

DR. F. PATOČKA

O CHŘIPKOVÉM VIRU

Zvláštní otisk

z „ČASOPISU LÉKAŘŮ ČESKÝCH“,

80:813, 1941



V PRAZE 1941

NÁKLADEM VLASTNÍM. - TISKEM DRA ED. GRÉGRA A SYNA V PRAZE

O chřipkovém viru.*)

Dr. F. PATOČKA.

Od doby těžké pandemie v r. 1918, která v rychlosti, s níž dvakrát oběhla celou zeměkouli, a ve vysoké mortalitě postihující lidi zdánlivě nejméně disponované, t. j. zdravá, poměrně mladá lidská individua mezi 20 a 40 lety, má jenom slabý protějšek v nejtěžších středověkých morových ranách, našli bychom v mikrobiologii málo naléhavějších problémů, nežli je problém epidemické chřipky. Od světové války svět sice nezažil podobné katastrofální epidemie, ukáže-li se však alespoň přibližně pravdivým tvrzení starších epidemiologů, že se těžší chřipkové pandemie opakují každých 30 let, žijeme vlastně v očekávání snad stejně těžké přírodní pohromy a máme povinnost být na ni připraveni. Jsme přesvědčeni, že nikdo z moderních lékařů by nechtěl ještě jednou prožít tu trapnou zkušenosť, kterou učinil v r. 1918, kdy celá lékařská věda s novodobými zásadami epidemiologickými, immunologií a již dosti rozvinutou chemoterapií stála proti metle chřipky stejně bezmocná, jako středověký lékař před morovou ranou.

Řešení vědeckých problémů u každé infekční choroby počíná přesným zjištěním etiologického činitele. Až do r. 1918 byla většina mikrobiologů na světě přesvědčena, že ho zná, a to vlivem přesvědčivého učení školy Pfeifferovy. Tímto domnělým vyvolavatelem epidemické chřipky měla být

*) Částečně předneseno ve Spolku českých lékařů v lednu a v květnu 1939.

Pfeifferem nalezená gramnegativní tyčinka, tak zv. *Haemophilus influenzae* Pfeiffer, mikrob, který se ukázal, i když padl jeho etiologický nimbus, zárodkem velmi zajímavým, neboť byl prvním, u něhož byl prokázán životně důležitý význam akcesorních vzrůstových faktorů bakteriálních čili t. zv. mikrobielních vitaminů. Od doby, kdy se podařilo Pfeifferovi dokázati, že určité látky v erythrocytech obsažené (mimo běžnou krevní bílkovinu) jsou absolutně nezbytné ke vzrůstu tohoto zárodku na umělých kultivačních půdách, až do doby nejnovější, kdy bylo přesně zjištěno, že téměř akcesorními faktory pro *Haemophila influenzae* jsou vlastně látky dvě, z nichž jedna je identická s haematinem a druhá s Warburgovým kofermentem, učinila nauka o těchto látkách takový pokrok, že tvorí téměř samostatnou část mikrobiologie a netušenou měrou mění naše názory o bakteriálním metabolismu. Pokud se pathogenních vlastností bacila Pfeifferova týče, tedy nepochybujeme o nich v určitých případech právě tak, jako nepochybujeme o tom, že není vyvolavatelem epidemické chřipky. Pfeifferův bacil jako pathogenní agens v čisté kultuře byl prokázán u zvláštní formy dětských hnisavých meningitid, z největší části letálně končících. Ale i u dospělých lidí bývá nalezen buď jako jediné etiologické agens, nebo spolu s jinými hnisavými mikrobami při nejrůznějších zánětlivých procesech, které ovšem nemají s chřipkou nic společného. Tak na př. v naší laboratoři byl opětovaně diagnostikován, z toho v čisté kultuře dvakrát, v hnisu z Douglasova abscesu při pyogenních salpingitidách a parametritidách. Několikrát byl námi prokázán spolu se streptokokem salivarem v pleurálním exsudátu a jednou v čisté kultuře z empyemu plic. Lemierre a od té doby četní jiní autoři popsali několik sepsí u dospělých lidí, vy-

volaných Pfeifferovým bacilem, jež končily téměř vesměs smrtelně. Mulder a spolupracovníci v dobách mimo chřipkovou epidemii prokázali opětovaně Pfeifferova bacila jakožto vyvolavatele hnisavých bronchitid, při čemž chřipkový virus v těchto případech nebyl nalezen. Všechny tyto hnisavé, eventuelně septické affekce, které zřejmě k svému rozvinutí potřebují zvláštní terén (viz smrtelné meningitidy u malých dětí), jsou vyvolány podle novějších přesných rozborů mukosní fasi serologického typu B Pfeifferova bacila. S a R fase téhož typu, které chybí serologická specifičnost, podmíněná přítomností povrchové uhlohydrátové frakce a dále ostatní serologické typy bacila influenzae, t. j. typ A, C, D, E, F představují málo virulentní, nebo i snad úplně nepathogenní kmeny bakteriální, které se nacházejí buď ve smíšené kultuře při nespecifických chorobách lehkého rázu v hořeních dýchacích cestách anebo dokonce jako úplní saprofyty v normální dutině ústní v dobách mimo jakoukoli epidemii. Tento poslední, zajímavý průkaz bacila se podařil ovšem pouze při kultivaci za pomoci penicilinu, látky extrahované z plísň penicilium notatum, která má selektivně bakteriostatický účinek na mikroby grampositivní.

Již z toho, co bylo řečeno o pathogenitě Pfeifferova bacila, plyne jasně, že nemůže být vyvolavatelem tak eminentně kontagiosního onemocnění jako je epidemická chřipka. Jeho ubikviterní saprofytický výskyt v nosohltanu zdravých lidí mimo jakoukoliv epidemii, třebas ve fázích relativně nevirulentních, je jedním z průkazů nejpádnějších. Ale ani ony formy lidského onemocnění, které předpokládají přítomnost bacilů v mukoidní fasi typu B, tedy zárodků o maximální virulenci, nevyvolávají kolem sebe žádných epidemii, ba jsou dokonce pro nejbližší okolí prakticky nena-

kažlivé, ačkoliv je nutno předpokládat, že i zde byla dáma možnost kapénkové infekce, neboť vstupní branou ve všech těchto případech je více než pravděpodobně nosohltan. Přímo experimentální průkaz neschopnosti Pfeifferova bacila vyvolati typické chřipkové onemocnění podal Smorodintseff, který 80 dobrovolníkům, dosud neprodělavším chřipku, nastříkal do nosohltanu živé, z části i mrtvé kultury Pfeifferova bacila, čerstvě vypěstované u příležitosti epidemie právě řádící, ale vyvolal u nich pouze lehké zvýšení teploty a nevolnost, ale ani v jediném případě typickou chřipku. Živé mikroby bylo lze v nosohltanu prokázati nejvýše do 3 dnů, pak rychle zmizely. Titr protilátek proti nim byl lehce zvýšen. Že tato celková nevůle, vyvolaná intranasální infekcí Pfeifferovým bacilem, nemá opravdu nic společného se skutečnou chřipkou třeba sebe abortivněji probíhající, o tom nade vší pochybnost svědčí týmž autorem studovaný krevní obraz těchto dobrovolníků, který ukazoval lehké změny, charakteristické pro přítomnost bakteriálních zánětlivých ložisek v těle, ale nikdy ne charakteristickou leukopenii, která se vždy u člověka ukáže během typické chřipky.

Druhé bakterielní agens, na něž byla několik let upoutána pozornost badatelů jakožto na domnělého vyvolavatele epidemické chřipky, jest tak zvané *bacterium pneumosintes*, podle Bergeyovy klasifikace *Dialister pneumosintes*, isolované dokonce z filtrátu výplachu nosohltanu nemocných chřipkou, a to za podmínek nejstriktnejší anaerobiosy. I v tomto případě jde o zárodek nesmírně zajímavý, neboť toto bakterium se právem označuje jako jedno z nejmenších a nejstriktnejší anaerobních bakterií. Svou velikostí se pohybuje skutečně na pomezí viditelnosti dobrým laboratorním mikroskopem a také ta okolnost, že pro-

chází hrubšími bakterielními filtry, zdá se ho takřka přibližovati skupině největších filtrovatelných virů. Ovšem při bližším šetření lze snadno poznati, že tato velejemná gramnegativní teyčinka je skutečným bakteriem rostoucím v nepatrných koloniích na půdách, obsahujících větší kvanta celé krve. Američtí autoři Olitzky a Gates, objevitelé tohoto mikroba, provedli řadu pokusů na opicích, které jím infikovali, a tvrdí, že vyvolali příznaky, podobné chřipce. Dnes ovšem víme, že běžná většina laboratorních opic nepatrí právě mezi zvířata na chřipku nejvnímavější a proto zejména ve světle nových experimentů s fretkami posuzujeme tyto nálezy dosti skepticky. Rockefellerovým ústavem byla sezvána komise, do níž pozvání zástupci všech velkých bakteriologických ústavů evropských, která měla definitivně rozhodnouti na základě pokusů, provedených před ní, o etiologické roli tohoto mikroba. Za Pasteurův ústav se zúčastnil této komise Böez, který ve své zprávě ocenil objev jako zajímavý, ale z jeho resumé vysvítá, že otázku nemohl nikdo z účastníků považovati za rozrešenou a on sám si zachoval značnou reservu vyznívající skepticky pro posouzení úlohy mikroba, jakožto pathogenního agens v lidském organismu vůbec. Dalším studiem tohoto mikroba se zabývalo ovšem nepoměrně méně autorů, než studiem bacila Pfeifferova, patrně proto, že jeho isolace je dosti obtížná. Zde sluší citovati zejména Ginse, kterému se kultivace opětovaně zdařila a který podává také jeho podrobný popis. V celku je možno říci, že se naprosto nepodařilo identifikovati tento zárodek jako etiologického vyvolavatele epidemické chřipky z pochopitelných důvodů (jeho velmi striktní anaerobosa) a lze mu ještě méně, než bacilu Pfeifferovu, přičítati schopnost vyvolávati tak nesmírně kontagiosní a až pandemicky se šířící onemocnění,

jako je chřipka. Zdá se, že jeho úloha jakožto komensálního hosta v nosohltanu člověka je ještě mnohem méně významná, než role polosaprofytických typů bacila Pfeifferova.

Pandemie tak zvané španělské chřipky v r. 1918, od které se očekávalo, že definitivně prokáže vůdčí etiologickou úlohu *Haemophila influenzae*, vyvolala naopak téměř revoluční změnu názoru na původce této choroby. Svrchu zmíněná epidemiologická fakta a pak absolutní nepravidelnost výskytu Pfeifferova bacila na nejrůznějších místech zeměkoule právě při nejtěžších formách chřipky ukazovala čím dál, tím zřetelněji, že skutečného vyvolavatele choroby nutno hledati v kategorii filtrovatelných virů. Experimentální priorita náleží asi Krusemu, který již několik let před chřipkovou pandemií se pokusil o průkaz filtrovatelného agens. Selter v r. 1918 byl patrně prvním, který během této epidemie přenesl virus sterilním filtrátem na člověka dosud zdravého a vyvolal u něho onemocnění podobné chřipce. Nicolle a Lebailly a současně Dujarric de la Rivière nezávisle na těchto pokusech pokusili se s úspěchem o přenos chřipky sterilními filtráty výplachů nosohltanových, vstříknutými parenterálně. Sahli za vyvolavatele chřipkových infektů supponoval tak zvaný komplexní virus, t. j. simultánní účinek bakterií a filtrovatelného viru na organismus. Celkem je možno říci, že několik let po skončené pandemii většina autorů na celém světě se přikláňela k názoru, že agens chřipky musí být skutečným filtrovatelným virem a nikoliv bakteriem, zcela tak, jak pro to svědčila zmíněná fakta: ne-smírná nakažlivost této choroby, podrobně studované zvláštnosti epidemiologické, nestálost a měnlivost bakteriologického obrazu ať už při chřipce prosté, nebo chřipkových komplikacích, konečně klinický výraz choroby a jí vyvolaný

krevní obraz, jehož hlavní charakter, t. j. leukopenie, doprovází často choroby virového původu.

Předpokládaný virus ovšem nemohl být znám, dokud nebylo nalezeno zvíře pro něj citlivé, a je dosti pravděpodobno, že by nebyl vůbec podnes objeven, nebýti pokusů amerického veterináře Shope, jemuž prvemu patří zásluha, že definitivně objasnil etiologii chřipky vepřů, o níž je možno se s velikou pravděpodobností domnívat, že je důsledkem lidské pandemie v r. 1918. Jako samostatná klinická jednotka byla tehdy objevena Koenem, lavinovitě se rozšířila ve vepřových farmách a od té doby zůstala již známa jako stále se opakující, nebezpečná a značně nakažlivá choroba těchto zvířat. V těžších případech vepřové chřipky dochází podobně, jako u chřipky lidské, k bronchopneumonii, která je někdy smrtící. Z plicních ložisek zhybnulých zvířat, z bronchiálních lymfatických uzlin a částečně i z hořených cest dýchacích podařilo se Shopemu ve sterilních filtrátech získati virus, který v takto čisté formě, inokulován zdravým vepřům intranasálně, vyvolával lehké, chřipce podobné, ale bezhorečnaté a krátkou dobu trvající onemocnění. Současně vykultivoval týž autor z hlenu hořených cest dýchacích i z plicních ložisek gramnegativní tyčinky, biologicky vlastnostmi nápadně podobnou lidskému Pfeifferovu bacilu, která byla nazvana *Haemophilus influenzae suis*. Čistá kultura tohoto haemophila, naočkována zdravým zvířatům, způsobila zvýšení temperatury, ale za ostatních příznaků nepodobných vepřové chřipce. Teprve simultánní vpravení filtrátu, obsahujícího virus a kulturu haemophila intranasální cestou vyvolalo obraz úplně analogický typické vepřové chřipce, při které docházelo také k smrtícím plicním komplikacím. Tak se stalo, že to, co předpokládal Sahli pro chřipku lidskou, t. j. tak zv. komplexní virus, mohlo být s určitostí dokázáno

jako specifické agens pro analogické onemocnění vepřového dobytka. Šlo snad ještě o to, ukázati, který z obou faktorů komplexu, tentokrát již známého, je důležitější pro vypuknutí choroby. Dnes, kdy zejména immunologie vepřové a ovšem i lidské chřipky je zevrubně probádána, zůstává nesporným, že virus je činitelem mnohem závažnějším. Jednak je tím, co podmiňuje klinický charakter onemocnění a činí z něho chorobu epidemicky přenosnou, a což je zvláště důležité, je faktorem důležitým immunobiologicky, neboť proti němu je namířena ohromná převaha protilátek, takže zvíře pouze čistým virem aktivně immunisované není schopno prodělati typickou infekci.

Z německých autorů byl první Köbe, který potvrdil Shopeovy nálezy a rozšířil je za průkazu stejného komplexu i pro podsvinčata.

Shopeho práce byla (jak tito autoři sami přiznávají) vzorem Smithovi, Andrewesovi a Laidlawovi při obnovených pokusech o probádání etiologických záhad lidské chřipky. Příležitost se našlytla jmenovaným autorům v průběhu epidemie v r. 1933, při čemž hlavní jejich zásluhou bylo, že mimo běžná laboratorní zvířata použili pro inokulaci filtrátů z nosohltanových výplachů lidí čerstvě onemocnělých chřipkou také fretky, albinotické a domestikované odrůdy tchoře, u které právě před tím zjistili nesmírnou citlivost na virus psinky. S počátku zkoušeny nejrůznější inokulační cesty, ale teprve po instilaci infekčního materiálu intranasálně se dostavil úspěch. Zvířata po 48hodinové inkubační době onemocněla příznaky, zřetelně upomínajícími na lidskou chřipku, i když velmi mírnými. Co bylo stejně důležité (jak autoři správně pochopili), byl fakt, že zdravá zvířata, dána do klece k fretkám onemocnělých, ochuravěla za další dva dny za úplně analogických symptomů. Tím našli současně nejenom zvíře na chřipkový

virus specificky citlivé, u něhož vyvolali onemocnění lidskému analogické, čímž splnili dva z nejdůležitějších Kochových postulátů, nýbrž dokázali i to, co právem považujeme za jeden z nejdůležitějších charakterů chřipkového viru, t. j. schopnost jeho spontánního přenosu z nemocného zvířete na zvíře zdravé, jež jest nutnou podmínkou možnosti vzniku rozsáhlých a pro chřipku charakteristických epidemí.

Průběh experimentální chřipky u fretky i u jiných zvířat na ni citlivých a některé z jiných důležitých biologických vlastností chřipkového viru, tak na příklad kulturu v tkáňových explantátech, rozbor jeho antigenních vlastností, jakož i pokusy o aktivní immunisaci podáme v dalším podle vlastních pokusů, které jsme konali v průběhu r. 1938 až do r. 1940 jednak s originálním anglickým kmenem chřipkového viru, známým v odborné literatuře jako W. S., který nám byl dán k disposici laskavě dr. Smithem, jednak s řadou vlastních, u nás isolovaných kmenů, z nichž nejtypičtější byly kmeny, zachycené při epidemii v jarních měsících 1939. Z těchto posledních některé zaslány do laboratoře dr. Taylora z Rockefellerova ústavu v Budapešti, který jich použil k obsažným srovnávacím studiím kmenů, isolovaných všude ve střední Evropě, s kmeny anglickými a americkými. Pokud samozřejmě určité kapitoly bádání o chřipkovém viru nebyly a ani nemohly býti předmětem našich vlastních pokusů, pokusíme se je doplnit, pokud to je dnes vůbec možno, údaji z literatury tak, aby byl celek přehledným obrazem dnešního stavu našich vědomostí o chřipkovém viru.

Určitá potíž byla s opatřením dostatečného počtu fretek k pokusům. Skupovali jsme je nejdříve po různu od chovatelů-lesníků, ale ještě během r. 1938 se nám podařilo založiti si vlastní chov.

z něhož pak pocházela většina našich zvířat. Při pokusech na fretkách jsme vesměs používali Shopenem zavedené methody, podle níž intranasální instilaci materiálu předchází lehká narkosa zvířete etherem. Zvířata určená k pokusům byla chována v karanténě delší dobu, aby se spontánně nenakažila od personálu obsluhujícího zvířata, a tím se také neimunisovala. Infikovaná zvířata byla od sebe prostorově dostatečně oddělována, aby nedošlo k spontánnímu rozšířování infekce. Některé albinotické fretky (zvláště ty, které byly dodány přímo od chovatele-lesníka), jsou tak citlivé, že již pouhé rozčilení, spojené s měřením teploty v rektu, jim zvyšuje teplotu. Takováto zvířata musela být tomuto úkonu alespoň čtrnáct dní každodenně zvykána a teprve když jejich rektální temperatura zůstávala stále ve stejných mezích, byla použita k vlastnímu pokusu. Normální teplota fretky v rektu přesahuje téměř vždycky 38° C, dosahuje průměrně kolem 38.5° C, ale ani temperatury něco nad 39° C nejsou tak zcela vzácné. Zkušenost, kterou jsme si ověřili také ústním sdělením dr. Taylora, nás přivedla k tomu, že jsme za teploty, pro chřipku pathognomické, počítali teprve ty, které přesahovaly 39.5° C.

Průběh choroby albinotických fretek, infikovaných anglickým virem W. S. intranasálně po lehké narkose, byl ve většině případů tento. Dělala-li se infekce během dne, tu se ukázalo, že zvíře ještě týž den za několik hodin mělo zvýšenou teplotu, pravděpodobně jakožto důsledek narkosy. Druhého dne, t. j. za 24 hodin, byla temperatura normální, k večeru třetího dne někdy se opět začínala zvedat, aby pravidelně třetího dne, t. j. zhruba po 48 inkubačních hodinách, náhle vylétla kolem 40° C, někdy dokonce i přes 41° C, při čemž současně vypukl ostatní syndrom příznaků, upomínající tak nápadně na chřipku lidskou: silná světloplachost zvířete, těžký dech, kýchání, hlenohnisavý výtok z nozder, někdy i kaše!, zvláště později; zvukem byl zcela podobný kašli malého dítěte. Náhlý vzestup teploty, který je jedním z nejmarkantnějších příznaků fretčí chřipky, trval pouze něko-

lik hodin. V několika případech, při náhodném měření byl zaznamenán také v noci (což je velmi důležité, neboť někdy tímto způsobem může onen charakteristický symptom uniknout pozornosti experimentátorů). Čtvrtý den již nastával pokles teploty téměř k normálu, ačkoliv celkové symptomy ještě několik dní přetrhávaly (zvláště nechuť k jídlu), ale průměrně kolem pátého dne se dostavilo nové zhoršení celkového stavu, spojené někdy ještě s jedním menším výstupem teploty, dech zvířat se tížil, zvířata se plazila, někdy i válela v záchvatech dušnosti, jindy pronikavě naříkala, pak se stala apatickými a pravidelně šestý, někdy také sedmý den umírala. Při sekčním nálezu byly nalezeny zánětlivé katarální změny na sliznici nosních mušlí a bronchů, a hlavně v plicích byla nápadná rozsáhlá bronchopneumonická ložiska, silně překrvená, zachvacující někdy oba plicní laloky a zhusta hemoragického charakteru. Tato smrtící pneumonická komplikace byla ovšem důsledkem viru zvláště silného (kmen W. S. patří mezi nejsilnější doposud známé) a nad to pasážemi na fretku maximálně adaptovaného. Zde také smrt byla pravidlem a pouze aktivní immunisací, jak jsme se později přesvědčili, mohlo být této komplikaci zamezeno. Jako výjimku jsme zaznamenali v jednom případě (asi z 10), že infekce virem W. S. nepřinesla žádného nápadného zvýšení teploty, ačkoliv smrtelný konec přibližně za stejnou dobu byl analogický případům ostatním.

Při pokusech o přenos chřipkového viru na fretku přímo z člověka byl průběh onemocnění odlišný od právě popsaného v tom, že nedocházelo nikdy k bronchopneumonickým komplikacím a snad i katarální příznaky hořených cest dýchacích byly o něco menší; uzdravení zvířete nastávalo průměrně do jednoho týdne. Několik takových přenosů se nám podařilo realisovati během r. 1938, v žádném případě se nám však nepodařilo provésti více než tři pasáže na fretkách, při čemž však symptomy byly stále slabší a nakonec již kmeny nemohly být dále přeočkovány. Zcela jinak tomu bylo během prvních čtyř měsíců v r. 1939, kdy řádila v Čechách sice benigní (pokud se mortality týče), ale s velikou morbiditou a s typickými příznaky spojená chřipková epidemie. K infekci jsme po-

užívali výplachu z nosohltanu pacientů, kteří nebyli nemocni déle než dva dny. S výplachy nemocných v dalším stadiu choroby jsme měli výsledky buď naprosto neurčité nebo zcela negativní. Obyčejně jsme to prováděli tak, že jsme požádali nemocné, aby několikráté důkladně vykloktali bouillonem s fosfáty, který jsme jim za tímto účelem dodali. Takto získaný materiál byl buď centrifugován nebo filtrován přes Chamberleinův filtr L 2 a z něho nakapáno fretkám v narkose intranasálně 1½—2 ccm (část takto nakapaného bouillonu ovšem fretka vyprská zpět). Nejvyšší teplota, kterou jsme pozorovali při isolaci těchto kmenů viru, byla 41,2° C. Pasáže z fretky na fretku jsme dělali podle methody anglických autorů, a to tak, že jsme zvířata zabíjeli etherem nejpozději týž den, kdy byla naměřena nejvyšší teplota, načež ostrou kyretou jsme jim vyškrábali sliznici na nosních mušlích i s hlenem na nich lpicím. Sliznice byla rozetřena za pomoci skelného prášku asi s dvacateronásobným množstvím bouillonu, prudce centrifugováno a centrifugát použito k pasážím. Záhy jsme se ovšem přesvědčili, že filtrované a tedy úplně sterilní výplachy vyvolávají chorobu u fretek mnohem méně typickou a jelikož těch několik málo lidských mikrobů, které mohou zbýti v centrifugátu při použití dostatečného počtu otáček, nemůže mít žádného vlivu na fretku, užívali jsme v dalších pokusech o isolaci vesměs již pouze centrifugátu. Jeden z nejúčinnějších isolovaných kmenů pocházel ze směsi výplachů dvou pacientů (dr. M. a I. Z.), inokulované fretce 31. I. 1939. Tímto virem provedena řada pasáží a po sedmém se počala objevovat bronchopneumonická ložiska u zvířat, která vedla později k spontánnímu jejich úmrtí, podobně jako u viru anglického. Přes to však, jak se ukázalo v další řadě pokusů, nedosáhla nikdy virulence tohoto kmene, jejž budeme dále

označovati jako Z. M., pro experimentální zvířata oné síly, jakou měl kmen anglický W. S.

Francis byl první, kdo zjistil, že chřipkový virus, adaptovaný na fretku, lze přenést intranasální instilací také na bílou myšku. Počet pasáží fretkami, kterých je pro tuto adaptaci zapotřebí, je různý a mění se podle virulence viru. U myšek není vyvoláno onemocnění hořených cest dýchacího traktu, vzniká pouze bronchopneumonie; u silných virů zasahuje oba laloky a je tedy smrtelná, u slabých virů vznikají jenom isolovaná bronchopneumonická ložiska, která lze poznat sekčním nálezem, při čemž je nejlépe myšky zabíti mezi sedmým a devátým dnem od okamžiku infekce. Záchvácení pouze plicní tkáně, bez spoluúčasti hořejších dýchacích cest bylo právem považováno až do nedávné doby téměř všemi autory za důvod, proč experimentální influenza myší není mezi těmito zvířaty kontaktem přenosná, na rozdíl od téhož onemocnění mezi fretkami. Zcela nejnověji Eaton prokázal, že za zvláštních okolností silně účinné chřipkové agens, na př. kmen W. S., může kontaktem infikovat myši zdravé od nemocných, kdy umírající myši namáhavě vydechují a pravděpodobně přeče jen vystřikují z plic a bronchů kapénky tekutiny, obsahující virus. Anglický kmen W. S. aplikován v kvantu přibližně 3 kapek (tenkou injekční jehlou z 1 cm^3 stříkačky) plieního centrifugátu (zředění podle váhy asi 1:50), zabíjel myšky v našich pokusech za příznaků oboustranné kompletní bronchopneumonie za 4, někdy také již za 3 dny. České kmeny viru chřipkového z prvých pokusů z r. 1938 nemohly býti vůbec na myšku přeneseny, zato kmeny z epidemie v r. 1939 se daly vesměs po několika pasážích dobře adaptovat, zvláště kmen Z. M., který byl přenesen na myšku již po 3 pasážích fretkou a usmrcoval po pěti předběžných myších pasážích tato zvířata průměrně

šestý až sedmý den od okamžiku infekce za příznaků rozsáhlé bronchopneumonie, i když o něco méně hemoragického charakteru, než byla ona, kterou pravidelně vyvolával kmen anglický. Z toho je viděti, že chřipkový virus, jímž byla v Čechách vyvolána epidemie v r. 1939, byl virem velmi typickým a relativně také velmi aktivním.

Je přirozené, že první, o čem jsme se chtěli přesvědčiti, když jsme viděli, že chřipkový virus lidský je přenosný za naprosto typických symptomů na fretku i na myš, právě tak, jak to autoři popisují, bylo to, zda jak příznaky choroby hořenich dýchadel, tak bronchopneumonické komplikace jsou vyvolány pouze virem a nikoliv druhotnou bakteriální florou, čili jsou-li zejména bronchopneumonická ložiska prakticky sterilní, jak námnoze anglosaští autoři tvrdí. V hlenu z nosních mušlí fretek jsme našli nejrůznější floru, sestávající z kokků i tyčinek, z nichž však nic nebylo lze považovati za specifického vyvolavatele onemocnění. Jednou jsme vypěstovali u fretky pasterelám podobnou tyčinku, s počátku rostoucí na krvi, později i na obyčejném serum-agaru, která, jak jsme dodatečně shledali, byla asi identická s Haemophilum influenzae putorum Kairies. Plicní ložiska u fretek byla skutečně téměř sterilní, ale pouze při krátce trvající agonii. Trvalo-li umírání zvířete déle, nacházeli jsme tam zhusťa *B. protea*, jenž tam pronikl z dutiny ústní, v níž bývá u carnivorů obvykle přítomen. Plicní ložiska u myšek (čerstvě po smrti pitvaných) byla sterilní pouze při přímé kultivaci. Bylo-li užito pomnožení v bouillonu s játry, vyrostl téměř vždy alespoň viridující streptokok, při bližší identifikaci velmi podobný lidskému enterokoku. Zkoušeli jsme samozřejmě, zda je možné masivními dávkami tohoto mikroba, instilovanými intranasálně, vyvolati u myšek po narkose onemocnění podobné chřipkové pneumo-

ni. Ve všech těchto případech proběhly pokusy zcela negativně, neboť se ukázalo, že zvířata vůbec nijak neonemocněla. Pneumonie pneumokokové u myší, které byly vyvolány v řadě pokusů kontrolních, mají zcela odlišný charakter jak makroskopický, tak mikroskopický. Jsou tedy naše nálezy v plicních ložiskách u myší ještě chudší, než nálezy Herzbergovy, u něhož sice při přímé kultivaci asi 50% plicních ložisek zůstalo beze vzrůstu, zato však v druhých 50% nacházel obraz velmi pestrý a měnivý, takže se mu podařilo vypěstovat nejenom viridující streptokoky, ale i streptokoky hemolytické, staphylokoky a blíže neurčené gram-negativní tyčinky. Herzberg považuje floru, nalezenou v pneumoniích, za bakterie, které jsou i de norma v myších bronchiích, odkud samozřejmě přecházejí do plicních ložisek. My jsme při systematickém zkoušení sterility plicních ložisek používali k pasážím jenom takových orgánů, z nichž při přímé kultivaci nevyrůstalo bact. coli (někdy nalezeno v plicích při dlouhé agoně nebo pozdní pitvě, zejména v létě).

Zde je vhodné se zmíniti o domněnce Schmidtově, podpořené nálezy Kairiesovými a spolupracovníků. Autoři vyšetřovali velmi pečlivě bakteriální floru v nosohltanu fretek i myší a podařilo se jim nalézti u fretek v prvních generacích haemoglobinofilní tyčinku, příbuznou pasteurelám, kterou nazvali *Haemophilus influenzae putorum* Kairies. Později se jim podařilo nalézti také u myší tyčinku vlastnosti příbuzných té, jež nalezena u fretek. Oba zárodky podle autorů jsou za normálních okolností více méně saprofyty, asi tak, jako je Pfeifferův bacil influenze de norma nepříliš patogenní pro člověka. Podle jejich pojetí patří mezi tak zvané nehotovené vyvolavatele chorob. Pod vlivem nějaké provokace stávají se z těchto dosud klidných zárodků zárodky patogenní,

které jsou schopny vyvolávat onemocnění. Tato provokace může být docela nespecifického charakteru (nachlazení, vlivy meteorologické) a je tedy i patogenese chřipek nespecifická. Stejně tak vlastní etiologie chřipky není ve všech případech stejná, neboť právě nejrůznější bakterie mohou být provokovány k vyvolání klinických projevů onemocnění. U člověka bývá nejčastěji provokován Pfeifferův bacil, který zejména v kombinaci s pyrogenními zárodky (nejčastěji asi haemolytickým streptokokem) vyvolává obraz t. zv. epidemické chřipky. V jedné pozdější práci Kairies již připouští, že v tomto celkem nespecifickém procesu není vyloučena ani nějaká spoluúčast filtrovatelného viru. U fretek podle Schmidta a Kairiesa není tedy právě experimentální influenza vyvolána přenesením a uchycením lidského filtrovatelného viru, nýbrž tím, že nespecifickou provokací, t. j. étherovou narkosou a intranasální instilací většího kvanta cizorodé tekutiny dochází k provokaci patogenních vlastností *B. influenzae putorum*. Totéž platí pro myšky a u nich nalezené *Bacterium influenzae murium* Kairies.

Laskavostí dr. Kairiesa jsme dostali několik kmenů jeho bakteria, takže oba kmeny, které jsme isolovali v průběhu svých vlastních pokusů u fretek (a to jeden z bronchů při experimentální chřipce, druhý z dosud nepoužitého chovného zvířete, a to z abscesu žlázy u koutku ústního), mohly být identifikovány jako velmi pravděpodobně identické s kmeny Kairiesem popsanými. Jde opravdu o Pasteurellu, která pouze v prvních několika generacích potřebuje ke svému vzniku látky v krvi obsažené, jako ostatně přečetné zvířecí pasteurelly (z nichž některé na př. při kousnutí zvířete jsou přenosné i na člověka, u něhož mohou vyvolávat místní hnisání). Nebyly jsme však nikdy s to čistou kulturou tohoto zárodku vyvolati u fretek (ani po

narkose) chorobu podobnou oné, jakou vyvolává skutečný chřipkový virus, a tím méně hemoragická bronchopneumonická ložiska, jež by svým obrazem makroskopickým i histologickým odpovídala ložiskům u chřipkového viru.

Nejpádnější odmítnutí Kairiesových domněnek podali Waldmann a Köbe, kteří tvrdí, že mezi experimenty Schmidtovými a Kairiesovými a mezi pokusy se skutečnými filtrovatelnými pneumotropními viry, ať už u člověka, nebo u zvířat, není naprosto žádné paralely. Podle nich se totiž naprosto nepodařilo prokázati, že by ony zvířecí pasterelly byly kontaktem přenosné na zvířata zdravá a tedy schopny vyvolávati onemocnění epidemické, což, jak jsme již shora uvedli, je právě jedním z nejdůležitějších charakteristik chřipkového viru lidského a co bylo i s naprostou určitostí prokázáno pro experimentální chřipku, vyvolanou lidským virem mezi fretkami.

Celkem se nám podařilo během více než dvouletých pokusů isolovati na fretkách 8 kmenů chřipkového viru, z nich tři v r. 1938 byly velmi slabé a málo charakteristické, takže již při dalších pasážích na fretkách ztratily svou pathogenitu. Během epidemie v r. 1939 od ledna do dubna jsme mohli isolovati na fretkách celkem 5 kmenů chřipkových virů a považujeme za velmi pravděpodobné, že bychom jich byli mohli zachytiti třeba desateronásobný počet, kdybychom byli měli dosti zvířecího materiálu. Chřipky z r. 1939 se projevovaly u fretek velmi charakteristickými symptomy, jak shora vyličeno a daly se snadno adaptovati na myš. Anglický kmen W. S. a český kmen Z. M. chovány v pravidelných pasážích na myších téměř 2 roky a použity ke všem pokusům, o nichž dále bude zmínka.

Pro tyto pasáže, pokusy chemotherapeutické, pokusy o symbiotickém vlivu různých bakterií

na chřipkový virus a zkoušení antigenních vlastností chřipkového viru během celé této doby použito více než 4000 myšek. Měli jsme tedy dostatečnou příležitost studovat během různých ročních sezon i náhlých změn temperatury vliv počasí na průběh onemocnění u těchto zvířat. Zde by snad bylo na místě, abychom se několika slovy zmínili o tom, že pro něteré autory existuje ještě jedna domněnka o původu chřipkového onemocnění. Pro ty je celkem dosti lhostejné, zda spoluúčast na lidské chřipce mají převážně mikroby nebo převážně virus, v prvé řadě je epidemie určena faktory meteorologickými a telurickými (Walter) a infekt k nim přistupuje teprve ve druhé řadě. Rovněž Peyerer uvádí chřipkové epidemie v souvislost s počasím, neboť běžné epidemie prý vznikají vždy 6—10 dní po jeho náhlé změně. Týž autor však připouští, že velké pandemie na počasí závislé nejsou. Eckardt a spolupracovníci tvrdí, že při epidemické i pandemické chřipce je účast meteoropatických faktorů neméně důležitá, nežli účast faktorů, jež jsou předmětem bádání mikrobiologického. Rovněž i rozšíření epidemie souvisí s faktory meteorologickými a nejde tedy podle komunikačních cest a podle hustoty osídlení. Absolutní výška chřipkového onemocnění se řídí dle prostorové dynamiky epidemie, jejíž zákony jsou ještě neznámy, ale v nichž určitě hraje vůdčí úlohu atmosféra a faktory telurické. Pokud nám byly přístupny práce tohoto druhu, nabyla jsme dojmu, že operují spíše s údaji spekulativní povahy, než experimentem. Přesto však nás naše pokusy přivedly k naprostu nespornému poznání, že experimentální chřipková infekce je velmi závislá na počasí a že tedy na meteoropatické hypotese o vzniku epidemické chřipky je něco pravdivého. Náš materiál pokusných myšek byl samozřejmě nesrovnatelně menší, než na př. v labora-

tořích amerických a anglických, ale měl pro naše pozorování jednu výhodu (pro myšky nevýhodu); že jsme totiž byli v průběhu jednoho celého roku donuceni nepřízní osudu držeti myšky v místnosti velmi málo vytápěné, jejíž temperatura se měnila podle vnějšku. Tu se pak ukázalo, že rozdíl v mortalitě myší, intranasálně infikovaných velmi standardně usmrcujícími viry Z. M. a W. S. při stejně velké dávce, u stejně těžkých a stejně živených zvířat, činil tři i více dnů, o něž nastávala za zvláště krásného letního počasí smrt později, než na podzim nebo v zimě. Ale i náhlé zhorskání počasí během mírné sezony mělo v zá�ěti zkrácení inkubační doby nebo zvýšení počtu úmrtí u více infikovaných myší, při použití dávky právě stačící k usmracení. Někdy docházelo k neočekávaným a urychléným úmrtím před velkými letními bouřkami. Jako zvláště nepříznivé dlužno označiti počasí současně velmi vlhké a velmi studené. Jsme si vědomi, že naše pozorování je příliš málo obsáhlé, než aby nás opravňovalo k nějakým určitějším dedukcím, tolik však, zdá se, můžeme potvrditi, že existuje-li v celé mikrobiologii nějaký objekt vhodný pro badání meteopatická, je to s určitostí chřipkový virus.

Mohou tedy naše pokusy plně potvrditi údaje autorů dnes již možno říci z celého světa. Jak je z nich patrno, je zcela snadným úkolem během typičtější epidemie infikovati lidským chřipkovým virem fretku a tento virus po řadě pasáží přenést na myš. Je nutno při tom dbát především toho, aby chovná zvířata byla pečlivě isolována před stykem se zevním světem, aby se nestala imunními spontánním lehkým onemocněním před započetím pokusů. Druhým nutným předpokladem je použití materiálu z raného stadia choroby. Průkaz chřipkového viru ze suponovaných komplikací u člověka, jako chřipka intesti-

nální, chřipka ženských orgánů, případně z tak zvaných chřipkových encephalitid, se dosud, pokud nám je známo, nezdařil. Je velmi zajímavé a dosti těžko vysvětlitelné, že se průkaz viru obvykle nedáří ani z nejtěžší formy chřipkového onemocnění, t. j. ze smrtelných lidských bronchopneumonií. Vykládá se to tím, že bronchopneumonická ložiska lidská (na rozdíl od fretčích a myších) jsou tak massivně infikována bakteriální florou, zejména haemolytickým streptokokem, že virus v nich již zaniká. Pokusili jsme se o isolaci viru při bronchopneumonii na pitevním stole celkem třikrát, pokaždé s negativním výsledkem.

K vůli úplnosti jsme nuceni zde zaznamenati, že všude na světě byla vykonána dnes již těžko přehledná řada pokusů o isolaci chřipkového viru při sezonních katarech hořených cest dýchacích, probíhajících buď jako onemocnění naprosto izolovaná, nebo jako onemocnění hromadná, hojností výskytu a částečně i průběhem připomínající skutečnou chřipku. Tyto horečnaté katary hořených dýchacích cest bývají anglosaskými autory označovány jako choroby z nachlazení (common cold). Prvé takové pokusy pocházejí od samých objevitelů chřipkového viru, dále od Francise, Smorodintseffa, Muldera a celé řady jiných autorů a nikde v nich se nepodařilo nalézti virus podobný viru pravé epidemické influenze. Teprve v nejnovější době byly opět ověřeny starší pokusy Ducheze, Millse a Kneelanda, kterým se snad podařilo vypěstovati na kuřecích embryích virus common-coldu, a to skoro zároveň s objevem vlastního chřipkového viru. Novější práce většinou virus common-coldu rovněž pouze pěstují na allantochoriové membráně kuřecího zárodku, zdůrazňují dále jeho rozdílné vlastnosti kultivační (chybí změny na blanách vaječných, delší pasáže jsou téměř nemožné, rovněž jeho přenos na myš)

i antigenní (Francis a Thomas, Chapman a Hyde).

Nejzajímavější příspěvek tohoto druhu podal Herzberg a Gross, kterým se rovněž na jaře 1939 celkem z 12 výplachů pacientů nemocných z větší části horečnatými katary dýchacích cest, z menší části patrně chřipkou, zdařilo isolovati 2 kmeny poměrně těžce filtrovatelného pneumotropního agens, které vyvolávalo u myší seriově přenosnou pneumonii, upomínající na pneumonii, vyvolanou chřipkovým virem. Isolace tohoto pneumotropního agens se podařila přímým přenosem z člověka na myšku bez pasáže fretkou, při čemž pro zachycení viru bylo použito synergistického účinku simultanní infekce pneumokokkem. V dalších pasážích byl pneumokok z plicní tkáně filtrací odstraněn a sterilní filtráty očkovány dále, až po dlouhé řadě pasáží počaly vyvolávat charakteristické změny. Virus při zpětném přenosu na fretku nevyvolává u ní žádných horečnatých symptomů, jak je to pro chřipku charakteristické. Nelze ho téměř konservovati a porovnán s kmeny chřipkového viru, autorům přístupnými, jeví se antigenně zcela odlišným. Virus rovněž nemohl být autory identifikován se žádným ze známých virů pneumotropních, snadno přenosných na myšku (jako je na př. psittakosa nebo spontánní pneumotropní myší virus, popsaný Bormanem). Autoři nabyli tedy právem přesvědčení, že se jim podařilo isolovati z člověka virus, mající afinitu k hořením cestám dýchacím, o kterém je možno souditi, že snad by byl v určitém vztahu k lidským chorobám, označovaným jako choroby z nachlazení. Později podařilo se oběma autorům znázorniti virus i mikroskopicky, a to na povrchu plicních alveolárních epithelií, ale také uvnitř leukocytů, při čemž tvarem nápadně upomínal na filtrovatelné agens peripneumonie hovězího dobytka.

Experimentální práce s lidskou chřipkou u fre-

tek i u myší vyžaduje ovšem opatrnosti při hodnocení nálezů, a to zejména tam, kde by na př. hned po instilaci materiálu z člověka byla vyvolána v prvé pasáži těžká bronchopneumonie. Tak na př. Slanetz a Smetana popsali těžkou epizootii mezi fretkami s vysokou úmrtností zvířat za symptomů, upomínajících na těžkou chřipku. Plicní změny u zašlých zvířat byly méně intensivní, než u silně adaptované chřipky, ale vždy byly infikovány haemolytickým streptokokkem. Rovněž inkubační doba je mnohem delší než u influenze, při kontaktní infekci dokonce 10 dní. Důležitým rozpoznávacím znamením jest, že při této epizootii mohly být nalezeny inkluse na plicích. Ve všech těchto případech šlo patrně o vlastní fretčí pneumotropní virus immunologicky naprosto odlišný od viru lidské chřipky i od viru psinky, který, jak známo, je pro fretku ještě mnohem nakažlivější než chřipka. Gordon, Freeman a spolupracovníci vstříkovali myškám výplachy z nosohltanu zcela normálních lidí, myšky zabíjeli a ačkoliv jejich plíce nejevily změn, používali centrifugátu z nich k dalším pasážím. Po řadě pasáží vznikaly skutečně v myších plicích změny, částečně podobné na první pohled změnám, vyvolaným chřipkovým virem, ale histologicky naprosto odlišné. Autoři připouštějí, že se snad jednalo o spontánní myší virus, latentně v plicích přítomný, jenž byl řadou pasáží zesílen až k mírným klinickým projevům. Také Horsfall isoloval z plic myší virus, vyvolávající pneumonii u myší ostatních. Od chřipkového se liší velikostí, tím, že není pathogenní pro fretky a kompletně immunologicky. Rovněž Belling a Oelrichs potvrzeli, že při četných pasážích z plic fretek, myší, morčat a králíků mohou být aktivovány spontánní zvířecí pneumotropní viry od lidské chřipky naprosto odlišné, ale vyvolávající podobné změny. S tímto faktom prý nutno po-

čítat při pasážích chřipkového viru a nutno identitu chřipkových kmenů prokazovati pokud možno také vždy serologicky.

Průkaz o tom, že virus, projevující se chorobnými změnami v hořením dýchacím traktu a plísních fretky, případně myši, je skutečným virem lidské chřipky, by nebyl úplný, kdyby se nepodařilo (ač se to v humanní bakteriologii zřídka kdy dělá) již na zvířata adaptovaným infekčním agens zpětně infikovati člověka, a to za příznaků, podobných přirozenému lidskému onemocnění. Smith a Stuart-Harris popsali první případ laboratorní infekce, která propukla u jednoho z autorů při kontaktu s nemocnými fretkami po 48hodinové inkubační době za naprosto typických symptomů. Z nosohltanu tohoto nedobrovolného pacienta byl isolován virus, který hned přímo z člověka byl přenosný na myšku a choval se tedy jako virus adaptovaný; dalšími pokusy byly i antigenní vlastnosti tohoto viru shledány úplně identické s vlastnostmi virů, jimiž byly fretky nakaženy. Jinde Smith se zmiňuje o svém vlastním chřipkovém onemocnění mimo epidemii, jehož pramenem byly infikované fretky. O dalších dvou případech laboratorní infekce se zmiňuje také Francis; konečně Smorodintseff vykonal na 5 dobrovolnících pokus s chřipkovým virem a u všech vyvolal (na rozdíl od shora citovaného pokusu s Pfeifferovým bacilem) typickou chřipku. Naše vlastní zkušenosti mohou tato pozorování plně potvrditi. Samozřejmě, že sem zahrájeme jenom ona, která jsme učinili v periodě pokusů mimo jakoukoliv chřipkovou epidemii. Tu se pak opětovaně stalo, zejména při intranasální instilaci pasážového viru do nozder fretky, která se probouzela z narkosy, při čemž zvíře pravidelně značně prská, že mnohý z našich spolupracovníků, který byl nově přibrán k práci o chřipkovém viru,

onemocněl po 30 hodinách i po delší inkubační době lehkou nevůlí, někdy bolestmi hlavy, často světloplachostí, obyčejně zřetelnou rýmou a někdy i zvýšenou teplotou. Příznaky celkem upomínaly na velmi lehkou chřipku, ale onemocnění netrvalo nikdy déle než 2 nebo 3 dny. Typická inkubační doba a nedostatek možnosti chřipkového infektu z jiného zdroje nenechávaly pathogenesu těchto laboratorních onemocnění na pochybách. Že byly subjektivní i objektivní symptomy těchto chorob tak slabé, nesmí vůbec překvapiti, neboť pokaždé docházelo k infekci virem na zvířecí organismus intimně adaptovaným dlouhodobými pasážemi, jimiž samozřejmě pozbyl části své pathogenity pro člověka, jak se i jinde v literatuře shodně s námi vykládá.

Aby byl doplněn komplex dnešních vědomostí o chřipkovém viru, uvedeme na základě údajů v literatuře některá jeho důležitá charakteristika, i když jsme je všechna nepřekontrolovali vlastními pokusy. Velikostí náleží chřipkový virus patrně mezi viry středních nebo spíše větších rozměrů. Patří mezi jedny z mála virů, u nichž je téměř úplná shoda v určení velikosti jeho částeček methodou filtrační (gradocolové filtry) a metodou centrifugační. Kolísá mezi 80—120 mm (Elford, Andrewes). Teploty kolem 60° C jej snadno ničí. Rozprášen v kapkách na denním světle již během několika minut ztrácí virulenci (vlastní pozorování). Ve větším kvantu vydrží asi hodinu (Wells a Brown). Dokonce i konzervace viru v orgánech zvířat je těžkým problémem. Tak na př. výškrab z nosních mušlí zabité fretky vydrží prokázaně virulentní v příruční ledničce bez jakékoliv konzervační tekutiny 3—4 dny, je-li samozřejmě zabráněno jeho vysychání (doprava od nás do Budapešti). Přidání 50% glycerinu za temperatury pod 0 stupňů prodlouží vitalitu viru

pouze krátko. Podle pozorování, učiněných jinde, neosvědčila se příliš ani konservace viru v orgánech při temperatuře -10° C. Nejlepším konervačním prostředkem se nám ukázala býti směs rozetřených a vysušených plic se směsí fosfátů podle receptu: Krystalisovaný dinatriumfosfát 100 g, krystalisovaný monokaliumfosfát 17 g. Směs se vpravuje do ampulek, do každé asi po 1 g, ampulky se zataví a za sucha sterilisují. K rozetřeným pneumonickým plicím se přidávají za stálého tření fosfáty z ampulky, až směs nabude konistence velmi husté kaše (to se stává při poměru tkáně a fosfátů přibližně 1:1). Kašovitá směs se vysouší za nízké teploty v exsikátoru a plní do ampulek, z nichž se vyssaje vzduch. Ampulky se zatavují a chovají v ledničce (Wágner).

Tato methoda byla Lépinem popsána pro konservaci neurotropních virů ze zvířecího mozku a my jsme ji adaptovali po několika pokusech na virus chřipkový. Takto konservovaný virus byl přeočkován průměrně jednou za měsíc, později až za 2 měsíce po dobu asi 1 roku a dával nám vždy po přeočkování na zvíře téměř konstantní rezultáty, t. j. pro virus W. S. smrt mezi 3.—5. dnem, pro Z. M. virus o den až dva dny později. Za rok těchto pasáží se z neznámých příčin virus náhle oslabil a po řadě marných pokusů o regeneraci zahynul.

A g e n s c h ř i p k o v é je skutečným filtrovatelným virem, i když jeho filtrovatelnost není právě nejlepší a často, zejména při isolaci přímo z člověka, se tímto procesem velmi zřetelně oslabuje. Podle prací francouzských autorů (Dujarric de la Rivière) velmi dobře prochází filtry Chamberland L2, sice oslabený, ale přece jen zřetelně prochází také filtrem Ch. L₃. Podle pečlivých prací německých autorů prochází velmi dobře Berkelfeldem V, a dosti dobře Berkelfeldem N.

O prostupnosti gradocolovými ultrafiltry byla již učiněna zmínka. O schopnosti filtrace Seitzovými filtry se ménění různí. Köbe, Hare a Kun-Hui-Jen připouštějí, že jimi virus prochází. Celá řada jiných autorů, z německých zejména Herzberg, zaznamenala zcela negativní výsledky. Podle našich vlastních pokusů silné kmeny viru jako kmeny W. S. a český kmen Z. M. Seitzem procházejí, byť i oslabeny. Ba dokonce při svých prvních pokusech s právě zaslaným anglickým virem neviděli jsme rozdílu v délce choroby při infekci myšek Seitzovým filtrátem a centrifugátem při zředění plicní tkáně 1 : 50 až 1 : 80 a dvacetiminutové centrifugaci při 3000 obrátkách (instilováno pokaždé 0'08 tekutiny intranasálně). Při svých pokusech s kultivací chřipkového viru v tkáňových kulturách, jež budou níže popsány, jsme užívali k infekci explantátu pouze tekutiny filtrované Seitzem a jak se ukázalo, kvantum viru, filtrem prošlého, pomnožilo se v opětovaných pokusech v tkáňových kulturách snadno do množství, obsahujícího mnohonásobek smrtelné dávky pro myšku. Jelikož právě v této době (pokusy konány v létě) kmen viru W. S., udržovaný na myškách, jež náhodou současně prodělávaly spontánní Gärtnerovu infekci, zašel, museli jsme v další, déle než 1 rok trvající serii pokusů, užívat viru, jenž byl pomnožen v tkáňových kulturách, tedy téhož, jenž prošel Seitzovým filtrem. Musíme tedy souditi, na rozdíl od citovaných autorů, že účinné chřipkové viry Seitzovými filtry procházejí. (Samozřejmě byly dochovány kautely přesné filtrace, t. j. použito velmi malých tlaků a relativně krátké filtrační doby; na rozdíl od Herzberga jsme však používali tkáně, rozetřené ve fosfátovém bouillonu a nikoliv v Tyrodově roztoku k filtrace.)

Při pokusech až dosud vyličených byly zaznamenány hlavně pneumotropní vlastnosti chřipko-

vého viru. Nehodláme se zde zabývati rozborem pathologicko-anatomických a histologických nálezů při experimentální chřipce, které si vyžádají povolanějšího pera. Velmi stručně vyjádřeno, ukázalo se býti velmi pravděpodobným, že prvotním sídlem chřipkového viru jsou buňky epithelu, při lehčích případech hořených cest dýchacích, v těžších případech bronchů a bronchiolů, které prodělávají degenerativní změny a od nichž se infekce šíří ještě dále do plicních alveolů. Skutečně také již prvé pokusy anglických i amerických autorů u fretky i u myši svědčily pro to, že virus je v těle přítomen v prokazatelném kvantu pouze v hoření části dýchacího traktu, eventuelně v plicích. Dodatečně se však ukázalo, že toto pozorování není zcela přesné. Tak na př. Smorodintseff první nalezl chřipkový virus u myší zašlých na pneumonii v prokazatelných kvantech v krvi, ve slezině, v játrech. Souhlasí ovšem s názorem, že skutečně pomnožení viru nastává pouze v plicích. Týž dále zjistil, že intravenosní a intraperitoneální aplikace velkých kvant viru nevyvolává žádných zřetelných plicních metastas, naopak virus je během několika málo dní v těle zničen. Rovněž Azzi našel mimo plíce i v slezině a játrech malá kvanta přeočkovaného viru. Rickard a Francis docílil zřetelných plicních změn u myší při intravenosní infekci teprve 25.000násobnou smrtevnou dávkou viru a tehdy mohl býti virus prokázán i v játrech. Bieling při intraperitoneální aplikaci viru bílým myším prokázal pouze asi v 10% zvířat virus v ledvinách a v krvi, v mozku dokonce pouze v 5%.

I v lékařských kruzích se mnoho mluví o tak zv. intesinální formě chřipky. Jak jsme již uvedli, nepodařilo se dosud virus ze zažívacího traktu isolovati a také experimentálně vyvolati chřipkovým virem pouze onemocnění střevní, je prozatím vyloučeno. Přes to však máme dojem, že

četné z našich pokusů mohou býti s určitou rezervou pokládány za svědectví i o tomto organotropismu. Pozorovali jsme totiž, že více než 50% myšek ve všech našich pokusech, které zašly na bronchopneumonii v krátké době, mělo lehkou, ale zřetelnou enteritidu. U několika set z těchto zvířat jsme si dali práci a exaktní kultivaci ze střeva jsme se přesvědčili o tom, že v něm nelze nalézti bacterium, které by mohlo býti považováno za vyvolavatele této enteritidy. Jelikož tyto nálezy byly vždy stejné, ať k úmrtí docházelo v kterékoli roční době (a při jakkoliv měnlivé stravě) a jelikož tu i tam byly zabíjeny vždy z téhož chovu zdravé myšky kontrolní, nezbývá nám než supponovati chřipkový virus jako velmi pravděpodobného vyvolavatele těchto katarálních střevních změn. Do jaké míry je ovšem možno aplikovati tyto poznatky na člověka, netroufáme si říci.

Mnohem důležitější a při tom stejně málo jasná je otázka chřipkových komplikací centrálního nervstva, hlavně tak zvaných pochřipkových encefalitid. Pokud nám byla k disposici odborná literatura až do dnešního dne, nenašli jsme nikde zprávy o tom, že by byl nalezen knnen chřipkového viru primárně manifestně encefalotropní. Také v prvních experimentálních pracích o chřipce není žádné zmínky o tom, že by se podařilo vyvolati experimentálně encefalitidu ať už přímou inokulací viru do centrálního nervstva, nebo jako spontánní komplikaci chřipkové infekce intranasální cestou u zvířat, na chřipku specificky citlivých. Zajímavé v tomto směru jsou 2 práce od Daddi a Pana, v nichž došli autoři k závěrům navzájem kolidujícím. Ve starší práci inokulovali autoři řadu králíků chřipkovým virem intracerebrálně, načež zvířata zabíjeli a histologicky skutečně mohli prokázati encefalitické změny na mozku. V práci pozdější provedli ještě větší řadu po-

kusů, a to na myškách, aniž by tentokráte dokázali histologicky sebemenší změny. Uvážíme-li, že králík je zvíře na chřipku prakticky refrakterní, naproti tomu myš specificky citlivá, nelze pozitivní nálezy v prvním případě vykládat jinak, než latentní infekcí králíků nějakým vlastním encefalitickým virem. Cesty intracerebrální inokulace chřipkového viru, a to morčecím foetům, buď obnaženým císařským řezem nebo nabodnutým přes uterus, bylo užito ve dvou velkých pracích Woolpertově a Hermanově se spolupracovníky. V obou pracích bylo zjištěno, že virus z mozku se dostal do plic, v nichž se zřetelně pomnožil a vyvolal charakteristické změny. Čím mladší byl foetus, tím bylo zachvácení plícní tkáně intenzivnější. Mozek sám nejevil žádných změn. Tyto práce jsou zajímavé také ještě tím, že foetu bylo použito vlastně jako živoucích tkáňových kultur viru.

Je pochopitelné, že jsme se při svých pokusech snažili přispěti k objasnění tohoto problému v lékařství nad jiné důležitého, při čemž jsme považovali za vhodné použiti k nim zvíře nejcitlivější, t. j. fretku. Celkem jsme inokulovali tři dobře isolovaná albinotická zvířata po trepanaci subdurálně filtrátem viru W. S. Injikováno takové kvantum filtrátu obsahujícího virus (k témtoto pokusům použito filtru Berkelfeldova), které obsahovalo přibližně asi 4 dávky viru, pro fretky smrtelné. Tímtéž filtrátem současně infikované myšky zašly v obvyklé době za klasických symptomů pliených. 2 z těchto fretek nejevily vůbec žádných symptomů onemocnění, zůstaly naprosto zdrávy, ale když po době delší než 1 měsíc byly inokulovány materiálem, obsahujícím virus, chovaly se jako zvířata z části immunní. Třetí zvíře zašlo během devíti dnů za symptomů úplně odpovídajících banální fretčí chřipce. Při sekci nalezeny charakteristické pneumonické změny v plících, mozek však nejevil ani makroskopicky, ani histologicky žádných změn. Svým průběhem upomíná tento experiment velmi markantně pokusy, jež byly provedeny s morčecími foety. Operace byla provedena tak pečlivě, že můžeme s jistotou vyloučiti vniknutí viru, použitého k pokusu, intranasální cestou. Mimo tři popsáne experimenty, které jsme pova-

žovali v této době za rozhodující pro posouzení encefalotropismu viru W. S., provedli jsme ještě celkem 20 intracerebrálních inokulací myškám sterilními filtráty, obsahujícími přibližně jednu až dvě smrtelné dávky viru pro myš. Žádné ze zvířat nezašlo za příznaků encefalitidy, stejně jako u shora citovaných italských autorů. Měli jsme tehdy za to, že nás výsledek těchto experimentů opravňuje ke konklusím, že chřipkový virus ani ve svých nejsilnějších formách nemá běžně afinitu k centrálnímu nervstvu a jestliže jich snad přece někdy nabude, děje se tak jistě za poměrů naprosto výjimečných. Pedle toho by tedy byla většina encefalitid pochřipkových jiného původu, než chřipka sama.

Nelze však zamlčeti, že ještě nejnověji se otázka encefalotropismu chřipkového viru představila odborníkům v docela jiné formě, takže jsme nuceni připustiti, že virus, jevící se primárně jako čistě pneumotropní, může encefalotropních vlastností za zcela zvláštních okolností nabýti, případně mohou v něm býti zesíleny, je-li jimi již a priori, byť i naprosto skrytě, obdán. Burnet byl první, kdo pozoroval, že dlouhodobé pasáže některých chřipkových virů (opět virus W. S., ale i jiné) na vyvíjejícím se zárodku kuřete vedou k usmrcení kuřecích embryonů, při čemž postupně se u nich vyvíjí stále zřetelnější hemoragická encefalitis. Stuart-Harris první prokázal, že virus z těchto hemoragických encefalitid, veden dále v pasážích mezi myškami, očkovanými intracerebrálně, nabývá schopnosti zabíjet je za příznaků encefalitidy. Moore a Francis opakovali tyto pokusy s tím rozdílem, že kultivovali W. S. virus v tkáňových kulturách dle Maitlanda na rozdraceném kuřecím mozku. Virus se skutečně pomnožil a po řadě pasáží mozky myšek byl schopen vyvolati encefalitu. Týž encefalotropní kmen, aplikován intranasálně, vyvolal typickou smrtící pneumonii. S jinými kmény neměli autoři úspěchu (částečně také s kmenem Melbourne), z čehož dedukovali, že u kmene W. S. jde spíše o vlastnosti primárně za-

ložené, než zvláštním způsobem kultivace získané.

Jednou z nejzajímavějších kapitol bádání o chřipkovém viru je jeho schopnost kultivace v tkáňových kulturách buď metodou Maitlandovou nebo na vyvíjejícím se kuřecím zárodku podle modifikované metody Goodpastureovy. V celku možno říci, že chřipkový virus je jedním z nejlépe kultivovatelných (zejména na vajíčku) po viru vakcinálním. Prvé pokusy kultury na explantátech kuřecího zárodku v Tyrodově roztoku pocházejí od Smitha. Silný virus může v těchto kulturách prodělat i 100 pasáží, aniž by se jeho pathogenita pro myš zřetelně snížila. Týž autor použil dále 10denního vyvíjejícího se kuřecího zárodku k infekci, pasáže byly vykonávány každý třetí až čtvrtý den. Prvé vaječné pasáže nenechávají zřetelných stop. Po řadě pasáží se však vaječná membrána v místě infekce stává tlustší, lehce oedematosní, a v ní se objevuje řada malých bílých terčíků právě tak na hranicích viditelnosti. Virus v pasážích nabývá virulence pro kuřecí embryo, jež na konec zabíjí. Pro fretku a myš se virulence vaječných kultur pozvolna snižuje. Smithovy pokusy byly záhy potvrzeny Francisem a Magillem; největších úspěchů však dosáhl kultivací na allantochoriové mebráně Burnet, který provedl s různými kmeny dlouhé řady pasáží, při čemž některé viry asi od sedmdesáté pasáže vyvolávaly u kuřecích embryonů již shora zmíněnou hemoragickou encefalitidu. Pathogenita obyčejného australského viru (kmen Melbourne) pro fretku po této dlouhé řadě pasáží téměř úplně vyhasla, pro myš rovněž. Přesto však oba dva druhy zvířat velmi pravděpodobně prodělávají latentní infekci vaječným virem, neboť se u nich vyvine zřetelná immunita. Kmen W. S., kultivován týmž autorem ve stejně řadě pasáží, zachovával si zhruba svou pathogenitu pro fretku i pro myš. Köbe byl první, který

vypěstoval na vajíčku virus vepřové chřipky, ale nezdařila se mu kultura na embryonálních plicích morčete. Burnet, podobně jako dříve Smith, považuje již makroskopicky viditelné změny na vaječných membránách, které prostudoval také velmi podrobně histologicky, za charakteristické pro chřipkový virus, a souhlasí s názorem Smithovým, že jich je možno použít jak k hodnocení virulence viru, tak také k titraci účinku protilátek. Naproti tomu Herzberg, který měl s kultivací chřipkového viru stejně úspěšné výsledky jako předcházející autoři, je toho názoru, že změny, pozorovatelné na vajíčku, jsou pouhou reakcí na nespecifické podráždění cizím tělesem. Francis a Magill byli také první, kterým se podařilo bouillonový výplach z nosohltanu nemocného přímo po předchozí kongelaci a centrifugaci přenést na vyvíjející se membránu kuřecího zárodku a zesílit jej do té míry, že již pátá subkultura mohla být přenesena na myš, u níž pak po pěti dalších pasážích plícemi, až do té doby intaktními, vyvinula se zřetelná pneumonie, jež od šesté pasáže myšky zabíjela. Autoři tím ukázali cestu, která od té doby byla nastoupena i jinými autory a podle níž je možno isolovati virus epidemické influenze ve tkáňové kultuře přímo bez účasti citlivého zvířete.

K našim pokusům o tkáňovou kulturu chřipkového viru bylo vesměs použito Seitzových filtrátů z plic myšek, infikovaných kmenem W. S. Kultury na vaječném zárodku se nám nedářily. Jak jsme dodatečně shledali, příčina byla asi v tom, že jsme pasáže z vejce na vejce neprováděli již třetí nebo čtvrtý, nýbrž šestý až sedmý den. Mnohem zajímavějších výsledků bylo docíleno při použití metody dle Nig-Landsteinerova, při níž fragmenty tkáňové jsou suspendovány v Tyrodově roztoku s morčecím serem. Bylo-li jako explantátu použito pro tuto metodiku obvyklé částečky tunica vagi-

nalis morčete, byly výsledky rovněž negativní. V dalších pokusech bylo při stejném experimentálním zařízení užito kůže morčecích foetů, tkáně omenta, sliznice dutiny ústní a zažívacího traktu rovněž těchto embryí a konečně i fragmentů z placenta. V několika pokusech byl virus ve tkáni placentární po 6 dnech alespoň uchován na živu, přičemž ovšem zřetelného pomnožení docíleno nebylo. Opravdový úspěch se však dostavil při infekci částeček plicní tkáně morčecích foetů. Zde byl virus nejenom udržen na živu v deseti sukcesivních generacích, nýbrž i velmi zřetelně pomnožen, a to při konečné pasáži přibližně asi 100kráte. Naše pokusy jsou poněkud v kontradikci s citovalými nálezy Köbeho o vepřové chřipce, ale zato jsou plně v souladu s jedinými analogickými experimenty, o nichž jsme v literatuře našli zmínku, t. j. uvedenými infekcemi nenarozených morčecích foetů intracerebrální cestou, jež výše uvedeny. Ačkoliv v našich experimentech použito zvírat relativně málo citlivých na chřipkový virus, t. j. morčat (což právě ale dle práce Hermanovy a spolupracovníků neplatí pro mladá embrya morčete), byly nám při použití tak různých embryonálních tkání právem zřetelným průkazem o význačném pneumotropismu chřipkového viru.

Je přirozeno, že brzy po objevu fretky, jakožto jediného zvířete, na němž je možno chřipkový virus isolovati přímo z člověka, bylo pátráno již z důvodů ekonomických i po jiných citlivých ssavcích. Ukázalo se sice poměrně záhy, že i myš je možno infikovati výplachem přímo z člověka (Francis a Magill) za experimentálního uspořádání stejného, jako popsáno pro přímou infekci vajíčka, a tyto pokusy mohly být jinými autory za mnohem jednodušších poměrů potvrzeny (Clampit a Gordon, Haagen a Du Dscheng-Hsing), ale přes to jsou tyto možnosti tak výjimečné, že není

možno s nimi počítati pro běžnou laboratorní praksi.

Dalším téměř specificky citlivým zvířetem na chřipku se ukázal býti ježek. I u něj se onemocnění přenáší kontaktem a jest schopen zajiti na pneumonii (Stuart-Harris). Tang zjistil, že chřipkový virus je přenosný na mustela sibirica. Tsurumi s úspěchem infikoval veverku koreánskou i veverku sibiřskou. 6—14 týdnů staré sele (Shope a Francis) prodělává po instilaci lidského chřipkového viru bezhorečnaté a velmi mírné onemocnění, podá-li se mu však současně *Bact. influenzae suis* onemocní téměř tak těžce, jako při instilaci celého komplexu vepřové chřipky. Yen infikoval adaptovaným pasážovým virem čínského křečka a zjistil, že u něj infekce probíhá velmi těžce, ale kontaktem je poměrně nesnadno přenosná. Conforto a Walls pokusili se přenášeti chřipkový virus fretčí na krysy, které byly 14 dní před tím drženy při bezvitaminové potravě. Po 15 pasážích mezi avitaminosními krysami byl virus na toto zvíře tak dokonale adaptován, že ho zabíjel mezi 3—5 dny (jednalo se ovšem o zvířata mladá). Při očkování králíků do mozku chřipkovým virem dobře adaptovaným našel Cerruti, že mozek těchto zvířat byl po dobu několika dní infekční pro myš. Ježto dodatečně mohl prokázati u infikovaných zvířat tvorbu protilátek, lze míti za to, že u nich probíhá bezsymptomové onemocnění. Totéž předpokládá Stuart-Harris pro krysy a morčata, u nichž inokulací intranasální cestou prý vyvolal latentní infekci, jež mohla býti u krys přenášena v 18, u morčat dokonce ve 30 pasážích. I toto bezsymptomové onemocnění vedlo k produkci protilátek. O úspěšném přenosu chřipkového viru na morče referují také Dujarric de la Riviere a Chevé, u nás Kuklová. Z morčete byl virus na fretku stejně dobře přenosný jako virus myší. Souhrnem

uvádí Yen, že pneumotropní lidský chřipkový virus je za zřetelných orgánových symptomů, se spolu-zachvácením hořeních cest dýchacích, přenosný pouze na člověka, fretku, vepře a ježka. (Nověji k tomu sluší připočíti také asijské veverky a čínského křečka.) Naproti tomu opice, králíci, morčata a krysy prodělávají většinou inaparentní infekci (za zvláštních experimentálních podmínek výjimečně také mírnou chorobu), která však může vésti k tvorbě protilátek.

K vlastním pokusům jsme použili jednak několika ježků, dále malých koťat a konečně jsme se pokusili o přenos viru na morčata.

Na prvého ježka byl přenesen český kmen Z. M., který před tím prodělal tři pasáže fretkami a 12 pasáží bílymi myškami, které v této době již spontánně usmrcoval. Ježek nejevil žádných zvláštních symptomů choroby hořených dýchacích cest, byl tedy po osmi dnech zabít, přičemž na plících nalezena naprosto zřetelná bronchopneumonická ložiska, jež inokulována jednak zpět na myšky, jednak na dalšího ježka. Myšky zašly jako obvykle čtvrtý den, ježek zabit tentokráté pátý den, přičemž nález na plících byl zřetelně větší, než v prvém případě, ačkoliv sotva by byl vedle k spontánnímu úmrtí zvířete. Při třetí pasáži na ježkovi jsme měli dojem, že zvíře je zřetelně klinicky chorobné a po jeho zabití se našly v plících změny již velmi rozsáhlé. Můžeme tedy citlivost ježka pro chřipkový virus plně potvrditi.

Anglickým pasážovým virem W. S. byla infikována také 3 kotata, stará něco přes 3 neděle, a to stejným způsobem jako fretky, t. j. intranasálně. Od okamžiku infekce byla zvířatům dvakrát denně měřena teplota v rektu. Zvířata pozorována celý týden. Jejich celkový stav tělesný zůstal zdánlivě nezměněn, takže nejevila symptomů onemocnění hořeních cest dýchacích, ale jejich rektaální temperatura se zvýšila po 48hodinové inkubaci o $1\frac{1}{2}^{\circ}$ C, načež zase zvolna klesla, takže zaznamenala výkyv úplně analogický onomu, jaký jsme opětovaně před tím prokázali u fretek. Ne-

odhodlali jsme se k tomu zvířata zabít na výši onemocnění a proto nemůžeme říci, jaký by měly účinek další pasáže, jsme však přesvědčeni v důsledku tohoto experimentu, že velmi mladá kočka může být považována za zvíře, na adaptovaný chřipkový virus zřetelně citlivé.

Z důvodů velmi podstatných nás nejvíce zajímalo to, jak se chová chřipkový virus u nejběžnějšího laboratorního zvířete, t. j. morčete, při čemž jsme se snažili zjistit, zda by se nenašla metoda, jež by zvýšila citlivost tohoto zvířete na chřipkový virus tou měrou, aby alespoň částečně mohlo nahraditi tak drahé pokusné zvíře, jako je fretka. Podobně jako Dujarric de la Rivière a jiní jsme si mohli ověřiti, že chřipkový virus zvláště silný (kmen W. S.) instilován menším morčatům intranasálně, mohl být ze zabitých zvířat třetího až čtvrtého dne od inokulace přenesen nezeslabený na myšky. Pokusy savitaminosou morčat trvají příliš dlouho a jsou v podstatě značně nákladné, považovali jsme tedy za nepraktické je použíti. Při svých dřívějších pokusech s toxinem bac. botulina jsme opětovně pozorovali, že morčata, která při 4—6denním trvání choroby umírají udušením za celkových příznaků těžké kacheksie a postupujících pares a paralys, chovají v plicích atelektatická nebo snad i bronchopneumonická ložiska, která jsou asi vyvolána pomalou asfyxií. Tu nás napadlo, že nedostatečná plicní ventilace, spojená pravděpodobně s těžkými poruchami bronchiálního epithelu (který je patrně zásobován kyslíkem hlavně ze zevnějška), by mohla být výhodným disponujícím momentem pro urychlení influenzového viru, který jinak u tohoto zvířete nevyvolává zřetelných příznaků onemocnění.

Zkusili jsme to nejprve na myškách, připravených předem takovou dávkou botulinotoxinu, která je usmrcovala během čtyř až pěti dnů. Intoxi-

kovaným myším jsme nakapali intranasálně po narkose tak slabou dávku českého viru, která u myší kontrolních vyvolávala sotva znatelná bronchopneumonická ložiska (při zabití kolem sedmého až desátého dne). Na rozdíl od těchto kontrolních myší ukázalo se u myšek otrávených botulinotoxinem, že rozsah bronchopneumonických lesí byl mnohem větší, překrvení mnohem intensivnější a často docházelo ke kompletnímu zachvácení obou plieních laloků, tak, jako když bylo použito plné smrtící dávky W. S. viru. Od té doby jsme s úspěchem používali botulinické intoxikace smrtící myšku během 4—5 dnů vždy tehdy, kdy naše kmeny chřipkového viru z neznámých příčin začaly slabnout, takže byla obava, že zajdou úplně. Tato metoda se nám ovědčovala po dobu téměř $1\frac{1}{2}$ roku, bohužel, však nakonec nedovedla naše kmeny zachránit před konečnou záhubou z neznámých příčin.

Botulinická intoxikace, která se u myšek osvědčila tak výborným disponujícím momentem pro chřipkovou infekci, byla vyzkoušena také na morčeti. I těmto injikováno to množství botulinotoxenu, které usmrcovalo zvířata do tří nebo čtyř dnů. Český kmen viru Z. M. po čtyřech prodělaných pasážích na fretkách byl instilován intranasálně intoxikovanému morčeti, jež zašlo čtvrtý den se zřetelnými bronchopneumonickými ložisky. Z plienich ložisek vypěstován pouze ve zcela jedinělých koloniích enterokokkus, takže centrifugát z těchto ložisek mohl být přenesen na další morče rovněž intoxikované. Po sedmi takovýchto pasážích na morčatech přenesen virus z morčete na myš, kde byl udržován v 15 pasážích. Patnáctá myší pasáž, přenesena zpět na fretku, vyvolala u ní přibližně stejné symptomy (snad jen o něco nižší teplotu) jako týž virus, který z fretky byl

udržován pouze na myškách, nebyl tedy pasážemi morčaty zřetelně zeslaben.

Za největší náš úspěch je však možno počítati přímou isolaci viru z člověka na morčata oträvená botulinotoxinem. Počátkem února 1939 (při příležitosti již popsané chřipkové epidemie) byl silně centrifugovaný výplach z nosohltanu nemocného instilován jednak fretce intranasálně podle běžné techniky, jednak třem morčatům intoxikovaným botulinotoxinem. Fretka typicky onemocněla, virus z ní přenesen na fretky další a po 4 pasážích mohl býti adaptován na myš. Inokulovaná morčata zašla pátý den a všechna měla těžká bronchopneumonická ložiska v plicích. Pouze však u jednoho morčete obsahovala bronchopneumonická ložiska tak málo bakterií (a ještě k tomu relativně nepathogenních), že jsme mohli centrifugát z těchto plic přenést přímo na myšku. Myšky z prvej pasáže byly zabity čtvrtý den a již v prvej pasáži z morčete byla v nich nalezena malá, ale zřetelná bronchopneumonická ložiska. Virus z nich byl přenesen na další myšku a udržován paralelně s virem, který byl zachycen na fretce, až v desáté pasáži obě adaptační varianty téhož virového kmene začaly některé myšky spontánně usmrcovat pátý až šestý den. Po 12 pasážích na myškách přenesen kmen fretčí i kmen morčecí zpátky na fretku, přičemž bylo shledáno, že obě varianty jsou pro toto zvíře stejně pathogenní. Po dalších asi deseti pasážích zkoušeny jejich antigenní vlastnosti a shledáno, že byly stejné u obou. Jelikož epidemie v r. 1939 poměrně brzy odezněla, neměli jsme již příležitosti tento pokus opakovat. Jsme však přesvědčeni, že je zásadně možno tímto poměrně snadným způsobem učiniti morče tak citlivým na chřipkový virus, že ho lze použíti k isolaci více kmenů chřipkového viru tam, kde je fretek nedostatek, ovšem s podmínkou, že bylo alespoň jed-

ním předběžným pokusem na fretkách s určitostí zjištěno, že běží v tom konkrétním případě skutečně o pravou chřipkovou epidemii.

Jak je z pokusů patrno, lze virus z morče do konce snáze a rychleji přenést na myšku než z fretky, pravděpodobně díky relativní zoologické příbuznosti obou zvířat.

Nauka o antigenních vlastnostech chřipkového viru, o výsledcích aktivní imunisace zvířat i lidí, otázka jeho serologické diagnostiky deviací komplementu a dosud provedené pokusy o imunisaci pasivní tvoří jednu z nejrozsáhlejších a nejpracovanějších, ale současně také nejnesnadnějších a nejnepřehlednějších kapitol veškeré světové imunologie za posledních asi 5 let. Probíráme-li tuto úctyhodnou část moderní mikrobiologie, tu, ačkoliv je nám jasno, že má velmi daleko ke konečnému rozřešení, stěží chápeme, jak mohla být relativně krátkodobá imunita lidská proti novému onemocnění důvodem, pro který se odpíral uznati za etiologický faktor chřipkového onemocnění virus (jenž prý podle některých autorů by byl povinen vyvolávat imunitu dokonalou) a stále znova podezříváno jako agens bakterium, u něhož je běžné, že vyvolává imunitu jenom částečnou a krátkodobou. Nechceme zacházeti příliš daleko a proto jen stručně upozorňujeme, že ani mezi viry nedokonalá imunita po prodělaném onemocnění není neznáma (na př. herpes jest případem nejmírnějším, dále spalničky, jež se po druhé vyskytuje častěji, než se dříve za to mělo, polio-myelitis, při níž se recidivy popisují asi ve 2 promilech). Rovněž není málo virusových chorob, proti nimž lze velmi těžko aktivně imunisovati (slintavka a kulhavka). Náš přehled se vynasnaží vyvrátiti tyto zastaralé domněnky tím, že prokáže, jak alespoň u experimentálních zvířat lze vyvolati proti chřipce imunitu velmi solidní,

i když nikoliv příliš dlouhodobou. Poměry u člověka jsou samozřejmě daleko jiné nežli ve zvířecích experimentech. Zůstává však i zde naprosto nesporně zjištěným faktem, že každé lidské chřipkové onemocnění vyvolává specifickou a naprosto zřetelnou humorální odezvu namířenou proti homolognímu chřipkovému viru. Co jest příčinou chřipkových recidiv u člověka, který by přece po opětovaně prodělaném chřipkovém onemocnění měl býti již solidně imunní, či dokonce recidiv u téhož individua během jedné epidemie, zůstává dodnes nerozrešenou záhadou. Jest velmi pravděpodobné, že faktorů, jež tuto zvláštnost působí, je více, snad alespoň dva z nich jsou téměř jisté: především krátkodobost imunity, analogická oné, jež byla pozorována u zvířat a jež je patrně jednou ze základních charakteristik chřipkového viru vůbec, za druhé možná antigenní rozdílnost kmenů, přicházejících při téže epidemii. Náš speciální názor na tak zvané recidivy během téže epidemie jest zcela odlišný od všech dosud citovaných a bude uveden na konci této práce.

Pokud je možno sledovati, byl první krok, jako v celé otázce chřipkového viru i zde učiněn vетerinářem Shopem, který našel v seru rekonvalescenčních vepřů protilátky neutralisující vepřový chřipkový virus. Později se spolupracovníky zjistil, že tyto protilátky se objevují asi šestý až desátý den po infekci, takže jejich objevení souvisí dosti úzce s klinickým uzdravením zvířete a dostoupí vrcholu čtrnáctý až dvacátý osmý den po infekci. Andrewes, Smith a Wilson, později také Dunkin objevili neutralisační protilátky u člověka a jejich nálezy byly téměř současně potvrzeny a rozšířeny pokusy na americkém kontinentě, zejména Francisem a Magillem. Ti tři autoři záhy přišli na to, že imunní protilátky v seru lidském jsou vlastně dvojího charakteru,

při čemž vzestup obojích jde do značné míry paralelně. Jedna kategorie těchto protilátek (nesporně důležitější) jest schopna in vitro neutralisovati chřipkový virus, zejména kmen homologní. Od nich odlišné protilátky dávají pozitivní reakci deviací komplementu při použití zvláštního antigenu, vyrobeného z plic myšek infikovaných chřipkou, nebo z tkáňových kultur chřipkového viru. Do jaké míry kvantum neutralisačních protilátek podmiňuje imunitu u člověka, není přesně zjištěno. Spíše se zdá, že jejich vzestup jde s imunitou pouze paralelně při čemž vlastní podstata imunity je hlavně tkáňová. Pro slabé stupně imunity u člověka i experimentálních zvířat předpokládá ovšem Hallauer, že jsou nejpravděpodobněji jenom humorálního původu. Zvýšení kvanta neutralisačních protilátek u člověka je patrno po každé epidemii a kolísá ve velmi širokých mezích, t. j. mezi zvětšením několikanásobným a několikasetnásobným. Nověji je minimální titr, který je možno považovati za spolehlivé svědectví právě probíhajícího imunologického procesu, stanoven na zvýšení nejméně pětinásobné proti onomu, které je možno považovati za normál a jenž je obsažen v serech více než 90% dospělých lidí jakožto svědectví residuální imunity persistující po všech v minulosti prodělaných chřipkových infektech.

V jedné z prvních prací anglických autorů obírajících se touto otázkou, byly dokázány u více než nadpoloviční většiny dospělých protilátky proti W. S. virus, který byl nalezen 2 roky před tím. Malé děti pod 10 let tyto protilátky neměly. V téže řadě pokusů mohly býti prokázány dokonce i protilátky proti vepřovému virus, které rovněž nemohly býti v žádném případě nalezeny u dětí. V pozdější práci Brown prokázal u lidí, kteří údajně prodělali silné chřipkové onemoc-

nění v r. 1918, protilátky ve více než 90%. Naproti tomu mladí lidé a děti, narození po r. 1918, ze dvou třetin neměli vůbec žádných protilátek, z jedné třetiny měli protilátky slabé a těžko prokazatelné. Smorodintseff při leningradské epidemii chřipky v r. 1936 s úspěchem isoloval virus chřipkový a pátral po protilátkách proti němu. V průběhu choroby byly protilátky přítomny pouze v malé míře, takže neutralisovaly virus pouze asi ve zředění 1 : 10. V rekonvalescenci stouplo jejich titr nečekanou měrou, zejména u lidí prodělavších bronchopneumonii, takže bylo dosaženo neutralisačního titru až 1 : 1000*). S počtem kmenů chřipkového viru isolovaných při nejrůznějších epidemiích vzrůstalo také poznání jejich antigenní rozdílnosti, neboť se zhusta ukazovalo, že protilátky, nalezené u rekonvalescentů z jedné epidemie, které velmi dobře neutralisovaly virus z téže epidemie pocházející, jsou méně účinné nebo téměř neúčinné na kmeny viru pocházejících z epidemií dřívějších. Důležitá zkušenost byla ověřována téměř jako pravidlo při každé epidemii: různé kmeny viru isolované na začátku a ke konci téže epidemie byly neutralisovány týmiž protilátkami, čili byly antigenně shodné. Mnohem vzácněji byly nalezeny během téže epidemie kmeny antigenně rozdílné a tudíž budící protilátky jiného charakteru.

Při tomto studiu konaném téměř na celém světě o vlastnostech rekonvalescentního sera, nebyla dosud rozrešena jedna záhada; jak vysvětliti poměrně dosti častý nález protilátek proti vepřovému viru chřipky, antigenně zřetelně rozdílnému od všech doposud známých lidských kmenů, když tento virus dosud u člověka nikdy nemohl

*) Většinou jsou však maximální rekonvalescentní titry uváděny pouze asi hodnotou 200- až 250násobnou.

býti prokázán. (Jakousi výjimku snad činí jeden kmen nalezený Magillem a Francisem, který byl vepřovému viru nápadně blízký.) Ze začátku se soudilo -- hlavním důvodem pro to byla ta okolnost, že protilátky proti vepřovému viru byly nacházeny hlavně u lidí starších, kteří prodělali epidemii v r. 1918 — že vepřový virus je asi svým původem identický s lidským virem z pandemie v r. 1918, kdy byla patrně po prvé chřipka přenesena z člověka na vepře a že tedy u lidí jako stopa po této pandemii zůstávají protilátky, které samozřejmě účinkují také na virus vepřový, jenž si zachoval stejnou antigenní schopnost, jakou měl tehdy virus lidský. Později však bylo čím dále tím více jisté, že tak dlouhodobá a určitá persistence charakteristických protilátek proti něčemu, co již dávno mezi lidmi neexistuje, je velmi nepravděpodobná. Burnet a Lush na základě rozdílu chřipkových protilátek mezi dospělými a dětmi v Australii nabyli dojmu, že sukcesivní imunisace dospělého člověka celou řadou antigenně různých chřipkových virů vedla k takovému rozšíření hladiny protilátek, že pozbyly ze značné části své specificity. Tak se stalo, že jsou schopny vázat i chřipkový virus vepřový, který právem může býti považován za jeden z virů nejkomplexnějších. O něco později ověřil exaktnost této domněnky Andrewes studiem protilátek u lidí na ostrově Sv. Heleny, který byl jediným známým místem na světě, jehož obyvatelé neprodělali pandemickou chřipku v r. 1918. Skutečně také jejich sera neobsahovala během prvních let po objevu chřipkového viru žádných protilátek. Byly nalezeny u obyvatel velmi slabé protilátky proti některým kmenům chřipky lidské, ale žádné proti chřipce vepřové. Až náhle po epidemii v r. 1936 byly i tam nalezeny protilátky nejenom proti lidskému, nýbrž i proti vepřovému onemoc-

nění. Tedy i zde mnohonásobná imunisace několika málo kmeny, nebo snad jen jedním kmenem jest schopna rozšířiti u téhož lidského individua hladinu protilátek do té míry, že pak tyto zachycují nejenom nejrůznější kmeny lidské, nýbrž i vepřové. Zřetelně odlišný je názor Shopeho, který i u dětí 6 let starých nalezl náhodně protilátky proti vepřové chřipce a v důsledku toho si myslí, že ještě dnes musí vepřový kmen chřipky vyvolávati onemocnění lidská.

Jak již naznačeno, stoupá imunita u člověka přibližně paralelně se vzrůstem protilátek, i když je na nich jenom částečně závislá. Jejich vyšší titr v rekonvalescenci netrvá však dlouho, pouze několik měsíců (přibližně asi kolem tří až pěti, málokdy více), a stejně krátkodobá je také imunita lidská proti homolognímu kmeni viru. Pravidelně je imunita tím delší a hlubší, čím silnější kmen vyvolal onemocnění a tedy i produkci protilátek. O hloubce této imunity u člověka se ovšem nelze experimentem přesvědčiti, a klinické zkušenosti jak shora uvedeno, jsou velmi neurčité. Rozhodně se však zdá, že má daleko do toho, aby byla absolutní. Jsme tedy nuceni při exaktním studiu této otázky činiti do jisté míry paralelu z poměrů, jak je známo u nejeitlivějšího zvířete, t. j. u fretky. Ovšem imunita fretky po přestálé chorobě je velmi solidní (opět proti homolognímu kmennu viru); je tím solidnější, čím těžší bylo onemocnění experimentálně vyvolané a závisí do značné míry na síle chřipkového kmene. Absolutní imunita trvá asi 3 měsíce (u myší asi měsíc), načež na dobu dalších 3 měsíců přechází v imunitu částečnou, kdy je sice možno zvíře znova infikovati a vyvolati zřetelné klinické příznaky, ale pouze tehdy, je-li použito velmi silných infekčních dávek za běžných, t. j. velmi těžkých experimentálních podmínek. Proti lehké infekci získané

kontaktem, zůstává však zvíře zcela imuuni. Bylo-li k těžké infekci intranasální cestou u takového zvířete použito silně pneumotropního kinene viru, obvykle zvířata usmrcujícího, nedojde u něho k těžkým plicním změnám, a zvíře zůstane naživu. Po uplynutí celých 6 měsíců je fretka již zdánlivě stejně citlivá na novou infekci jako zvíře nové, ale jak bylo experimentem bezpečně zjištěno, zachovává si ještě velmi dlouhou dobu jakousi basální imunitu, která je patrná po tom, že pouze jediná injekce vakciny z homologního kmene stačí zlepšiti tento jinak nepozorovatelný stav imunity na parciální imunitu toho stupně, ve kterém není schopna podlehnouti plicním komplikacím.

Přesto, že zřetelnější stupeň imunity u člověka, posuzovatelný zhruba podle titru protilátek, je téměř stejně krátkodobý jako u fretky, lze předpokládati, že i u něho zůstává na konec, podobně jako u fretky, basální imunita (již možno při rozšíření a opětování chřipkových epidemii předpokládati téměř u každého člověka), což, jak ještě ukážeme, může mít velký význam při profylaktické aktivní imunisaci.

Je velmi zajímavé, že fretka neprodělavši nikdy chřipkového onemocnění, nemůže ani opětovánými injekcemi vakciny nabýti toho stupně imunity, jaký je typický pro rekonvalescenci těchto zvířat, i když titr protilátek u ní vystoupí poměrně vysoko.

Kvantum neutralisačních protilátek u člověka i zvířat se stanoví methodikou, jež není zcela jednotná. Experimentálním zvířetem jest téměř vždy bílá myš. Jest naprosto vyloučeno, abychom se v rámci této práce zabývali jejími podrobnostmi tak, jak je jednotliví autoři uvádějí, zdůrazňujeme tedy jenom hlavní principy, podle nichž se provádí. Každý, kdo by chtěl opakovati tyto po-

kusy, najde přesný návod ve speciálních publikacích uvedených pod čarou.

Jako antigenu se užívá nejčastěji účinného filtrátu pneumonických myších plic, který obsahuje 100—1000 myších smrtelních dávek. Méně často se používá ještě účinnějšího centrifugátu. Oba jsou zhotovovány pravidelně z 5—10% suspenze myších plic. Američtí a australští autoři s oblibou je nahrazují virem z tkáňových kultur obvykle sušených a tedy ve svém účinku stabilisovaným. Rovněž doba, které je použito pro kontakt sera a viru, aby bylo dosaženo neutralisace, není vždy udávána stejně. Většina autorů nejčastěji používá jednohodinového kontaktu při pokojové temperatuře. Dujarric de la Riviere používá rovněž této techniky, kdežto Magill a Francis pouze 30 minut při teplotě thermostatu. Jindy se kontakt provádí po dobu několika minut v thermostatu a přes noc v ledničce (této techniky jsme v části pokusů užili i my). Za konečný titr je považováno obvykle ono zředění sera, které ještě zabránilo smrti myšek při použití mnohonásobné smrtelné dávky viru (na změny u přeživších zde není vůbec brán žádný zřetel). V jiné řadě prací se u zašlých myšek pečlivě zaznamená rozsah plenich změn, po 7—10 dnech se zabíjejí i myšky přeživší, u nich se rovněž pátrá po změnách a podle jejich rozsahu se odhaduje účinek

Vztah k uvedenému thematu mají hlavně následující práce: Andrewes, Laidlaw, Smith: J. of Exp. Path. 1935, Vol. XVI. p. 566, titíž autoři: Journ. of Exp. Path. 1935, Vol. XVI., pp. 275, 291. Andrewes a Smith: Journ. of Exp. Path. 1937, Vol. XVIII. p. 43. W. Smith: Journ. of Exp. Path. 1935, Vol. XVI, p. 508. W. Smith a Andrewes: Journ. of Exp. Path. 1938, Vol. XIX, p. 293. Dujarric de la Riviere Ann. Past. 1939, 59, č. 5. Magill a Francis: J. Exp. Path. XIX, 273, 1938. Titíž autoři v tomtéž časopise, 274. Fairbrother a Martin: Lancet 1938 I, 718. Horsfall a Frank: J. of Exp. M. 70, p. 209, 1939.

sera. Konečně nejnověji se vžila metoda, pozorovati myšky 10 dní, poté přeživší zabíti a za konečný titr považovati tu dávku sera, která úplně zabraňuje jakýmkoliv plicním změnám. Velmi důležitým doplňkem přímé neutralisace viru (a to zejména při podrobném kvantitativním určování jeho jednotlivých antigenních komponent) je zkouška dodatečné neutralisace po vysycení některých protilátek virem pouze centrifugovaným, nikoliv filtrovaným. Je pochopitelné, že při možnosti použití tolika nejednotných pokusných faktorů lze jenom nesmírně těžko porovnávat výsledky získané v jednotlivých laboratořích a jejich kolísání, které se děje v širokých mezích, je nutno značně korigovati.

Frank a Horsfall stanovili všeobecně zásadu kvantitativního poměru viru a sera potřebného k neutralisaci zjištěním, že mezi logaritmem kvanta viru a mezi logaritmem kvanta sera, potřebného k jeho neutralisaci existuje přímá závislost.

Od předchozích zcela odlišnou metodu navrhl Burnet: obsah protilátek titruje podle úbytku charakteristických změn na allantochoriové membráně vyvíjejícího se kuřecího zárodku infikovaného vždy stejným kvantem viru o známém účinku, neutralisovaným postupným zředěním sera.

Jak je viděti z předchozího, nelze studium protilátek proti chřipkovému onemočnění odděliti od studia otázky aktivní a pasivní imunisace. Zde je důležité věděti, že tvorbu protilátek lze vyvolati také aktivní imunisací některých zvířat refrakterních (jako je na př. kůň), nebo takových, u nichž infekce probíhá jenom latentně (králík). Studium tvorby protilátek i u těchto zvířat lze využíti stejně jako u druhů citlivých buď k antigenním rozborům různých kmenů, příp. k pokusům o imunisaci pasivní.

Jedním z teoreticky i prakticky nejzávažnějších důsledků možnosti aktivní imunisace i rozboru protilátek je poznání různé antigenní skladby jednotlivých chřipkových virových kmenů.

Fretka není vhodným zvířetem pro aktivní imunisaci prováděnou ve velkých měřítích, jednak z pochopitelných důvodů finančních a z velké části také proto, že, jak již uvedeno, nelze u ní pouhou vakcinací docílit zřetelné imunitu. U imunisovaných králíků lze použiti pouze sera, a to podobně jako sera lidských a fretčích rekonvalšentů, nebo sera imunisovaných koní, ke zkoušení kmenů zkříženou neutralisací a pak samozřejmě i k pokusům o serotherapy.

Je-li tedy možno u fretek vyvolati dokonalou imunitu pouze infekcí a po ní následující klinickou chorobou (v poslední době se zjistilo, že lze imunisovati také několikrát opakovánou intranasální aplikací nepatrných subinfekčních dávek živého chřipkového viru, ale tato imunita je kratšího trvání, nežli ona vzniklá infekčním procesem), je možno myš imunisovati velmi dobře parenterální aplikací živé nebo mrtvé vakciny nejrůznějším způsobem. Podkožní aplikace vakciny je účinná poměrně slabě a jenom proti homologním kmenům. Cesta intraperitoneální je jednou z nejlepších a jak shora řečeno, není nutno se při ní obávati onemocnění zvířat, ani použije-li se živého viru. Otázka, zda stačí jedna injekce, nebo je-li potřebí injekci opakovati, byla rovněž definitivně rozhodnuta kvantitativními pracemi Eatona, Monroe a Pearsona, kteří vypočetli poměrně přesně, jak mnohonásobně se zvětší imunita při použití tří injekcí místo jedné. Málo užívaným způsobem je intranasální instilace mrtvých kultur viru.

Není úplné shody v tom, zda je lepší používat vakciny živé, nebo vakciny mrtvých (Smith a

Andrewes užívají k inaktivaci přidání formaldehydu v koncentraci 1 : 5000 až 1 : 10.000), při čemž je takto připravovaná vakcina držena 2 až 5 dnů v ledničce, t. j. do úplné inaktivace viru. Je-li tato vakcina chována v ledničce, vydrží býti účinnou přibližně 2 měsíce. Francis a Magill dodatečně ještě zlepšili svoji vakcinu (po různých méně úspěšných pokusech o adsorpci viru) tím, že ji zbavili největší části nežádoucích zvířecích bílkovin promýváním na gradokolovém filtru tak hustém, že zadržuje virus, ale propouští proteiny. Burnet navrhl používání jako vakciny vysoce adaptovaných vaječných kultur. Jelikož u většiny kmenů takto dlouho na vajíčku pěstovaných klesá pathogenita pro fretku na minimum a i pro myš se zřetelně snižuje, nepřichází další inaktivace pro ni v úvahu. Francis a Magill použili dvojí aplikace cestou peritoneální, a to po každé $\frac{1}{2}$ ccm vakciny z tkáňových kultur. Zajímavé jsou pokusy Fairbrotherovy, jenž vyrábí značně purifikovanou vakcinvu z tak zv. elementárních tělisek, která podle autora by mohla snad býti identická s virem chřipky. Výtažek z plic se centrifuguje asi při 5000 obrátkách po dobu $\frac{1}{2}$ hodiny, čímž se odstraní veškerý tkáňový detritus. Dekantovaná tekutina se centrifuguje ještě dále hodinu při 13.000—15.000 obrátkách, svršek se sleje a velejemný sediment se převrství Tyrodovým roztokem, roztřepe a centrifuguje znovu. Toto proplachování se několikrát opakuje, až na konec sediment sestává téměř jen z drobných partikulí, viditelných pouze ultramikroskopem. Tato suspense se může prý bez ztráty antigenní hodnoty inaktivovat krátkou dobu při 57° a přidává se k ní $\frac{1}{2}\%$ fenolu. Fairbrotherova vakcina má býti prý tak bezpečná, že se podle autora hodí velmi dobře i k imunisaci lidské. Z novějších pokusů je nejzajímavější ob-

jev Stocka a Francise, kteří inaktivují virus mýdlem. Účinnou inaktivaci látkou v těchto případech jsou asi mastné kyseliny. Antigenní alterace tímto způsobem připravené vakciny je skutečně nepatrnná. Salk, Lavin a Francis zkusili pro přípravu vakciny inaktivaci ultrafialovými paprsky. Je zajímavé, že virus z kultur potřebuje k svému usmrcení i čtyřikrát delší doby, nežli virus z plic. Tíž autoři zjistili, že kvalitativně je imunita, vyvolaná virem živým i ozářeným, stejná. Kvantitativně je u viru ozářeného potřebí dávek přibližně, stokráte větších k dosažení stejného stupně imunity. Nejpřesnější porovnání poměrné účinnosti viru živého a inaktivovaného podal Eaton. Jeho práce také asi bude mít konečné slovo při zásadním rozhodování mezi oběma druhy vakcin. Pro určitý virus rovná se nejmenší imunisační dávka živého viru parenterálně vpravená asi 250 smrtelným dávkám téhož viru (při intranasální infekci). Bylo-li použito k imunisaci mrtvého viru, rovná se imunisační dávka asi 8000 smrtelných dávek intranasálních. Je tedy dávka pro mrtvou vakciniu přibližně 35kráte větší. Vůbec, jak ukázal Francis již ve starší práci, i pro živou vakciniu existuje určitý vzájemný vztah mezi kvantem vakciny a stupněm imunity proti intranasální infekci homologním kmenem viru. Přibližně se to dá vyjádřiti tak, že myška očkováná intraperitoneálně virem určité síly odolává infekci virem přibližně téže síly, ale nikoliv vyšší. Ale i zde existují určité minimální hranice, neboť při použití méně než 10 smrtelných dávek viru k vakcinaci nelze dosáhnouti vůbec zřetelné imunity proti infekci toutéž dávkou viru intranasálně. Eaton, Monroe a Pearson v již uvedené práci zjistili, že má-li býti dosaženo alespoň slabého stupně imunity proti heterolognímu kmennu, musí býti dávka vak-

ciny nejméně desateronásobně větší nežli ta, která by stačila k vyvolání imunity proti kmenu homolognímu.

Třetí možnost poznání imunního stavu při chřipce je reakce deviací komplementu. O protilátkách, které lze dokázati deviací komplementu, není ovšem jisté, do jaké míry se na neutralisačním pochodu zúčastňují. Za antigen při deviaci komplementu bylo zprvu používáno gradokolového filtrátu tekutiny z rozdrcených pneumonických plic myší, nebo tekutiny, zbylé pro prudkém odcentrifugování tkáňové kultury. Fairbrother a Boyle navrhli používání obyčejného extraktu kultury chřipkového viru ve vyvíjejícím se vajíčku. Extrakt získaný fysiologickým roztokem je velmi citlivý a nemá antikomplementárních vlastností. Podstatu deviačního antigenu nejlépe osvětlili Lennett a Horsfall, kteří jej získávají z plic infikované myši takovým způsobem (je zajímavé, že virus z plic fretky ho obsahuje nepoměrně menší kvantum), že tekutinu, zbyvší po odcentrifugování již popsaných elementárních tělisek, podrobují ještě jednou ultracentrifugaci při 27.000 obrátkách, čímž se antigenně účinná substance koncentruje na dně zkumavky. Dalším rozborem této látky bylo zjištěno, že jde asi o poměrně nestálou bílkovinu z relativně velkých koloidálních mycel (kolem 30 nm), která je ničena temperaturou kolem 63° a svůj účinek si zachovává v širokých mezích pH, a to od 4,6 až 11. Zdá se, že tato antigenní látka je produkována samotným virem, neboť se stále, byť i v malých kvantech, nachází na povrchu virových partikulí a je-li z nich důkladně opláchnuta, tu zejména tehdy, je-li virus živý, dá se na něm ihned opět prokázati. Deviace komplementu u chřipky ukazuje zejména pro člověka stupeň imunity přibližně stejně, jako průkaz neutralisačních proti-

látek. Dá se jí proto s výhodou použíti tam, kde jde o masové vyšetření velké řady ser, které má býti provedeno v nejkratším čase. Reakce, které však dává, jsou pouze skupinově specifické a nelze tedy deviace komplementu u chřipky použíti tam, kde jde o stanovení velmi jemných antigenních rozdílů mezi jednotlivými chřipkovými kmeny.

Pečlivý rozbor velké řady chřipkových kmenů doposud na celém světě isolovaných, ukázal za pomoci zkřížené imunisace myší, dále reakce o zkřížené neutralisaci imuních ser lidských, fretčích i králičích prováděné buď přímo, nebo methodou částečného vysycení protilátek, že otázka antigenních vlastností chřipkových virů není ani zdaleka tak jednoduchá, jak se zdálo při isolaci prvních kmenů. Přes to, že serologické diference mezi jednotlivými kmeny byly již dříve pozorovány, je možno považovati za základní práci v tomto směru pokusy Smithovy a Andrewesovy, ve kterých na základě antigenního rozboru 28 kmenů chřipkového viru dospěli k názoru, že tyto kmeny se skládají z řady antigenních složek, z nich 4 se zdají mít větší důležitost, nežli ostatní. Kmeny, s nimiž bylo experimentováno, mohli autoři dle poměrného zastoupení každého z těchto 4 antigenů rozděliti do tří kategorií. Prvá zahrnuje kmeny vysoce specifické, které mají vysokou antigenní hodnotu, ale vytvářejí protilátky převážně homologního charakteru, takže jich lze jenom stěží použíti k výrobě vakciny, jež by měla mít co možno nejširší účinek. Kategorie kmenů nízce specifických, je antigeně méně hodnotná, takže vytváří protilátky poměrně slabé, ale zato zachycující také typy heterologní. Mezi oběma se nachází kategorie kmenů intermediárních. Francis a Magill po podobném rozboru resumují, že přesné určení serologických typů u různých kmenů chřipkového viru, tak, jako

se děje na př. u pneumokoků, u chřipkového viru prozatím není možné. Spíše prý se jednotlivé chřipkové kmeny dají srovnati s bakteriemi, složenými z celé mosaiky somatických antigenů. Taková mosaika může obsahovati antigenní složky společné různým kmenům, dle jejichž množství a rozličného uspořádání se pak řídí celé antigenní vlastnosti jednotlivých kmenů, projevující se jako jejich vzájemná příbuznost nebo odlišnost. Dnes je známo již mnoho desítek serologických typů a variant chřipkových kmenů, aniž by v celé této komplikované otázce začínalo býti jenom přibližně jasno.

Přirozeně, že bylo naší snahou, abychom se některými z method shora popsaných přesvědčili o tom, zda kmeny chřipky námi isolované v r. 1939, jejichž typem byl shora uvedený Z. M., jsou antigenně příbuzné či dokonce shodné s prototypem chřipkových kmenů, originálním W. S. Podobné pokusy ve střední Evropě, pokud je nám známo, byly vykonány jednak Herzbergem, jednak Taylorem v Budapešti. Prvý shledal, že kmeny lidské chřipky isolované při lehké epidemii v Říši jsou značně shodné se kmeny, které obdržel z Anglie. Taylor porovnával chřipky, jež isoloval v r. 1937 s kmenem W. S., od něhož byly antigenně velmi rozdílné a s americkým kmenem PR VIII., kde nebyly rozdíly tak značné, ale přece jen značelné.

Ve svých pokusech jsme použili pouze neutralisačního testu, a to jednak serem fretky, která prodělala infekci kmenem Z. M., odebraným asi 20 dní po počátku choroby, dále serem fretky, která byla imunisována 2 injekcemi živé vakcíny z kmene W. S., aplikované intraperitoneálně, dále serem králíků, z nichž někteří byli imunisováni kmenem W. S. a jiní opět kmenem Z. M. a konečně serem lidí, kteří prodělali velmi zřetelné onemoc-

nění chřipkou při epidemii r. 1939. Mezi nimi se nacházeli také ti, kteří byli dárci kmene Z. M. Jako antigenu používáno Berkefeldových filtrátů, které obsahovaly několik set smrtelných dávek viru. Doba kontaktu v počátečních pokusech byla 50 minut při teplotě laboratoře, později používáno asi 15minutového kontaktu v thermostatu, po němž následoval několikahodinový pobyt v ledničce. Směs postupných ředění sera, jež byla s virem smíchána āā, nakapána myškám intranasálně v kvantu asi 5 dosti velkých kapek, kontrolou byla směs stejného kvanta viru āā s normálním králičím serem. Mimo to samozřejmě provedeny kontroly pouze virem samotným a kontroly virem inaktivovaným a smíšeným se serem. Výsledky lze shrnout pouze sumárně, s vynecháním všech pokusných podrobností. Mnohé titrační pokusy musely být tolíkráte opakovány, až bylo docilováno za stejných podmínek výsledků shodných.

1. výsledky se serem králičím: byly vesměs špatné. Zřejmě se nám nepodařilo, snad také vinou tehdy ještě nedokonalé techniky dosáhnouti u králíka dostatečný vzestup protilátek tak, aby dosažené titry měly nějakou přesvědčivou hodnotu. Serum králíka imunisovaného vakcínou W. S. neutralisovalo homologní kmen nejvíše do zředění 1 : 20. Serum králíka imunisovaného kmenem Z. M. asi 1 : 10, a to ještě nezřetelně. Serum téhož králíka neúčinkovalo na virus W. S. proti kontrolám prakticky nijak. Do jisté míry tedy potvrzuje naše pokusy s králičím serem, i když jsou velmi nedokonalé, jinde dokonale ověřenou skutečnost, že imunita proti homolognímu kmeni je nejvyšší, kdežto proti heterolognímu sotva zřetelná.

2. pokusy se serem fretky: bylo použito 2 zvířat, z nichž jedno

a) prodělalo zřetelnou infekci kmenem Z. M.; dvacátý den od okamžiku vzestupu teploty mu byla odebrána krev, srdeční punkci. Bylo-li smícháno serum této fretky v postupných zředěních se 400 smrtelnými dávkami viru Z. M., bylo lze pozorovati přibližně do zředění 1 : 32 zábranu tvorby pneumonických ložisek.

b) serum téžé fretky smícháno přibližně asi s 800 smr-

telných dávek anglického viru W. S., zabránilo jejich úmrtí jenom ve zředění 1 : 3 a 1 : 6, ale již toto druhé zředění nedovedlo zabránit zřetelným pneumonickým změnám v jejich plících po zabití.

c) druhá fretka byla imunisována dvěma intraperitoneálními injekcemi účinného filtrátu kmene W. S., 14 dní od sebe vzdálenými (à 1 ccm). Krev odebrána 14 dní po druhé injekci. Serum této fretky neutralisovalo anglický kmen W. S. až do zředění 1 : 12, ale již za zřetelných pneumonických změn. Je tedy neutralisační schopnost v tomto případě velmi slabá i proti homolognímu kmennu, což si však lze vysvětliti tím, že použito zvířete zcela nového, které nebylo imunisováno přirozenou infekcí (kmen W. S., jak shora uvedeno totiž všechna pokusná zvířata usmrcoval), nýbrž vakcinou, jež v těchto případech vede pouze k tvorbě protilátek, ale nikoliv ke skutečné imunitě.

d) serum téžé fretky + virus Z. M. zabránilo úmrtí pouze 1 : 6. I zde je snad patrný rozdíl mezi imunitou homologní a heterologní.

3. Lidské serum rekovalescentů ukázalo se v našich pokusech býti asi stejně hodnotné, jako serum imunní fretky, to znamená, že neutralisovalo český virus zřetelně do titru 1 : 16, méně zřetelně 1 : 32. Naproti tomu virus anglický W. S. nebyl neutralisován téměř vůbec, lépe řečeno pouze v titru 1 : 3, výše byla patrna zřetelná bronchopneumonická ložiska a pouze ojedinělé myši vydržely na živu.

Souhrnem možno říci, že naše vlastní nálezy (ač jsme si velmi dobře vědomi značných technických nedostatků svých pokusů) potvrdily hlavně údaje o účinku protilátek na homologní a heterologní kmeny viru a ukázaly zřetelně, že důležitost otázky plurality antigenů chřipkového viru nelze podceňovati. Zajímavou naší osobní zkušeností bylo zjištění, že ke studiu protilátek lze s větším úspěchem použíti sera tvorů citlivých na chřipku (serum lidské, fretčí), nežli sera zvířat refrakterních. To je ostatně celkem shodné s názory Smitha a Andrewese. Velmi zajímavým bylo to, že se dle našich pokusů ukázala zřetelná antigenní rozdílnost mezi kmenem W. S. a kmeny, které byly isolovány u nás při epidemii v r. 1939, což je opět

vážným mementem pro ty, kteří by se chtěli spolehnouti na úspěch vakcín, vyráběných z cizích standardních kmenů při epidemiích ve střední Evropě.

Tím jsme se již dotkli velmi závažné otázky lidské aktivní imunisace proti chřipce. V podstatě bylo zjištěno totéž, co platí i pro fretku, že totiž nepatrný stupeň basální imunity, který je možno předpokládati u každého člověka po předchozích chřipkových infektech, lze vystupňovati parentální aplikací jakékoli chřipkové vakciny, vyrobené z dostatečně účinného chřipkového kmene, ale pouze stejného antigenního složení jako je onen, jenž právě vyvolává epidemii. Jak se zdá, nezáleží na tom, byla-li ona basální imunita způsobena kmeny heterologními. Vždyť stejně ony nepatrné stopy protilátek pozbyly již z největší části dávno svého specifického charakteru (viz výklad nálezu protilátek proti vepřové chřipce) důležité jest pouze to, aby vakcina byla z kmene homologního. Smith vyslovuje dokonce naději, že účinnost jednou nebo dvakrát aplikované vakciny bude taková, že se jí bude moci zabrániti těžkým chřipkovým komplikacím, a to hlavně pneumonickým, jež jsou u chřipky nejčastější příčinou smrti. Osobně jsme toho názoru, že ve většině drobných epidemií probíhá chřipka tak lehce, že celkem nemá smyslu proti ní očkovati, tím spíše, že rozšíření chřipky je tak dalekosáhlé, že by prakticky musel být očkován vůbec každý člověk, což by asi finančně bylo těžko proveditelné. Pokud se přípravy vakciny týče, je methodou volby vybrati si kteroukoliv z oněch, jež byly shora popsány pro imunisaci myší. Mnozí autoři používají s oblibou vakcin živých, jež je nutno pokládati za nejlepší, jak jsme již dříve uvedli. Sami jsme naprostě pevně přesvědčeni, že taková vakcina není nebezpečná, neboť je neschopna z jakéhokoliv místa par-

enterálního vpravení vyvolati chřipkové one-mocnění a reakce postvakcinační nejsou o nic větší, nežli při použití mrtvého viru. Zkusili jsme aplikaci živé vakciny z kmene W. S. v r. 1939, a to ve dvou injekcích 14 dní od sebe oddělených, vybranému dobrovolníku. Vakcinu jsme připravili z myších plic filtrací Berkefeldem, a to tak účinnou, že $\frac{1}{2}$ ccm obsahovalo nejméně asi 200 smrtelných myších dávek. Aplikováno bylo subkutánně. Místní i celková reakce po první injekci nebyla vůbec žádná, při druhé injekci však se stala ta nehoda, že část očkovací látky vnikla patrně do žíly v podkožním vazivu stehna, jak bylo vidět podle velké krůpěje krve, která se objevila po vytážení stříkačky. Asi do 5 minut se dostavily velmi lehké příznaky anafylaktického šoku spočívající ve zblednutí, ztíženém dýchání a lehké prekordiální úzkosti; tyto příznaky však pomínuly úplně do 10 minut. Pokud jsme našli v literatuře zmínky o očkování lidí proti chřipce (Smith a Andrewes, Taylor) tu, ačkoliv bylo použito materiálu čítajícího mnoho set lidí a začasté také několikrát opětovaných injekcí, nikdy podobné symptomy pozorovány nebyly. Soudíme tedy, že celá tato drobná nehoda byla dílem náhody, která se zřejmě příliš často neopakuje, takže celkem není nutno mít z podobných komplikací nějakých zvláštních obav, i když je ovšem nutno na ně mysleti. Je sice docela dobře možno, že se v důsledku očkování vyvine sensibilisace proti myší bílkovině, ale kontakt s ní hraje v lidském životě tak nepatrnu úlohu, že se skutečně není třeba obávati toho, že bychom očkaného infaustně pojmenovali na celý zbytek života.

Poněkud jinak ovšem vypadá efekt vakciny při praktickém hodnocení ve velkém. Smith, který se odvolává na podobné pokusy mezi lidskými dobrovolníky, provedenými Francisem a Magillem, za-

znamenává sice u očkovaných veliké stoupení protilátek (a to celkem stejné u očkovaných jednou injekcí jako dvěma) jinak však nemluví o žádném zřetelném zmenšení morbidity mezi nimi. Taylor, který prováděl své experimenty ve střední Evropě celkem asi na 600 lidech, z nichž polovina byla držena jako kontroly, zjistil, že morbidita mezi očkovanými obnášela asi 5%, kdežto mezi neocinkovanými asi 6%. Tento relativní neúspěch vyšvětuje tím, že kmen použitý k očkování, měl poněkud jiné antigenní vlastnosti, nežli kmen, jenž vyvolával epidemii.

Samotná povaha očkování proti chřipce i tyto málo povzbudivé výsledky dosavadních pokusů u člověka, neslibují ani v budoucnosti žádných pronikavých úspěchů, jež by měly spočívat ve význačném omezení morbidity při běžných, t. j. lehkých chřipkových epidemiích. Přistoupí-li k tomu ještě úvaha o krátkém trvání imunisačního efektu a byť i minimálních, ale přece jen existujících možností vakcinačních nesnází, plynoucích z použití cizorodé bílkoviny, tu se znova vynoří otázka, do jaké míry má smysl toto očkování vůbec. Zdá se nám, že pro běžné epidemie skutečně žádný. Docela jiná by však byla situace, kdybychom byli znova vystaveni nebezpečí těžké pandemie s ohromnou úmrtností, vyvolanou plenými komplikacemi. Pak ovšem je povinností výkoných mikrobiologů a epidemiologů se ihned pokusiti o zákrok aktivní imunisací a to v měřítku, pokud možno nejširším. Nesnáz s cizorodou bílkovinou by se jistě dala odstraniti z veliké části dokonalou purifikací viru, jejíž některé možnosti byly již v této práci naznačeny.

Těžká epidemie je jistě vyvolána velmi silnými a účinnými kmeny viru. Takový kmen viru, jak bylo rovněž prokázáno, je schopen ať už přirozenou cestou, t. j. onemocněním, nebo ve formě vakciny,

vyvolávati vydatnou imunitu. A i kdyby tato imunita nespočívala v ničem jiném, nežli v tom, že by stačila zabrániti smrtelným plením komplikacím, bude dosti učiněno. Jedno je ovšem naprosto nutno, t. j. použiti homologního kmene. Ale tady vychází sama příroda vstříc. Zkušenost nám ukázala, že těžká pandemie v r. 1918 měla svůj mírný a povlovný začátek na jaře téhož roku. Je velmi pravděpodobno, že i ostatní pandemie by počínaly stejně. Při dnešních laboratorních zkušenostech s isolací chřipkového viru z člověka všude na světě, bude míti každé státní území jistě dosti času i možnosti zachytiti kmen, který epidemii vyvolává a připravovati z něho ve velkém měřítku vakcinu. Ú silně účinných kmenů jistě by tato isolace netrvala déle nežli 14 dní, nebo 3 neděle, a během dalších 14 dnů již mohou býti dány prvé dávky vakciny do provozu. Předpokládá to ovšem, aby určité specialisované laboratoře byly na tento okamžik neustále připraveny a měly hlavně po ruce potřebný zvířecí materiál. Ostatně snad i naše metoda s botulinotoxiinem by v takových případech mohla prokázati cenné služby. Během dalšího průběhu takové těžké epidemie kontrolovaly by tytéž laboratoře, zda zůstává antigenní charakter viru stále týž a zachycováním nových a nových kmenů by se zjišťovalo, zda k nim nepřibývají odlišné, kterými by bylo nutno původní vakcini doplnit.

Kdybychom však chtěli býti připraveni i pro samotný začátek pandemie, aby se s vaceinací mohlo začítí okamžitě, pak máme prozatím několik možností k disposici, jak by bylo lze snad i heterologními kmeny viru docíliti takového stupně imunity, který by se alespoň vzdáleně blížil imunitě homologní. První by spočívala v tom, že by bylo ustavičně chováno co možno nejvíce kmenů různých antigenních vlastností, které by smíchány

ve vakcině, zachycovaly většinu alespoň těch antigenních komponent, které jsou dodnes známy. Druhou možnost by nám skýtalo použití velmi adaptovaných kultur na vyvíjejícím se vaječném zárodku, neboť podle Burneta většina těchto kmenů (hlavně pokud jde o kmeny slabší) pozbyvá po-zvolna své antigenní specificity, ale zato rozšiřuje svoje antigenní spektrum. Třetí možnost byla naznačena a dokonce i prakticky na člověku zkoušena Horsfallem a Lennettem. Autoři zjistili náhodně, že orgány fretky současně infikované virem epidemické chřipky a psinky dávají antigen, který použit jako vakcína, chrání proti všem, autorům přístupným kmenům chřipkového viru, ať byly antigenně sebe rozdílnější. Tento nesmírně zajímavý objev nepodařilo se autorům ani v novější, velmi důkladné srovnávací studii vysvětliti. Jelikož nenalezli vůbec žádné antigenní shody mezi virem chřipky a virem psinky, nezbývá prozatím nežli se domnívati, že simultánní infekce fretky oběma viry vede záhadným způsobem k takovým antigenním změnám chřipkového viru, že je pak schopen produkovati vysoce účinné protilátky snad proti většině známých chřipkových kmenů vůbec.

Stejně otevřenou kapitolou jako imunisace aktivní, je i imunisace pasivní, případně sero-therapie lidského onemocnění. Zjistilo se však experimentálně, že therapeutický účinek ať již lidského rekonvalescentního sera, nebo sera imunisovaných koní, o nějž se pokusil na př. Laidlaw, Smith a Andrewes, je poměrně velmi slabý. Ne-zvětší se ani tehdy pronikavým způsobem, bylo-li koňské serum koncentrováno. Serum vstříknuto myškám profylakticky před infekcí, dovede chránit před smrtelnou pneumonií a rovněž tak několik minut, až prý i několik hodin po infekci, ale jen proti několika málo smrtelným dávkám viru.

Snad nejhorší na celém je však tā okolnost, že protichřipkové serum jakéhokoliv původu nelze delší dobu uskladniti, neboť jeho účinnost klesá během několika měsíců na minimum. Přes to však se pokračuje v pokusech o imunisaci pasivní a je naděje, že se časem přece jen podaří vyrobiti tak účinné serum, které by včas aplikováno u velmi těžkých případů chřipky, dovedlo zabrániti vyplukení nejtěžší komplikace, t. j. pneumonie. Podle našeho názoru by snad mělo větší význam, nežli spoléhati na zásoby ser rychle ztrácející účinek, toto preventivní opatření:

Při nynějších velkých organisacích dárců krve by nebylo příliš zatěžko mezi nimi vybrati (podle výsledků rychle proveditelných deviací komplementu) takové, kteří by měli dostatečný residuální titr protilátek ve svém seru. U těch by pak bylo možno snad již jedinou injekcí vakeiny zvýšiti jejich titr, nebo ho učiniti specifickým takovým způsobem, že by bylo lze užiti jejich celé krve k therapeutickým transfusím při propukávajících chřipkových pneumoniích.

Medikamentosní therapie chřipky je, jak zkušenost učí a experimenty potvrdily, v začátcích a vlastně se nedostala přes hranice nepřiznaných, ale citěných neúspěchů. Ani moderní chemotherapie zatím neskýtá valně lepších výhlídek. Levaditi měl sice dojem, že se mu podařilo Prontosilem zchrániti zvířata infikovaná smrtelnou dávkou viru od úmrtí, ale pokud jsme mohli zjistiti, jeho nadšení není nikým jiným ve stejně míře sdíleno. Jelikož však přes to jeho zjištění pokládáme za principielně důležité, provedli jsme dosti velkou řadu pokusů, a to tak, že jsme se snažili léčiti myšky infikované několikanásobnou smrtelnou dávkou W. S. viru dvěma různými moderními chemotherapeutiky, a to jedním sulfamidem a jedním sulfapyridinem, s kterými jsme právě v té

době měli výborné výsledky proti hemolytickým streptokokům, zčásti i proti pneumokokům. Ačkoliv jsme kombinovali všechny možné aplikační methody těchto chemotherapeutik, podávajíce je jednak preventivně, jednak therapeuticky již po infekci, neviděli jsme nejmenšího příznivého efektu. Nejen, že se nám nepodařilo zmenšiti mortalitu zvířat, nýbrž se nám nepodařilo ani nijak zřetelně oddáliti jejich smrt. Je možno ovšem, že námi použitá dávka viru byla poněkud vysoká. Ale i tak jsme přesvědčeni, že dosavadní chemotherapeutika neovlivňují nijak zřetelně čistou a silnou infekci vyvolanou chřipkovým virem. Není však vyloučeno, že snad časem i takové chemotherapeutikum bude objeveno a ostatně je dosti pravděpodobné, že i doposud známá chemotherapeutika mohou úspěšně přispěti k léčení chřipkových komplikací, pokud jsou tyto ovšem vyvolány prudce virulentními hnисavými mikroby, jako je na př. *streptococcus β-hemolyticus* z A skupiny.

Zmínili jsme se již o tom, že podle našeho názoru, by byl možný ještě jiný výklad imunologicky těžko vyložitelného faktu, že během lehkých chřipkových epidemií u téhož lidského individua opětovaně propuká chřipkové onemocnění, což se stává velmi pravděpodobně i tehdy, kdy je celá vyvolána virem téže antigenní skladby. Naše domněnka není jen zcela hypotetická, nýbrž je podepřena často se opakující zkušeností, již jsme učinili během svých více než dvouletých pokusů s chřipkovým virem.

Četní naši spolupracovníci, kteří se delší dobu zúčastnili sekcí fretek zašlých infekcí a rozetírání zvířecích orgánů obsahujících virus, počali zhusta trpěti příznaky, které vypadaly jako ne-smírně urychléné a velmi slabé chřipkové infekce. Často již za 20 až 30 minut, jindy za 2—3 hodiny po práci s virem pocítili lehké bolesti hlavy,

pocit palčivosti v nosní sliznici někdy téměř nutící ke kýchání, jako když začíná rýma a lehkou skleslost. Během následující noci však obvykle všechny příznaky ustaly a nevyvinulo se z nich žádné skutečné chřipkové onemocnění. Zejména nápadně často bylo pozorovati tyto záhadné příznaky s velmi krátkou inkubační dobou po odběhlé chřipkové epidemii v r. 1939. U některých šla citlivost dokonce tak daleko, že stačilo, aby otevřeli myšku zašlou chřipkovou pneumonií a vyňali její plíce, aby tento celkem bezvýznamný, ale zřetelný syndrom příznaků byl vyvolán. Je těžko si představiti, že by adaptované kmeny chřipkového viru, i když jsou pro zvířata velmi účinné, jako je na př. kmen W. S. mohly vyvolati u člověka onemocnění s tak nesmírně krátkou inkubační dobou. Časté opakování a rychlé nastoupení příznaků bez dalších následků, zejména u lidí, kteří byli i jinak alergicky stigmatisováni, nám vnucovalo představu získaného stavu přecitlivělosti, vzniklého opětovaným kontaktem s chřipkovým virem. Po-kládáme za docela možné, že i proti chřipkovému virus, stejně jako proti celé řadě filtrovatelných virů, může vzniknouti vedle imunity také stav alergické přecitlivělosti, a to tím spíše, že s málo-kterým infektem přijde člověk v životě tolíkráte do styku (snad s výjimkou streptokoků) jako s vi-rem chřipkovým.

Stojí jistě za úvahu, zda by snad nebylo možno vyložiti si tak zvané recidivy chřipkového one-mocnění během téže epidemie nikoliv novým one-mocněním, které by ovšem muselo probihat po typické inkubační době, nýbrž syndromem pří-znaků chřipce velmi blízkým, které jsou projevem alergie na chřipkový virus, jež byla osvěžena a zesílena právě probíhající epidemii. Zkusili jsme prokázati experimentálně tuto přecitlivělost intra-kutánním testem za použití účinného filtrátu z my-

ších plic a skutečně jsme u mnoha osob obdrželi zřetelně pozitivní časnou i pozdní reakci. Reakce byla patrná nejenom po vstřiknutí filtrátu koncentrovaného, nýbrž i zředěného. Je zajímavé, že jednu z nejsilnějších reakcí měl autor tohoto článku, který s chřipkovým virem pracoval nejdéle (ale při tom při jarní epidemii r. 1939 vůbec zřetelně neonemocněl) a dále ten z jeho spolupracovníků, který byl na práci nejvíce zúčastněn.

Chráníme se činiti z tohoto pokusu jakékoli konkretní závěry, neboť jsme si dobře vědomi pravděpodobných omylů, zejména možné přecitlivělosti na cizorodou bílkovinu, která byla vektorem viru, přes to však se nemůžeme zbaviti dojmu, že by bylo žádoucí, aby tato otázka byla znova podrobena důkladnému a exaktnímu prozkoumání virem pokud možno purifikovaným a aplikovaným nejenom intrakutánně, nýbrž i vetřeným do sliznice nosní (zde samozřejmě pouze virus mrtvý).

Tím končíme náš přehled o dosavadních vědomostech a vlastních pokusech s virem epidemické chřipky, o němž nepochybujeme, že je skutečným etiologickým vyvolavatelem této choroby. Budíž nám dovoleno, abychom zdůraznili, že při dnešních experimentálních možnostech není nutno se příti o to, zdali ta, či ona právě probíhající epidemie je skutečnou epidemii chřipky, nebo pouhým nahromaděním horečnatých katarů chřipce podobných, ale lišících se od ní etiologicky: jest povinností mikrobiologů, aby rozhodli experimentem na fretce a případným serologickým průkazem protilátek.

Přes to, že v poznání chřipkového viru bylo již nesmírně mnoho vykonáno, zůstává ještě velká řada nerozrešených záhad. Jedné z nich se pouze dotkneme: dodnes nevíme, kde se nachází chřipkový virus v dobách mimo epidemii. Jen dva náznaky se pokoušejí odhaliti toto tajemství. Shope

dokázal experimentálně, že vepřová škrkavka může býti intermedierním hostem vepřového chřipkového viru a Taylor prý našel dva lidské zdravé nosiče chřipkového viru i v době mimo jakoukoliv epidemii. Tyto dva příklady, jež, pokud je známo, nebyly dosud ani potvrzeny ani vyvráceny, dokazují jasně, že se lidský důvtip musel odvážiti řešení některých z mnoha posledních záhad, které chřipka ještě skrývá. Věříme, že i tyto snahy budou korunovány úspěchem.

R e s u m é.

Autor podává přehled otázky etiologie epidemické chřipky a dokládá na základě cizích nálezů i vlastních pokusů, že za skutečného vyvolavatele této choroby je možno pokládat pouze filtrovatelný virus.

Pokusy na fretkách a myších podařilo se mu ověřit většinu experimentálních údajů o vlastnostech chřipkového viru, a to nejdříve s cizím, na zvířata vysoce adaptovaným a silným chřipkovým kmenem W. S. Zejména podrobně studoval otázku sterility bronchopneumonických ložisek u myší i fretek a přítomnost druhotních bakterií v hořených dýchacích cestách u fretek. Zvláštní pozornost věnoval možnosti pokusného vyvolání chřipkové encefalitidy a dále tak zvané intestinální formě chřipky.

V průběhu chřipkové epidemie r. 1939 podařilo se mu isolovati na fretkách několik kmenů chřipkového viru, z nichž zejména kmen Z. M. po řadě pasáží vyvolával u fretek bronchopneumonická ložiska a mohl býti brzy přenesen na myši, které usmrcoval za typických příznaků v době o několik dní delší, nežli kmen W. S. V dalším probírá autor otázku konzervace chřipkového viru a možnost jeho přenosu na jiná zvířata, nežli jsou

fretky a myši. Ve shodě s jinými autory úspěšně přenesl virus na ježka a dále zjistil, že je možno silným virem vyvolati onemocnění i malých koťat, která sice nejeví zvláštních příznaků zachvácení hořeního traktu dýchacího, ale reagují podobným zvýšením teploty, jako fretky.

Specielně byla propracována autorem navržená metoda přenosu chřipkového viru na morčata otrávená botulinotoxinem. Tento zákrok zvyšuje citlivost morčat do té míry, že je na ně možno přenést virus přímo z člověka (jak bylo prokázáno při téže epidemii), což jest spojeno ještě s tou výhodou, že z této jediné pasáže na morčeti byl možný ihned přenos na myšku. Takto zachycený virus byl stejně pathogenní pro fretku, jako týž kmen, který byl přenesen z člověka přímo na fretku a teprve po několika pasážích na myš adaptován.

K tkáňovým kulturám bylo použito nejrůznějších explantátů z morčecího embrya; jedině vhodným objektem se však ukázaly embryonální morčecí plíce, na nichž byl virus nejenom v řadě pasáží uchován, nýbrž i velmi zřetelně pomnožen.

Práce je ukončena přehledem dosavadního studia antigenních vlastností chřipkového viru a kritickým oceněním možnosti aktivní i pasivní imunisace, případně chemoterapie.

Český kmen viru Z. M. shledán zřetelně antigenně odlišným od viru W. S.

Autor předkládá k diskusi otázku, zda by nebylo možno vyložiti některé tak zv. recidivy chřipkového onemocnění u téhož člověka (během jediné a lehčí epidemie) stavem získané alergické pře-
citlivělosti proti chřipkovému viru.

Literatura.

1. Andrewes: Proc. R. Soc. Med. 32, 145. 1939. Zbl. Ref. 135, 3/4, 68, 1935. — 2. Andrewes C. H.: Brit. med. J. 513,

- II. 1939. — 3. Andrewes, Laidlaw, Smith: Lancet, **859**. Oct. 1934. — 4. Andrewes, Laidlaw, Smith: Brit. J. of Path. **16**, 566. 1935. — 5. Andrewes, Smith: Brit. J. exper. Path. **18**, 93. 1937. — 6. Andrewes, Smith: Brit. J. exper. Path. **20**, 305. 1939. — 7. Andrewes C. H., Wilson Smith: Brit. J. exper. Path. **18**, 43. 1937. — 8. Azzi A.: Schweiz. med. Wschr. **216**, 1938. — 9. Béelere A.: Presse méd. **1385**, 1938. — 10. Bieling R., Oelrichs L.: Behringwerke Mittlgen, **9**, 20, 28, 47, 52. 1938. — 11. Blood W.: Brit. med. J. I. **1079**. 1937. — 12. Brown H. W.: Amer. J. Hyg. **24**, 361. 1936. Zbl. Ref. **124**, 23/24, 528. 1937. — 13. Burnet F. M.: Brit. J. exper. Path. **17**, 282. 1936. — 14. Burnet F. M.: Brit. J. exper. Path. **18**, 37. 1937. — 15. Burnet F. M.: Brit. J. exper. Path. **19**, 388. 1938. — 16. Burnet F. M., Lush: Austral. J. exper. Biol. **16**, 261. 1938. Zbl. Ref. **132**, 19/20, 438. 1939. — 17. Cerruti C. F.: C. r. Soc. Biol. **126**, 500. 1937. — 18. Cerruti C. F. et di Aichelburg U.: C. R. Soc. Biol. **126**, 501. 1937. — 19. Conforto A., Valis: C. r. Soc. Biol. **126**, 1230. 1937. — 20. Clampit, J. Marion, Gordon F. B.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **36**, 747. 1937. Zbl. Ref. **127**, 17/18, 405. 1937. — 21. Coronini C.: Wien. med. Wschr. **1043**, 1937. — 22. Daddi G.: Ann. Inst. Forlanini **2**, 520. 1938. Zbl. Ref. **132**, 19/20, 438. 1939. — 23. Daddi G., Paná C.: Giorn. Batter. **19**, 761. 1937. Zbl. Ref. **130**, 5/6, 131. 1938. — 24. Daddi G., Paná C.: Ann. Inst. Forlanini **6**, 1—5. 1937. Zbl. Ref. **128**, 11/2, 267. 1938. — 25. Denning H.: D. med. Wschr. **178**, 1937. — 26. Dujarric de la Rivière: Ann. Past. T. **59**, 5. 1937. — 27. Eaton, Monroe D., Pearson, Harold E.: J. of exper. Med. **72**, 6, 635, 1, 1940. — 28. Eaton M. D.: J. of Immun. **39**, 43. 1940. — 29. Eckardt E., Flohn H., Jusatz H. J.: Z. Hyg. **118**, 64. 1936. — 30. Elford, Andrewes, Tang: Brit. J. exper. Path. **17**, 51. 1936. — 31. Fairbrother, Martin: Lancet **718**, 1938. — 32. Fairbrother R. W.: Lancet **1269**, 1938. — 33. Fairbrother, Martin: Arch. f. d. ges. Virusf. I. 1, 114. 1939. — 34. Fairbrother, Hoyle: J. of Path. **44**, 213. 1937. — 35. Findeisen H.: Zbl. Bakter. Orig. I. 1937, 256. 1936. — 36. Franke P.: D. med. Wschr. **2025**. 1935. — 37. Francis: Amer. J. publ. Health. **211**, 1937. Zbl. Ref. **127**, 17/18, 403, 1937. — 38. Francis: J. exper. Med. **69**, 283. 1939. — 39. Francis jr., Th.: J. amer. med. Assoc. **105**, 251—254, 1935. — 40. Francis jr., J. exper. Med. **69**, 283, 1939. — 41. Francis jr., Th.: Science **91**, 198—199. Zbl. Ref. **139**, 7/8, 160. 1941. — 42. Francis jr., Moore E.: J. exper. Med. **72**, 717. 1940. — 43. Francis, Magill: J. exper. Med. **62**, 505—516, 1935. — 44. Francis, Magill: Proc. Soc. exper. Biol. a Med. **33**, 604. 1936. — 45. Francis jr., Magill: Proc. Soc. exper. Biol. a

- Med. **36**, 132. 1937. — 46. **Francis, Magill:** J. exper. Med. **65**, 251. 1937. — 47. **Francis jr., Magill:** Brit. J. exper. Path. **19**, 284. 1938. — 48. **Francis, Magill, Beck, Richard:** J. amer. Assoc. **109**, 566. 1937. Zbl. Ref. **131**, 5/6, 130. 1938. — 49. **Francis, Richard, Beck, Dorothy:** Amer. J. publ. Health, 1141. 1937. Zbl. Ref. **130**, 5/6, 126. 1938. — 50. **Frost W. H., Volkenburgh V. A.:** Amer. J. Hyg. **21**, 647—664, 1935. Zbl. Ref. **120**, 1/2, 34. 1935. — 51. **Gallavan M.:** Amer. J. Path. **13**, 911. 1937. Zbl. Ref. **120**, 7/8, 173. 1938. — 52. **Gildemeister, Haagen, Waldmann:** Handbuch der Viruskrankheiten, II. 25. 1939 (Haagen, Maurer). — 53. **Gordon, Freeman, Clampit:** Proc. Soc. exper. Biol. a Med. **30**, 450. 1938. Zbl. Ref. **134**, 7/8, 175. 1939. — 54. **Grieshammer W.:** Arch. Hyg. **121**, 102. 1938. Zbl. Ref. **132**, 19/20, 437. 1939. — 55. **Haagen:** Zbl. Bakter. I. Orig. **144**, 335. 1939. — 56. **Haagen:** D. med. Wschr. **89**. 1940. — 57. **Haagen E., Du Dscheng-Hsing:** Zbl. Bakter. Orig. I. **144**, 6, 345. 1939. — 58. **Hallauer C.:** Schweiz. med. Wschr. **83**. 1937. — 59. **Herzberg K.:** Zbl. Bakter. Orig. I. **143**, 2, 93. 1938. — 60. **Herzberg K.:** Zbl. Bakter. Orig. I. **146**, 5, 177. 1940. — 61. **Herzberg K., Gross Walter:** Zbl. Bakter. Orig. I. **146**, 4, 129. 1940. — 62. **Horsfall:** J. exper. Med. **70**, 209. 1939. — 63. **Horsfall:** J. of exper. Med. **70**, 2, 209. 1939. — 64. **Horsfall, Lennette:** J. exper. Med. **72**, 3, 247. 1940. — 65. **Horsfall, Lennette:** J. Bact. **39**, 56. 1940. — 66. **Horsfall, Lennette:** J. of Amer. Med. Assoc. **116**, 2, J. 11, 1941. — 67. **Hoyle, Leslie, Fairbrother:** Brit. Med. J. I. **655**, 1937. — 68. **Hoyle, Leslie, Fairbrother:** J. of Hyg. **37**, 512. 1937. Zbl. Ref. **128**, 11/12, 269. 1939. — 69. **Hyde, Chapman:** Amer. J. Hyg. **26**, 116. 1937. Zbl. Ref. **127**, 17/18, 405. 1937. — 70. **Chandler, Forthegill:** J. bacter. **37**, 415. 1939. — 71. **Chapman J., Hyde R. R.:** Amer. J. Hyg. **31**. Sect. B. 46—68, 1940. Zbl. Ref. **138**, 7/8, 160. 1940. — 72. **Kairies A.:** Arch. Hyg. **121**, 89. 1938. — 73. **Kairies:** Z. Hyg. **121**, 749. 1939. — 74. **Kairies:** Zbl. Bakter. Orig. I., **137**, 1/2, 1936. — 75. **Köbe A.:** Arch. Tierheilk. **71**, 149. 1937. Zbl. Ref. **126**, 23/24, 525. 1937. — 76. **Köbe, Fertig:** Zbl. Bakter. Orig. I. **141**, 1/2. 1938. — 77. **Kuklová:** Discussion, Ier Congres internat. de Microbiol. Paris. T. I. **515**. 1939. — 78. **Laidlaw, Smith, Andrewes:** Brit. J. of exper. Path. **16**, 275. 1935. — 79. **Laidlaw, Smith, Andrewes, Dunkin:** Brit. J. exper. Path. **16**, 275. 1935. — 80. **Lazzlo D., Nowotny K.:** Wien. Klin. Wschr. **51**, 1936. Zbl. Ref. **122**, 21/22, 480, 1936. — 81. **Lennette, Horsfall:** J. of exper. Med. **72**, 3, 233, 1940. — 82. **Levaditi, Lépine:** Les ultravirüs des maladies humaines, Paris 1937. (Haber 991.) — 83. **Magill, Francis:** J. exper. Med. **65**, 861. 1937. — 84. **Magill, Francis:** Proc. Soc.

- exper. Biol. a Med. 39, 81. 1938. Zbl. Ref. 133, 13/14, 310. 1939. — 85. **Platt:** Austral. J. exper. Biol. a med. 17, 19. 1939. Zbl. Ref. 135, 3/4, 68. 1939. — 86. **Ricard, Francis:** J. exper. Med. 67, 935. 1938. Zbl. Ref. 133, 13/14, 317. 1939. — 87. **Rimpau W.:** Münch. med. Wschr. 1761. 1937. — 88. **Rosenbusch, Shope:** J. exper. Med. 69, 499. 1939. — 89. **Salk, Lavin, Francis:** J. of exper. Med. 72, 6, 729. 1940. — 90. **Shope:** J. exper. Med. 66, 151, 169. 1937; 69, 847. 1939. — 91. **Shope:** J. exper. med. 67, 730. 1939. — 92. **Shope, Francis:** J. exper. Med. 64, 791. 1936. — 93. **Shope, Francis, Eaton, Horsfall, Taylor, Dreguss:** Arch. f. d. ges. Virusf. I. 4, 545. 1940. — 94. **Slanetz, Smetana:** J. of exper. med. 66, 6, 21/22. — 95. **Smith:** Lancet 1256, 1936. — 96. **Smith:** Brit. J. exper. Path. 16, 508. 1935. — 97. **Smith:** St. Mary's Hospital Gazette 1937. XLIII, 112. 1937. — 98. **Smith, Andrewes:** Brit. J. of Path. 19, 293. 1938. — 99. **Smith, Stuart-Harris:** Lancet 121, July 1936. — 100. **Smorodintseff A. A.:** Lancet 1383, 1936. — 101. **Smorodintseff A. A., Ostrovkaja S. M.:** J. of Path. 44, 559. 1937. Zbl. Ref. 126, 23/24, 528. 1937. — 102. **Schmidt P.:** Med. Welt 1437, 1936. — 103. **Schmidt P.:** D. med. Wschr. 172, 1937. — 104. **Schmidt, Kairies:** Münch. med. Wschr. 86, 1938. — 105. **Stuart-Harris C. H.:** Brit. J. exper. Path. 17, 324. 1936. — 106. **Stuart-Harris C. H.:** Brit. med. J. 516, II. 1937. Zbl. Ref. 130, 5/6, 125. 1938. — 107. **Stuart-Harris C. H.:** Brit. J. exper. Path. 18, 485. 1937. — 108. **Stuart-Harris, Francis:** J. of exper. med. 68, 6, 40/41. — 109. **Tang F. F.:** China med. J. 51, 41. 1937. Zbl. Ref. 127, 17/18, 406. 1937. — 110. **Tang F. T.:** Brit. J. exper. Path. 19, 179. 1938. Zbl. Ref. 131, 5/6, 130. 1938. — 111. **Taylor R. M., Dreguss M.:** Amer. J. Hyg. 31, 31—35. 1940. Zbl. Ref. 138, 7/8, 159. 1940. — 112. **Tsurumi, Tagaki:** J. med. Sci 13, 61. 1939. Zbl. Ref. 134, 7/8, 175. 1939. — 113. **Waldmann:** Verk. 13, inter. tierärztl. Kongr., Zürich-Interlaken 1, 491—497. 1939. Zbl. Ref. 137, 23/24, 516. — 114. **Waldmann O., Köbe K.:** Zbl. Bakter. Orig. I. 138, 153. 1937. — 115. **Woolpert — etc.:** J. of exper. Med. 68, 3, 1938. — 116. **Yen C. H.:** Chin. med. J. 55, 239. 1939. Zbl. Ref. 134, 7/8, 174. 1939. — 117. **Yen C. H.:** Chin. med. J. III., 342—348, 1940. Zbl. Ref. 139, 7/8, 158. 1941.
-