidemiologie, mikrobiologie, imunologie 1957, č. 4. — 11. Těřskich, V. I.: Leptospirozy. Medgiz, Moskva 1952. — 12. Van Thiel, P. H.: The Leptospiroses. Universitaire Pers. Leiden 1948. — 13. Wolff, J. W.: The Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. Charles C. Thomas, Springfield, Ill. USA, 1954.

Katedra epidemiologie lék. fak. hyg. KU v Praze, Ústav epidemiologie a mikrobiologie v Praze,
ředitel prof. Dr. K. Raška

POUŽITÍ BĚŽNÝCH DESINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ A DETERGENTŮ PŘI DESINFEKCI PATHOGENNÍCH HUB

JIRÍ MANYCH a JAN POKORNÝ

Problematika onemocnění pathogenními houbami je v moderní době stále živější, což je způsobeno nejen zlepšenou diagnostikou těchto chorob, ale i skutečným vzrůstem jejich výskytu, ať už se jedná o dermatomykomy nebo o hluboké mykomy mnohdy vážně ohrožující zdraví lidí i zvířat. Jedním z důležitých činitelů v boji proti rozšíření chorob způsobených pathogenními houbami je včasná a spolehlivá desinfekce, zvláště v místech vhodných pro dlouhodobou persistenci pathogenních hub, a především tam, kde se desinfekce doposud prováděla nedokonalými metodami, jako na př. ve společných umyvárnách, lázních a pod.

Naše pokusy měly ukázat, do jaké míry účinkují u nás běžně používané desinfekční prostředky na pathogenní houby. Pokud by se tento účinek podařilo prokázat, vytkli jsme si jako další úkol najít jednoduchý a laciný způsob, jak tyto fungicidní vlastnosti potencovat a prakticky využít. Samozřejmým požadavkem při tom bylo, že antibakteriální účinnost zůstane plně zachována.

MATERIÁL A METODIKA

Testovány byly tři běžně užívané desinfekční prostředky, Chloramin, Ajatin a Famosept. Všechny se zkoušely v postupných zředěních, a to Chloramin a Ajatin v 0,5%, 1%, 2%, 3% a 5% koncentraci, Famosept byl testován v ředění 1:10, 1:20, 1:30 a 1:40. Jednotlivá ředění byla zkoušena v expozici 10, 15, 30 a 60 minut.

Po předběžných pokusech s čistými substancemi jsme k dalším pokusům o potencování desinfekčního účinku použili Chloraminu a Ajatinu.

K zvýšení účinnosti Chloraminu jsme použili dvou metod:

1. Přímého aktivování testovacích roztoků Chloraminu chloridem amonným a síranem amonným. Pracovali jsme přitom se třemi koncentracemi 0,5%, 1% a 2% při expozicích 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 a 30 minut. Aktivátory, t. j. chlorid a síran amonný, jsme přidávali do předem připravených roztoků Chloraminu v poměru 1:1 těsně před použitím.

2. Kombinace Chloraminu s detergentními látkami typu laurylalkoholsulfonát sodný, obchodní název Syntapon L a cetylalkoholsulfonát sodný, obchodní název Syntapon CP. K testování Chloraminu ve směsi s detergenty jsme volili tytéž koncentrace jako při testování samotného Chloraminu, t. j. 0,5%, 1%, 2%, 3% a 5% s expozicemi 10, 15, 30 a 60 minut, při čemž byly testovány tři šarže směsí, v nichž byl detergent zastoupen 1%, 3% a 5%. Směs byla připravena vždy těsně před pokusem.

Kombinace Ajatinu s uvedenými detergentními látkami není vhodná, což lze snadno vysvětlit vzájemnou neutralisací účinků obou látek.

Jako testovací organismus jsme zvolili *Trichophyton gypseum interdigitale* v 15denní kultuře masivně naočkované na Sabouraudův dextrosový agar. Testování jsme prováděli metodou podle Rašky, t. j. agar s narostlou kulturou se sterilními nástroji rozkrájí na čtverce o ploše 0,5 cm². Jednotlivé bločky se vhodí do 5 ml zkoušené látky a po příslušné expoziční době se přenesou sterilní kličkou do zkumavek s 5 ml glukosového bouillonu. Po desetiminutovém proprání byly bločky porostlou plochou přiloženy na povrch Sabouraudova dextrosového agaru a pozorovány 21 dní při pokojové teplotě.

VÝSLEDKY

Ze samotných desinfekčních prostředků se ukázal jako nejlepší Ajatin, který má v 5% roztocích úplnou zábranu růstu už při 10minutové expozici. V nižších koncentracích nastává zábrana teprve při prodloužení expozičních dob. Viz tab. 1.

Tabulka 1.

Ajatin	10'	15'	30'	60'
0,5%	+	+	+	+
1%	+	+	-	-
2%	+	+	-	-
3%	+	-	-	-
5%	-	-	-	-

Tabulka 2.

Chloramin	10'	15'	30'	60'
0,5%	+	+	+	+
1%	+	+	+	-
2%	+	+	-	-
3%	+	±	-	-
5%	+	±	-	-

Chloramin potřeboval k potlačení růstu vyšších koncentrací a delších expozic, jak ukazuje tabulka 2. Pokus s Famoseptem, jak vysvítá z tab. 3., ukázal velmi slabou fungicidní účinnost tohoto prostředku, proto bylo od dalších pokusů s ním upuštěno.

Tabulka 3.

Famosept	10'	15'	30'	60'
1 : 40	+	+	+	+
1 : 30	+	+	+	-
1 : 20	+	+	+	-
1 : 10	+	+	+	-

Tabulka 4. Chloramin aktivovaný chloridem resp. síranem amonným.

	1'	2'	3'	4'	5'	10'	15'	30'
0,5%	+	+	+	+	-	-	-	-
1%	-	-	-	-	-	-	-	-
2%	-	-	-	-	-	-	-	-

Pokusy s aktivací Chloraminu amonnými solemi dávají velmi dobré výsledky, při čemž není vůbec rozdílu při použití chloridu nebo síranu amonného jako aktivátoru. Tab. 4.

Tabulka 5.

Syntapon L pasta	10'	15'	30'	60'	120'
0,5%	+	+	+	+	+
1%	+	+	+	+	+
2%	+	+	+	+	-
3%	+	+	+	-	-
5%	+	+	-	-	-

Tabulka 6. Směs 1% Syntapon L pasty se stoupajícím ředěním Chloraminu.

	10'	15'	30'	60'
0,5%	+	+	-	-
1%	+	+	-	-
2%	+	-	-	-
3%	-	-	-	-
5%	-	-	-	-

Při hledání nejvhodnějšího detergentu ze skupiny Syntaponů se ukázala jako nejlepší Syntapon L pasta, která už sama o sobě má slabě desinfekční účinky, jak dokazuje tab. 5. a která se osvědčila i ve směsi s Chloraminem.

Výsledky testů ukazují na velmi dobré fungicidní vlastnosti směsi, která ve 3% a 5% koncentraci Syntaponu L účinkuje ve všech ředěních už za 10 minut. Zkoušený 1% Syntapon L se ukázal být účinný jen ve vyšších koncentracích Chloraminu nebo při delších expozicích. Tab. 6., 7., 8.

Tabulka 7. Směs 3% Syntapon L pasty se stoupajícím ředěním Chloraminu.

	10'	15'	30'	60'
0,5%	—	—	—	—
1%	—	—	—	—
2%	—	—	—	—
3%	—	—	—	—
5%	—	—	—	—

Tabulka 8. Směs 5% Syntapon L pasty se stoupajícím ředěním Chloraminu.

	10'	15'	30'	60'
0,5%	—	—	—	—
1%	—	—	—	—
2%	—	—	—	—
3%	—	—	—	—
5%	—	—	—	—

DISKUSE

K popsáním pokusům nás vedla snaha nalézt co nejspolehlivější a jednoduchý způsob asanace vzhledem k pathogenním houbám. Účelnost našich zkoušek potvrzují výsledky s klasickými desinfekčními prostředky, kterých se běžně používá a z nichž Famosept je na pathogenní houby téměř neúčinný a Chloramin jen při dlouhých expozicích a ve vyšších koncentracích. Částečně vhodný je pouze Ajatin, jehož použití pro asanaci větších ploch je však velmi neekonomické.

Velmi dobré výsledky získané s aktivovanými chlorovými preparáty umožňují jejich použití při rychlé asanaci, protože účinkují i v nízkých koncentracích téměř okamžitě. Nevýhodou této metody je ovšem to, že se musí provádět naprosto přesně a pracovní roztoky se musí připravovat vždy těsně před použitím, neboť několika-hodinové roztoky ztrácejí téměř účinnost.

Směsi Syntaponu L a Chloraminu mají vedle vysoké účinnosti tu výhodu, že jsou stálé a je možno je připravovat do zásoby. Hodí se výborně k asanaci větších ploch, protože vedle jejich značného desinfekčního působení se uplatňuje i účinek mechanický, neboť velmi dobře myjí. Hodí se i k desinfekci rukou s jedinou pouze nevýhodou, že vysušují pokožku, čemuž lze ovšem snadno předejít použitím vhodného mastného krému.

SOUHRN

Byla zjišťována použitelnost Chloraminu, Ajatinu a Famoseptu v desinfekci proti pathogenním houbám a zkoumáno, jak účinky těchto látek potencovat. Z čistých substancí bylo dosaženo nejlepších, i když zdaleka ne uspokojivých výsledků s Ajatinem. Velmi dobrých výsledků bylo naproti tomu dosaženo s Chloraminem aktivovaným amonnými solemi, jehož účinek je velmi rychlý a mohutný, i když krátkodobý. Nejspolehlivějších výsledků bylo dosaženo použitím kombinace Chloraminu s 3%–5% Syntapon L pasty, kde spolehlivý a dlouhodobý desinfekční účinek směsi je zvyšován detergentními vlastnostmi Syntapon L pasty.

РЕЗЮМЕ

Применение обычных дезинфекционных средств и детергентов при дезинфекции патогенных грибов

Устанавливалась применимость хлорамина, аятаина и фамосепта для дезинфекции против патогенным грибам и искались пути, каким образом усилить действие этих веществ. Из чистых веществ самые лучшие, но далеко не удовлетворительные результаты давал аятаин. С другой стороны, очень хорошие результаты были получены с хлорамином активированным солями амония; его действие является очень скорым и мощным, хотя кратковременным. Самые надежные результаты давала комбинация хлорамина с 3%—5% Syntapon L. пасты. Надежный и долгосрочный дезинфекционный эффект этой смеси повышается детергентными качествами Syntapon L. пасты.

SUMMARY

Disinfection of Pathogenous Fungi Using the Current Disinfection Means and the Detergents

The applicability of Chloramin, Ajatin, and Famosept in disinfection against pathogenous fungi was investigated, and methods were searched for how to enhance the activity of those agents. Best, but still unsatisfactory results were achieved with Ajatin, if pure substances were used only. On the other hand, very good results were achieved when using Chloramin activated by ammonium salts; its effect is very rapid and powerful, but of a brief duration only. Most sure results were achieved when using Chloramin combined with 3—5 % Syntapon L-paste, where reliable and durable disinfecting activity of the mixture is elevated by the detergent qualities of Syntapon L-paste.

LITERATURA

1. Raška a spol.: Desinfekce, desinsekce a deratisace, Stát. zdrav. nakl. II. vydání, Praha 1956.
- 2. Harris, J. C. — Hard surface cleaners, Soap. Sanit. Chem. 27, VI, 1951. — 3. Waddoens, A. L. — Surface — activ agents, Soap. Perf. Cosmet. X. 1950, 23. — 4. Pokorný, Přívora, Buchna: Čs. epidemiologie, mikrobiologie, imunologie, 2, 83, 1956.

Celostátní sjezd Čs. společnosti biochemické bude uspořádán ve dnech 4.—9. září 1957 v Praze-Albertov, Ústav J. E. Purkyně. Dodatečně přihlášky účastníků sjezdu (posluchačů) přijímá prof. dr. J. Hořejší, vědecký sekretář Čs. společnosti biochemické, Praha II, U nemocnice 5.

Из практики

Нейбауер М., Дубен И., Дубен З.: Пастерелловая ангина	183
Браздова К., Алдова - Клечкова Е.: Опыты с паразитологическим осмотром населения провинции Сев. Гамген в Корее	186
Полак Г., Немец И., Нейвирт И., Блажкова П., Зита З.: Влияние гамма глобулина на подвижность лейкоцитов у человека	188
Абсолонова О., Фрагнер П., Патера В.: Микологические находки в мокроте при легочном туберкулезе	192
Вошта И.: <i>Ondatra zibethica</i> L. — резервуар лептоспир в Чехословакии	195
Седлак И., Дворжакова В.: К вопросу диагностики и терапии постдиссентерических артритов	197
Покорный Я., Гавлик О.: Очищение контаминированных культур лептоспир с помощью мембранных фильтров	204
Маных И., Покорный Я.: Применение обычных дезинфекционных средств и детергентов при дезинфекции патогенных грибов	209

CONTENTS

Suchanová M., Patočka F.: An Attempt to Attain L Forms of <i>Listeria monocytogenes</i>	133
Seeman J.: Findings of <i>Listeria monocytogenes</i> in Rodents	140
Soběslavský O.: Experimental Infection of the Domestic Fowl (<i>Gallus gallus domesticus</i>) with <i>Rickettsia burneti</i>	146
Šerý V., Strauss J.: The Incidence of Ornithosis and Salmonellosis in the Black-Headed Gull (<i>Larus ridibundus</i> L.)	152
Mornsteinová D., Albrecht P.: Experimental Infection of the Mouse <i>Micromys minutus</i> with the Virus Czechoslovak Tick-Borne Encephalitis	157
Patočka F., Kubelka V., Korych B.: Cultivation of the Encephalomyelitis enzootica suum Virus in Homologous Tissue I.	162
Korych B., Patočka F., Kubelka V.: Cultivation of the Encephalomyelitis enzootica suum Virus in Tissue Culture of Homologous Tissue II.	166
Duben J., Neubauer M., Duben Z.: <i>Corynebacterium pyogenes bovis</i> — A Comparison of the Strains of Animal Origin with Human Variants	169
Motl J.: Micromethod for Quickly Detecting the Nitrate Reduction	179

From Practice

Neubauer M., Duben J., Duben Z.: Angina due to <i>Pasteurella</i>	183
Brázdová K., Aldová-Klečková E.: Experiences with the Parasitological Examination of the Inhabitants of the Province North Hamgen in Corea	186
Polák H., Němec J., Neuwirth J., Blažková P., Zita Z.: The Influence of Gamma-Globulin on the Motility of Human Leucocytes	188
Absolonová O., Frágner P., Patera V.: Mycological Findings in Sputum of Patients with Lung Tuberculosis	192
Vošta J.: <i>Ondatra zibethica</i> L. as a Reservoir of Leptospirae in Czechoslovakia	195
Sedlák J., Dvořáková V.: A Contribution to Diagnosis and Therapy of Postdysenteric Arthritis	197
Pokorný J., Havlík O.: Purification of Contaminated Cultures of Leptospirae with Membrane Filters	204
Manych J., Pokorný J.: Disinfection of Pathogenous Fungi Using the Current Disinfection Means and the Detergents	209

NOVÉ KNIHY

STÁTNÍHO ZDRAVOTNICKÉHO NAKLADATELSTVÍ

MUDr Ladislav Polák

PATHOGENESE EKZÉMU S HLEDISKA REFLEXNÍ THEORIE

Autor rozdělil monografii na dvě části. V první uvádí rozsáhlou nejnovější literaturu ekzémů a rozebírá kriticky názory cizích autorů. Druhá část obsahuje výsledky autorových pokusů na morčatech a jeho formulace hypotézy o vzniku a šíření sensibilisace opírající se o učení I. P. Pavlova. Práce je určena pro dermatology, neurology a střediskové lékaře, kteří se zajímají o problém ekzémů.

Stran 152, vyobrazení 13, cena kart. výtisku Kčs 12,90

MUDr Jaroslav Skála

ALKOHOLISMUS

V našem odborném písemnictví je dosud citelný nedostatek publikací o alkoholismu. Tuto mezeru vyplňuje monografie MUDr J. Skály. Autorovi se podařilo prokázat, že alkoholismus je hospodářským i politickým problémem nejen u nás, ale i v zemích na východě a západě. Kapitoly o léčebných zařízeních, léčbě a jejích výsledcích ukazují dlouholetou autorovu zkušenost v tomto oboru. Stať o alkoholismu v soudní psychiatrii napsal MUDr J. Bartošek, kapitolu o práci protialkoholních poraden soc. prac. A. Mařová. Kniha je vhodně doplněna řadou tabulek, názorných grafů a obrazů.

Je určena nejen lékařům, ale i zdravotnickým pracovníkům, kteří se účastní prevence a léčby alkoholismu a všem, kteří o tuto otázku mají zájem.

Stran 232, vyobrazení 27, cena váz. výtisku Kčs 30,—

MUDr Milan Morávek

PŘÍSPĚVEK K UČENÍ O SIGNÁLNÍCH SOUSTAVÁCH

Autor kriticky hodnotí na základě vlastního bohatého experimentálního studia současný stav výzkumu signálních soustav u nás i v zahraničí a přináší mnoho nových pohledů do této tematiky a řadu podnětných návrhů pro další zpracování této otázky. Velkým kladem jeho práce je spojení teorie s klinikou. Práce přináší mnoho nového pro všechny pracovníky, kteří se zabývají vyšší nervovou činností, zejména pro fyziology a neurology.

Stran 204, vyobrazení 35, cena kart. výtisku Kčs 18,10

Doc. MUDr M. Vojta — doc. MUDr K. Kubát

MATKA A DÍTĚ — III. vydání

Knížka je malou učebnicí pro nastávající matky. Seznamuje je se změnami, které se dějí v organismu ženy v průběhu těhotenství, při porodu a v šestinedělí, dále s počátky vývoje dítěte po narození (do tří měsíců) a se základními pravidly životosprávy v tomto údobí ženina života. Závěrem jsou v knížce shrnuta všechna důležitá ustanovení o sociální pomoci a péči o hmotné zabezpečení matky.

Stran 112, vyobrazení 52, cena kart. výtisku Kčs 5,36

KNIHY OBDRŽÍTE VE VŠECH PRODEJNÁCH n. p. KNIHA