

TULARÉMIE LABORATORNÍ DIAGNOSTICKÉ METODY

M. HEJZLAR, B. LUKÁŠ

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie v Praze

Tularémie patří mezi typické antropozoonózy. Je relativně snadno přenosná na člověka a rozšířena je prakticky po celém světě.

Původcem choroby je mikrob, nejčastěji nazývaný *Pasteurella tularensis* (Bergey; syn. *Bact. tularense*, *Bruc. tularensis*, *Francisella tularensis*).

V posledních letech bylo zjištěno, že některé kmeny izolované v Americe (USA) a v Evropě a v Asii se od sebe poněkud liší, a to především ve virulenci (americké kmeny jsou vysoce virulentní, mimo jiné i pro králíky, zatímco tzv. euroasijské kmeny jsou pro králíka velmi slabě virulentní) a fermentativních enzymatických vlastnostech. Úmrtnost onemocnělých osob byla dříve (před zavedením antibiotické terapie) vyšší v Americe (5—9 %) než v Evropě (1—2 %).

V posledních letech dochází k celé řadě onemocnění u lidí i v Československu, což klade zvýšené nároky na rutinní mikrobiologické laboratoře. Tularémie byla dříve považována spíše za vzácně se u nás vyskytující onemocnění a laboratorní diagnostice byla také věnována velmi malá péče.

Aktuálnost situace dala podnět ke vzniku této skromné práce, která má sloužit jako přehled současných používaných laboratorních metod.

Kultivace

Pasteurella tularensis se zřídka podaří zachytit na kultivačních médiích v primoizolaci, poněvadž růst na běžných kultivačních půdách vyžaduje speciální podmínky, které se in vitro obtížně konstruuji.

Studium růstových podmínek na přesně definovaných médiích ukázalo, že *P. tularensis* vyžaduje přítomnost 13 (i více) aminokyselin: arginin, kyselina asparagová, cystein,*) histidin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, prolin, serin, threonin, tyrosin, valin (alanin, fenylalanin, tryptofan). Nezbytné jsou glutamin, cystein a histidin. Velká důležitost se též přikládá thiaminu a sperminu (spermidinu)^{1,2}. Výkonná kultivační půda musí obsahovat potřebné množství glukózy, chloridu sodného a dále nárazníkový systém, který vyrovnává iontovou bilanci narušovanou nadměrnou produkcí amoniaku z aminokyselin, vyvolanou metabolizujícími pasteurelami. Optimální růstová teplota se pohybuje v úzkém rozmezí okolo 36,8—37,1° C. Velmi důležité je i stále udržování dostatečné vlhkosti v termostatu během kultivace — nej-

lépe jednoduchým způsobem: pozvolným odpařováním vody ze dna velké Petriho misky. Klasické půdy — MacCoyova, Chapinova⁵ a Francisova⁶ se dnes již málo používají — jsou málo výkonné a vyžadují při izolaci z infekčního materiálu velká inokula; některé kmeny nelze na těchto půdách vůbec zachytit. Obě půdy se uplatňují při udržování kmenů již adaptovaných**) a byly nahrazeny půdami citlivějšími, účinnějšími, které současně dovolují provádět diferenciální diagnostiku. Velmi rozšířenou, zvláště na západě, je půda obsahující glukózu, cystein, krev, agar — GCBA (Downs et al⁷).

Nám se velmi dobře osvědčila půda s Na thioglykolátem, glukózou, krví a agarem — TKGA (Lukáš, Libich⁸), ať již při izolacích, pasážích, přípravě antigenu apod.; na této půdě se rovněž podařila primoizolace *P. tularensis* z člověka^{9, 10}. Půda se plně vyrovná GCBA.

Na TKGA a GCBA je možná kultivace z několika málo živých buněk. Na TKGA se objeví kolonie za 24—72 hod. po naočkování materiálu. Kolonie se vyskytují ve dvou nebo ve třech formách: S, NS typ (Eigelsbach et al¹¹), S, SR, R (Olsufjev et al¹²).

S — forma: lehce vypouklé, lesklé, neprůhledné, bílé až bělošedé kolonie, máslové konsistence, velikost 2—3 mm; virulentní.

Ns a; SR forma: vypouklé kolonie, neprůhledné, šedé barvy, matné, máslové konsistence; oslabená virulence.

Ns b; R forma: ploché kolonie, mírně vyvýšený střed a mírně zvednutý okraj, slabě průhledné, šedavé a šedavě modré barvy; avirulentní.

Jednotlivé typy se dají odlišit též, přejeleme-li kolonie zředěným roztokem krystalické violeti nebo pomocí akriflavinového testu¹¹. Tato charakteristika však nemůže být jediným spolehlivým kritériem pro třídění kmenů z hlediska virulence. Bylo by možné uvést ještě další kultivační charakteristiky, které však mají určitý význam pro specializované pracovníky a pro rutinní klasifikaci a diagnostiku neposkytují zásadní vodítko. Kolonie rostou bez viditelné reakce ve svém okolí, dají se dobře setřít s povrchu a jsou dobře suspenzovatelné ve fyziologickém roztoku. Růst na GCBA je obdoby, kolonie však mají nazelenalý odstín a okolí kolonií tvoří úzkou, zelenavě viridující zónu.

Potužník et al¹³ doporučují cystino-hemoglobinový agar podle Rhamy¹⁴, který jsme rovněž

*) Podle Ransmeyera et al.^{3, 4} síra přidávaná do médií musí se nacházet v určité konfiguraci — mající -SH skupinu (cystein, cystin, thioglykolát Na apod.).

**) Vhodnější je lyofilizace kmenů. Plně virulentní kmeny uchovávají svou virulenci však jen při stálém pasážování přes živý organismus — morče.

s uspokojivými výsledky vyzkoušeli. Kolonie vyrůstají na této půdě za 2—5 dní a dosahují velikosti 2—6 mm.

Z ostatních tuhých médií, které se dnes používají, uvádíme půdu podle Wona¹⁵, Hooda¹⁶, Gaspara et al^{17,18} nebo v poslední době podle Levina¹⁹. Zcela jednoduchou půdu navrhl Snyder et al^{20,21} (tuhé i tekuté médium) obsahující pepton, NaCl, glukózu, kys. thioglykolovou, agar.

Z tekutých kultivačních prostředí jsme získali dobré zkušenosti v experimentálních podmínkách (izolace, pomnožení, biochemická aktivita) s modifikací naší tuhé půdy²², ale bez přísady agaru — thioglykolát Na, glukóza, krev liq, resp. jsme krev nahrazovali králičím sérem 5% TGKL - TGSL²², a jednak se nám osvědčilo médium, jehož rozpis uvádíme. Růst se projevuje zřetelným zákalem půdy (již za 36—48 hod.). Médium je vhodné pro rychlou přípravu antigenů pro sklíčkovou aglutinaci a zdá se být i vhodné pro přípravu vakcíny.

V posledním roce jsme získali dobré zkušenosti s přidáním čištěného živočišného uhlí (granulovaného, např. typu Charcoal) k médiu v množství 0,03 %. Působí jako vazač některých toxických zplodin, především stop zbytků mastných kyselin.

Na západě se často pro submerzní, kontinuální kultivaci a zvláště při přípravě živé očkovací látky používá médium podle Millse et al²³, obsahující kazein hydrolyzát, glukózu, cystein, NaCl a sušený kvasnicový autolyzát (hydrolyzát se může nahradit též aminokyselinami) nebo médium podle Trauba et al¹ (obsahuje 13 aminokyselin) a podle Nagle et al²⁴. Posledně jmenovaní doporučují u kmenů s redukovanou virulencí přidat uracil, adenin a guanin.

Mezi speciální kultivační půdy počítáme dnes:

Thioglykolátový krevní agar (TKGA)⁸

Bacto Peptone Organofarma	10,0 g
	(10—20,0 g Difco)
Glukóza	10,0 g
NaCl	10,0 g
Thioglykolát sodný čs.	4,0 g
	(3,0 Difco)
Defibrinovaná králičí krev	50,0 ml
Bacto Agar	20,0 g
	(17,0 g Difco)
Destil. voda ad	1000,0 ml
	pH — 7,2

GCBA⁷

Meat extract Difco	0,3 %
Pepton Difco	1,0 %
NaCl	0,5 %
Cystein HCl	0,1 %
Glukóza	2,5 %
Agar	1,5 %
Defibr. králičí krev	3—5 %
	pH — 7,1

Cystino-hemoglobinový agar (CHA)^{13,14}

Beef Heart Infusion Difco	50,0 g
Proteose pepton Difco	10,0 g
NaCl	5,0 g
L-cystin	1,0 g
Bacto Agar Difco	15,0 g
Hemoglobin Difco	200,0 g
Destil. voda ad	1000,0 ml
	pH — 6,8

Blood free (SB) médium¹⁵

Spermidine phosphate (Nutritional Biochemical Co)	1,0 mg
n-Acetyl-glucosamine (Mann)	100,0 mg
d-Histidine HCl	0,5 g
dl-Glutamic acid	100,0 mg
NaCl	0,5 g
Yeast extract (Difco)	0,5 g
Peptone (Difco)	1,0 g
Orotic acid (Nutritional Biochemical Co)	10,0 mg
Glukóza (50%)	2,0 ml
Cysteine HCl (20%) (Eastman)	0,5 ml
Agar	1,5 g
	pH — 7,2

Půda dle Hooda¹⁶

A — Lab Lemco (beef extr.) Oxoid	0,3 g/100 ml
Pepton (Evans)	0,5—3,0 g
NaCl	0,5 g
Agar (Davis)	1,25 g
Destil. voda ad	100,0 ml
B — (složky se přidávají odděleně jako sterilní roztoky)	
Glukóza — 50% soluce	5,0 ml
l-Cystein hydrochlorid — 10%	1,0 ml
l-Histidin hydrochlorid — 10%	1,0 ml
Kataláza puriss. — 1%	0,1 ml
Plazma (lidská, oslí, koňská)	5,0 ml
	pH 6,6 — 6,8

Půda dle Gaspara et al¹⁷

Tryptose Broth Difco (w. thiamin)	2,6 %
Cystein hydrochlorid	0,5 %
Natrium thioglykolát	0,2 %
Glukóza	1,0 %
Agar Difco	1,0 %
Defibrinovaná králičí krev s duolitem C-3	5,0 %
	pH — 7,0

Autoři zlepšili záchytnost i růst pasteurel přidáním kationového iontoměniče do kultivační půdy, speciálně Duolitu C-3 s vodíkovým cyklem. Příprava takovéto půdy je velmi náročná¹⁸.

Tekuté médium

Trypton Difco	17,0 g
Yeast Extract Difco	3,0 g
Proteose No. 3 Pepton Difco	5,0 g
Glukóza	2,5 g
NaCl	4,0 g

I-Cystin Merck	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,75 g
Fildensův extrakt z králíčích krvinek	50,0 ml
Agar Noble Difco	0,50 g
Redestilovaná voda do pH — 7,3	1000,0 ml

Při přípravě některých shora uvedených půd si musíme být vědomi, že především u TKGA půdy velmi záleží na kvalitě thioglykolátu sodného (především na jeho čistotě a čerstvosti) (resp. cysteinu) a na druhu peptonu. Řada peptonů působí na *P. tularensis* inhibičně, zvláště jde-li o záchyt mikrobů z malého inokula. Při přípravě TKGA půdy proto doporučujeme přezkoušet nejprve thioglykolát a pepton, než vyrobíme větší množství TKGA půdy.

Průkaz na zvířeti

Nejvíce užívanou metodou pro průkaz tularémického onemocnění je inokulace podezřelého materiálu vnímavému a citlivému zvířeti, nejčastěji bílé myšce a morčeti. Tímto způsobem mohou být vyšetřeny orgány uhynulých nebo zabíjených zvířat, přenašeči infekce, suspenze z orgánů, tkání, tělních tekutin, nemocných nebo zemřelých osob. Materiál se nejčastěji injikuje subkutánně, může být také podán per os, intraperitoneálně, nebo při podezření z kontaminace perkutánně na velmi lehce skarifikovanou pokožku. Identifikaci onemocnění pak provádíme podle patologicko-anatomického obrazu uhynulých nebo zabíjených zvířat a kultivací mikrobů ze sleziny, jater, lymfatických uzlin apod. Částečky orgánů homogenizujeme ve skleněných mixerech (v třecích miskách hrozí velké nebezpečí infikování) s fyziologickým roztokem a inokulujeme v množství 0,1—0,5 ml podle cesty aplikace. Při kultivaci z ektoparazitů postupujeme podobně, ale přidáváme 0,5 j/ml benzylpenicilínu a 5 j/ml polymyxinu k ochraně před kontaminací. Řekli jsme si, že po inokulaci pokusným zvířatům posuzujeme patologicko-anatomický obraz. Je proto na místě uvést stručnou charakteristiku onemocnění u morčat a myšek a rovněž patologicko-anatomický obraz.

Po inokulaci materiálu pokusným zvířatům dojde po inkubační době 3—7 dnů k nápadným příznakům: zvířatům se ježí srst, jsou nadměrně dráždivá, rychle ubývají na váze, postupně u nich klesá chuť k jídlu, snižuje se svalový tonus a po počáteční vysoké teplotě dochází ke kolapsovitému stadiu s podnormálními teplotami a postupně nastupující agonií. Do 14—21 dnů po inokulaci infekčního materiálu obvykle všechna zvířata uhynou. V místě inokulace infekce u pokusných zvířat dochází obvykle k větší nebo menší nekrotizaci, svodné lymfatické uzliny jsou hemoragické a kazeózní. Játra jsou pokryta žlutohnědými nekrotickými ložisky, slezina je plná drobných miliárních uzlíků. Časté jsou i granulomy na peritoneální

výstelce. Plíce mohou být normální nebo jeví diskretní uzlíky, rozsáhlé nekrózy či široká splyvající bronchopneumonická ložiska. U myšek je nejvíce postižena slezina a nálezy nejsou tak typické jako u morčat. Nakonec je ještě třeba připomenout rozdíl v inkubační době u euroasijských kmenů 3—7 dnů, proti kmenům americkým 1—4 dny.

Při vyšetřování podezřelého materiálu provádíme vždy průkaz na zvířeti; doporučujeme však současně provést i kultivaci na speciální citlivou půdu. Je nutno si uvědomit, zvláště u lidského materiálu, že negativní kultivace bývá často způsobena nevhodně vybraným materiálem, nebo již „skutečnou nepřítomností“ mikrobů v materiálu (zvláště v krvi, kde se mikroby vyskytují u člověka jen ojediněle).

Názory, že mikrob v lidském organismu rychle ztrácí svou virulenci, biologickou aktivitu a schopnost pomnožování (Simpson, Tomášek aj.), musíme na podkladě pokusů z posledních let považovat za nesprávné a velmi zjednodušené.

Tkáňové kultury

Tkáňová kultivace *P. tularensis* patří k moderním metodám, které umožňují lépe studovat celulární mechanismy parazitismu tularémického mikroba²⁵⁻²⁸. Shepard²⁵ na HeLa buňkách prokázal, že růstový cyklus u virulentních kmenů je rychlejší než u avirulentních (generační cyklus je podobný jako na kultivačním médiu — porovnáno s půdou podle Wona). Fagocytóza byla závislá na typu (druhu) přidaného séra. Úspěšný růst na HeLa buňkách v Eaglově médiu (s 25 % morčecího séra) popisuje Watanabe, Huziwara²⁶. Merriot et al²⁸ referují o úspěšné kultivaci in vitro na L myších fibroblastech, buňkách hovězích ledvin a lidského amnia. Schopnost se množit a přežít byla v přímé závislosti k virulenci kmenů. Množení silně virulentních kmenů bylo přibližně stejně rychlé ve všech typech buněk a iniciální virulence se zachovávala i při dalších pasážích v tkáňových kulturách. Intracelulární pomnožování vyvolalo u L-myších fibroblastů cytopatogenní efekt. Růstové křivky v L-fibroblastech byly rovněž ovlivněny typem a množstvím séra s přidanými živinami v extracelulárním prostředí.

Morfologie

Pasteurella tularensis vyniká tvarovou pestrostí. Tvoří kokoidní, kokobacilární větší nebo drobné útvary. Pasteurely zachycené z infekčního materiálu jsou často ve formě drobných tyčinek (bipolární převážně v tekutých médiích). Jsou gramnegativní. Kokovité formy o rozměrech pod 300 mikronů jsou filtrabilní. Virulentní kmeny jsou více polyformní, kmeny s oslabenou virulencí vykazují větší uniformitu.

V elektronovém mikroskopu vykazuje *P. tularensis* velmi delikátní strukturu s nízkou elektronovou hustotou. Nemá pravé pouzdro ani bičíky. Je nepohyblivá.

Mikroskopické sledování nám pomůže spíše při studiu izolovaných mikrobů než při záchytu z infekčního materiálu. Zvláště tzv. otiskové preparáty jsou málo spolehlivé pro správnou identifikaci. Tkáňové preparáty barvíme Giemsovou (Romanovsky — Giemsa), zředěným karbolfuchsinem nebo polychromatickou eozinomethylenovou modří. Gramovo barvení použijeme až při identifikaci vykultivovaných mikrobů.

Biochemická aktivita

Podrobněji studovali fermentaci uhlohydrátů Downs et al²⁹, Francis³⁰, Skrodzki³², Olsufjev et al³¹. Z jejich výsledků můžeme shrnout, že glukózu fermentovaly (bez tvorby plynu) všechny testované kmeny, maltózu a manit většina kmenů, levulózu asi polovina, glycerin pouze kmeny americké. Metabolismus uhlohydrátů v diagnostice nemá velké upotřebení a nebyly nalezeny ani žádné rozdíly mezi kmeny virulentními a avirulentními s výjimkou fermentace glycerinu (amer. kmeny).

Z enzymů byla zjištěna glutamináza a asparagináza³³. Velký význam zdá se mít citrulinureidázový systém^{34, 33} a zdá se být proto i velmi nadějný citrulinový test³⁴. Virulentní kmeny jej degradují na CO₂, NH₃ a ornithin (citrulin pozit. systém), avirulentní kmeny mají vesměs test negativní (citrulin negat. systém). K tomuto testu lze použít tekutou půdu s tryptonem, proteose peptonem, Fildesovým extraktem (str. 7). K půdě se přidá 0,4 % citrulinu a vhodný indikátor pracující v rozmezí pH 6,0 — 8,0.

Test virulence

V některých případech, zvláště při hromadném výskytu onemocnění nebo při zhoršených epidemiologických podmínkách, je vhodné zjistit virulenci izolovaného tularemického kmene.

Nejspolehlivěji posoudíme virulenci zkoušeného-izolovaného kmene, když jej inokulujeme v odstupňovaných kvantech skupinám pokusných zvířat. Nejvhodnější jsou k tomu (podle pořadí citlivosti) tato laboratorní zvířata: bílá myš, morče, křeček, králík. Nejčastěji použijeme bílých myšek nebo morčat, kterým vpravíme vyšetřovanou mikrobiální suspenzi subkutánně v množství od jednotlivých do tisíců mikrobů. Plně virulentní kmeny smrtí zvířata po aplikaci jednotlivých buněk — myšky za 7—14 dnů, morčata za 7—21 dnů.

Antigenní struktura

Při chemické analýze extraktů z kultur *P. tularensis* byly zjištěny tyto frakce³⁶:

- I proteinová (6%),
- II vázaný komplex bílkovin, polysacharidů, nukleinových kyselin (31 %),
- III vázaný komplex bílkovin a polysacharidů (13 %),
- IV lipoidy (35 %),
- V nízkomolekulární zbytky hydrolýzy (14 %).

Frakce II a III precipitovala ve vysokém ředění se spec. králičím sérem. Bílkovinná složka se skládala asi ze 17 aminokyselin. U R kultur (avirulentní) chyběla frakce I a III. Vakcínové kmeny — SR — měly přítomný celý komplex, ale procentuálně v menší míře. Šipicina³⁵ na podkladě této analýzy připisuje frakci II a V O-antigenu, III a IV Vi-antigenu.

Ethyléterová preparace⁴⁰⁻⁴³ uvolňuje z mikrobů antigenní frakci, která při 4500 obr./min. nesedimentuje. Tento „solubilní“ antigen je imunogenní pro krysy a myši^{40, 41}. Purifikace vysolováním, diferenciální centrifugací a dialyzováním vede k získání frakce uniformní antigenicity. Ormsbee^{42, 43} nacházel asi 4—6 povrchových antigenních frakcí u fenolové extrakce, solubilní antigen vedl k vytvoření až i 9 precipitačních linií. Absorpční test v ultrafialovém a infračerveném světle neprokázal ani stopy nukleinových kyselin — byla proto (i podle elektronové mikroskopie) vyslovena domněnka, že antigen představuje fragmenty buněčných stěn. Vypreparovaný antigen obsahoval komplex polysacharidů, aminokyselin, organický fosfor. Odstranění lipidních složek nenarušilo sérologickou a imunogenní aktivitu. Sérologická a imunogenní aktivita extraktu byla dobrá a maximální ochrana myšek nastávala po aplikaci 0,1 mg.

Past. tularensis ukazuje na určitou antigenní příbuznost s brucelami³⁶⁻³⁹. Francis, Evans³⁶ aj. poukázali na to, že séra zvířat nebo nemocných aglutinovala rovněž s *Br. abortus* nebo *melitensis* (do 1/4—1/6 titru). Rovněž *P. tularensis* byla do určitého titru aglutinována sérem proti *B. abortus* a *melitensis*. Francis et al dále zjistili, že séra vysycená homologním tularemickým kmenem neaglutinovala s brucelovým antigenem, ale po vysycení s brucelovým antigenem si séra zachovala protilátky proti tularemii. Séra zvířat nebo lidí infikovaných brucelami reagují vesměs negativně s tularemickým antigenem^{37, 38}.

Nebyly prokázány antigenní vztahy s ostatními pasteurelami.

Lze říci, že antigenní struktura *P. tularensis* není sice definitivně rozřešena, ale dala až dosud pro praxi velmi významný poznatek: že všechny studované tularemické kmeny jsou antigenně víceméně identické. Rozdíly byly prokázány pouze mezi vysoce virulentními, středně virulentními a avirulentními kmeny.

Fluorescenční mikroskopie

Přímý průkaz mikrobů z materiálu pomocí antiglobulinů konjugovaných s fluorescein-izothicyanátem nebo lyssamin-rhodaminem je v zásadě možný, ale vyžaduje relativně velkou denzitu mikrobiálních částic — nejméně cca 3×10⁵/ml resp. g. Dále je na závadu nespécifická reakce v menším procentu případů. Rychlé ověření identity vyizolovaných mikrobů pomocí fluoreskujících protilátek je velmi cennou a dostatečně spolehlivou metodou⁴⁴.

Uplatnění této metody předpokládá základní technické vybavení, které dnes řada laboratoří v ČSSR má, ale další nezbytný předpoklad — komerční výroba (resp. alespoň centralizovaná výroba) značených fluoreskujících protilátek — není zatím splněn. Znemožňuje to uplatnění této velmi dobré metody v současné době. Vlastní výroba konjugátů v té které laboratoři je delikátní, náročná a mohla by vést k velmi nestandardním a pochybným výsledkům.

Určování citlivosti izolovaných kmenů na chemoterapeutika

K testům citlivosti je možno použít jako jednu z nejvhodnějších TKGA půdy s tou výhradou, že není plně spolehlivá pro posouzení účinku chloramfenikolu a neomycinu.

Kvalitativní test. TKGA půdy naočkovujeme běžným způsobem kulturou zkoušeného kmene a po zaschnutí přikládáme disky antibiotik a jiných chemoterapeutik v množství ne více než 5 disků na 1 plotnu o průměru 10 cm. Inhibiční zóny bývají poměrně velké a dobře čitelné. Minimální potřebná inkubace je 40 hodin při 37°C za dostatečné vlhkosti. Podle potřeby lze inkubaci prodloužit. Rychlotesty jsou na tularémické mikroby velmi obtížně aplikovatelné a nejsou spolehlivé.

Kvantitativní test. Použijeme plotnovou zředovací metodu⁴⁵ a nařídíme vždy příslušné antibiotikum v odstupňovaných množstvích přímo do čerstvě připravené a na 50°C ochlazené TKGA půdy. Po utuhnutí očkujeme na povrch takto připravené půdy zkoušené kmene v čarách v množství 6—10 kmenů na jednu plotnu. Odečítáme opět nejdříve za 48 hodin. Nepřítomnost růstu hodnotíme jako účinnou minimální inhibiční koncentraci příslušného antibiotika (chemoterapeutika), okem viditelný růst svědčí o neúčinné koncentraci.

Pro přehled uvádíme stupeň citlivosti tularémických kmenů vůči antibiotikům na základě literárních dat i vlastních zkušeností s více než 70 izolovanými kmeny.

Citlivost *P. tularensis* na antibiotika v mcg/ml test. půdy

Antibiotikum	Procento kmenů citlivých ke koncentraci				
	do 1 mcg	1—3 mcg	3,1 až 5 mcg	do 10 mcg	více
Kanamycin	75%	19	6	—	—
Micerin	48	32	17	3	—
Streptomycin	55	27	14	4	—
Tetracyklin	35	32	24	8	2
Chloramfenikol	28	35	20	12	5
Penicilin G	prakticky neúčinný				
Ampicilin	prakticky neúčinný				
Polymyxin	prakticky neúčinný				
Erythromycin	0	0	5	15	80

Souhrn

Autoři podávají úplný přehled současných diagnostických metod u tularémie s uvedením potřebných technických dat. Užívanější metody jsou kriticky zhodnoceny a konfrontovány s praktickými zkušenostmi autorů. Práce je doplněna úplným přehledem základní literatury. Ve sdělení II. bude podrobným způsobem rozbrána sérologická diagnostika.

Literatura

1. Traub A., Mager J., Grossowiec N.: J. Bact. 70:60; 1955.
2. Bowden J. P.: J. Inf. Dis. 110:23; 1962.
3. Ransmeier J. C., Schaub I. G.: Arch. Int. Med. 68:747; 1941.
4. Pansmeier J. C., Stekol J. A.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 51:85; 1942.
5. McCoy G. W., Chapin Ch. W.: Publ. Health Bull. 53:17; 1952.
6. Francis E.: Jama 91:1155; 1928.
7. Downs C. M., Coriell L. L., Chapman S. S., Klauber A.: J. Bact. 53:89; 1947.
8. Lukáš B., Libich J.: Čs. EMI 11:290; 1962.
9. Lukáš B., Vlasák Z.: Čs. EMI 10:121; 1961.
10. Kyntera F., Vortel V., Kraus Z.: Voj. zdrav. listy 32:138; 1963.
11. Eigelsbach H. T., Braun W., Heering K. D.: J. Bact. 61:557; 1951.
12. Jemeljanova O. S.: Tuljaremija, Medgiz, Moskva 1960.
13. Rhamy S.: Amer. J. Clin. Path. 3:121; 1933.
14. Potužník V.: ústní sdělení.
15. Won W. D.: J. Bact. 75:237; 1958.
16. Hood A. M.: J. gen. Microbiol. 26:45; 1961.
17. Gaspar A. J., Tresselt H. B., Ward M. K.: J. Bact. 82:564; 1961.
18. Gaspar A. J., Ward M. K., Tresselt H. B.: J. Lab. Clin. 55:633; 1960.
19. Lewin M. A., Trupin J. S., Cabelli V. J.: Apl. Microbiol. 10:407; 1962.
20. Snyder T. L., Engley F. B., Penfield R. A., Creasy J. C.: J. Bact. 52:241; 1946.
21. Snyder T. L., Penfield R. A., Engley F. B., Creasy J. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 63:26; 1946.
22. Lukáš B.: Čs. EMI 11:246; 1962.
23. Mills R. C., Univ. Kans. Quart., Prog. Rept. Res. USA Chem. Corps. 1. Jan. — 31. Marz 1954.
24. Nagle S. C., Anderson R. E., Gary N. D.: J. Bact. 79:556; 1960.
25. Shepard C. L.: J. Bact. 77:701; 1959.
26. Mc Etree H., Downs C. M.: J. Inf. Dis. 109:98; 1961.
27. Merriot M. J., Shoemaker A., Downs C. M.: J. Inf. Dis. 108:136; 1961.
28. Watanabe Y., Huziwara T.: C. R. Soc. Biol. 154: 1690; 1960.
29. Downs C. M., Bondy C. C.: J. Bact. 30:485; 1955.
30. Francis E.: J. Bact. 43:343; 1942.
31. Olsuffjev N. G., Jemeljanova O. S., Dunajeva T. N.: Žurn. Gig. Epid. Mikrobiol. Immunol. Praga 1:305; 1957.
32. Skrodzki E.: Bull. Inst. Med. Morskie; 8 (1/2); 51; 1957.
33. Flemming D. E., Foshay L.: J. Bact. 71:324; 1956.
34. Marchett N. J., Nicholes P. S.: J. Bact. 82:26; 1961.
35. Šipicina O. K.: Dan. SSSR 105:315; 1955.
36. Francis E., Evans A. C.: Publ. Health. Rep. 41:1273; 1926.

37. *Knothe H.*: Über die Epidemiologie der Tularämie. J. A. Barth, Leipzig 1955.
38. *Parnas J., Rozowski T., Wysocka F.*: Tularemie, PZ WL, Warszawa 1957.
39. *Saslaw S., Carlisle H. N.*: Amer. J. Med. Sci. 242: 166; 1961.
40. *Larson C. L., Bell J. F., Owen C. R.*: J. Immunol. 73:221; 1954.
41. *Bell J. F., Owen C. R., Larson C. L.*: J. Inf. Dis. 97:162; 1955.
42. *Ormsbee R. A., Bell J. F., Larson C. L.*: J. Immunol. 74:351; 1955.
43. *Ormsbee R. A., Larson C. L.*: J. Immunol. 74:359; 1955.
44. *Jaejer R. F., Spetzel R. O., Knehne R. N.*: Apl. Microbiol. 9:586, 1961.
45. *Schatten W. E., Parker R. F.*: Prox. Soc. Exp. Biol. (N. Y.), 82:574; 1953.
(Podrobně bude popsána metodika ve sdělení „Příspěvek k sérologii turarémie“.)