

DÍLOVÝ PROJEKT V KNU MIMODĚLOVÉ
a) klinické neurologie
KARLOVY UNIVERSITATI
Praha II, U sv. Mikuláše 7, Dr. F. PATOČKA
Tel. č. 232013, 14, 234992

EXPERIMENTÁLNÍ POLIOMYELITIS VE SVĚTLE NEJNOVĚJSÍCH VÝZKUMŮ

ZVLÁŠTNÍ OTISK

Z ČASOPISU LÉKÁRŮ ČESKÝCH,

80:1594, 1941



V PRAZE 1941

NAKLADEM VLASTNÍM, TISKEM DR. ED. GRÉGRA A SYNA V PRAZE

Experimentální poliomyelitis ve světle nejnovějších výzkumů.*)

Dr. F. PATOČKA.

(Část histologickou zpracoval prof. dr. H. Šikl.)

Část I.:

Souhrn novodobých názorů na epidemiologii poliomyelity, možnosti aktivní a pasivní imunisace při ní a dosavadní pokusy o přenos lidského viru na zvíře.

Studium viru poliomyelity poutá stále stupňovanou pozornost mikrobiologů i pathologů, a to jak pro rychlý vzrůst počtu případů na celém světě (Kling, Olson), tak pro zřetelně těžší průběh choroby i častější výskyt u dospělých osob, jehož důsledkem jsou dnes nebývale veliké cifry mortality během těžších epidemí a nenapravitelná poškození po celý život. Přes nejpečlivější práci, konanou za značných finančních obětí na celém světě, zůstává v otázce poliomyelity stále tolik záhadného, že můžeme skoro říci, že jsme se svými znalostmi o ní v mnohém směru téměř na začátku.

To se týká především epidemiologie choroby: přenos viru kapénkovou infekcí z nosohltanu nemocných do nosohltanu zdravých zdál se s počátku faktorem dobře vysvětlujícím rychle vznikající a foudroyantně se šířící epidemie. Pečlivé studium sporadických případů vyskytnuvších se na místech vzdálených od epidemie, a to bez pří-

*) Částečně předneseno ve Spolku českých lékařů v Praze, listopad 1939.

mého kontaktu s nemocným, upozornily na možnost přenosu infekce zdravými vironosiči, jejichž existence byla experimentem (a to nejdříve opět z nosohltanu) nade vši pochybnost prokázána. Dnes je pozornost obrácena na možnosti infekce cestou gastrointestinální, na t. zv. gastrointestinální formy obrny (Kling, Kleinschmidt), na eliminaci viru stolicí, na jeho přítomnost a persistenci ve vodě z kanálů a žump, a zejména pak na konservaci viru v čisté vodě, používané za vodu pitnou. Infikovanou pitnou vodou přímo, potravinami, k jichž úpravě se této vody nepřevařené používá, a snad i potravinami, jež přijdou do intimnějšího kontaktu s nečistým vironosičem (Levaditi), jest dána řada nových možností epidemiologických, zatím více předpokládaných, nežli skutečně prokázaných. Pravděpodobnost těchto domněnek, ostatně dobře vysvětlujících mnohé zvláštnosti endemických ložisek, jest však tak veliká, že již dnes můžeme počítati s mnohem pestřejší epidemiologií poliomyelitidy, nežli o jaké nás poučovalo klasické učení, považující její agens za virus čistě neurotropní.

Ale ani těmito poznatky nejsou epidemiologické záhadu poliomyelitidy byť i jen přibližně vyčerpány. Poliomyelitida se nezdá být chorobou sociální. To znamená, že lidé (platí to zejména pro děti) z prostředí chudého nebývají postiženi více, nežli lidé z nejlepších poměrů, ba právě naopak. Větší nahromadění lidí na malém prostoru za špatných sociálních podmínek nevede nutně ke zmnožení počtu případů mezi nimi během epidemie, což je těžko pochopitelné při možnostech kontaktní infekce, takto usnadněných (Levaditi). Morbidita za epidemie jest větší na venkově, nežli v městech, což jest rovněž na první pohled protismyslné. A i když přepětí sil hraje nesporně velikou roli tím, že značně zvyšuje individuelní re-

ceptivitu, nelze jí vysvětliti tak záhadné případy, jako je na příklad pozorování, že ze dvou sourozenců věkem nevalně vzdálených a spících na témže loži, jeden onemocní a druhý nikoliv, nebo, že u dětí otce zemřevšího na poliomyelitidu (Landryho paralysu) je virus prokázán experimentálně ve stolici v množství snadno usmrcujícím opici, aniž by však kterékoliv z těchto dětských individuů jevilo sebemenší známky onemocnění (Lépine, Sedallion). Mají-li u člověka poměry vnitřní sekrece, množství vitaminů B i C v těle, jichž souhra s infekcí je naprosto nepochybná, velký vliv na zvýšení tělesné vnímavosti, jest také stejně jisté, že velký význam pro zesílení viru mají faktory klimatické a meteorologické (suchost nebo vlhkost a teplota vzduchu, hladina spodní vody) a snad i to, co se neurčitě tuší pod pojmem faktorů kosmických (Levaditi). Z fundamentálních otázek epidemiologických zůstává však zejména jedna nerozřešena, zda jest totiž člověk jediným možným hostitelem viru v přírodě, nebo můžeme-li počítati ještě s nositeli zvířecími; to by ovšem s největší pravděpodobností opět předpokládalo, že existují zvířecí choroby podobné lidské poliomyelitidě, vyvolané virem buď identickým s poliomyelitickým, nebo jemu alespoň tak příbuzným, jako je virus vakcinálního viru varioly. Je velmi zajímavá zkušenosť, že právě v době, kdy probíhá mezi lidmi větší epidemie poliomyelitidy, bývají pozorovány i mezi zvířaty epizootická onemocnění, patřící vesměs do rozsáhlé, ale dosud nedostatečně probádané kategorie t. zv. zvířecích encephalomyelitid, jejichž klinický průběh a ovšem také některé symptomy pathologicko-anatomické, ale zejména histologické (zvláště u veprů) upomínají nápadně na poliomyelitidu lidskou (Levaditi). Tak na př. známá americká encephalomyelitis koní probíhala v Kalifornii současně s epidemii dětské obrny v r. 1930.

Stejně zajímavé bylo simultanní vyskytování se bornské nemoci pozorované Müllerem a psinky pozorované Laidlawem za stejných okolností. V našich krajích již dříve byla nápadná časová shoda dětské obrny s těšínskou nemocí, popsanou Kloboukem (encephalomyelitis vepřů), při čemž soudobost výskytu jednotlivých případů choroby vepřů a onemocnění některého dítěte z téže domácnosti bila tak do očí, že nás na ni upozorňovali nejenom lékaři, mýbrž i sami postižení laici. O zvláště zajímavém a podrobně prostudovaném případu těšínské nemoci referují Fingerland, Řehoř a Hub z pardubické nemocnice, kterou prošlo během epidemie dětské obrny 1939 mnoho těžkých nemocných. Hojně bývají citovány 2 případy zachycené Frauchigerem a Hofmannem, kteří pozorovali encephalomyelitidu jalovic v Jurském pohoří, která klinicky i nálezem likvorologickým odpovídala zcela poliomyelitidě lidské a při níž i nález histologický se ukázal totožný s poliomyelitidou. Ještě mnohem průkaznější a českému případu podobnější jsou další případy téhož autora, jež popsal spolu s Messerlim. Týkají se infekce vepřové se zajímavými údaji epidemiologickými, podle nichž tyto ojedinělé případy i histologicky ověřené byly zcela孤立ované, t. j. neměly v zápětí žádnou zvířecí epizootii, což skutečně dělá dojem, jako by šlo o případy akvirované přímo z člověka. V převážné většině případů je to hlavně shoda časová a podobnost symptomů, která nám vnucuje značně svěducí představu o blízké příbuznosti těchto chorob s obrnou člověka a zejména tehdy, když epizootie zvířecí předchází epidemii lidské, nás vede k nedosti kritickému závěru, jako by lidská onemocnění byla způsobena přenosem ze zvířat. Přihlédneme-li však blíže k podrobnostem biologického charakteru jednotlivých encephalomyelitických virů a zejména k faktům imunobio-

logickým, tu shledáme, že takové povrchní epidemiologické srovnání neobstojí. Především se přesvědčíme o tom, že encephalomyelitidy zvířecí jsou naprosto různá onemocnění, lišící se již fyzičním charakterem viru, možností therapeutických zákroků, epidemiologicky při přesném studiu a samozřejmě i antigenním charakterem. Často mívají společný jenom povrchní klinický obraz choroby a, co je zajímavé, někdy také histologický nález v centrálním nervstvu, což ovšem naprosto nestačí k tomu, aby bylo možno považovati všechny tyto choroby za identické. Již fakt, že mezi vyvolavateli zvířecích encephalomyelitid nacházíme agens téměř výhradně neurotropní, ale také činitele částečně organotropní, ba dokonce viry čistě septické se spoluzachvácením centrálního nervstva, svědčí velmi výmluvně o mnohotnosti těchto chorob.

Nejlépe prostudována ze všech je snad bornská choroba koní, vzácněji přicházející také u ovcí. Virus, toto onemocnění vyvolávající, je potud nejblíže lidské poliomyelitidě, že je podobně jako virus poliomyelitidy z největší části neurotropní. Mimo centrální nervstvo se sice také nachází i v jiných orgánech, zejména ve varleti, vaječníku, v pankreatu a v glandula parotis, a to v kvantu, které svědčí nejenom o náhodném zanesení viru do nich, nýbrž o tom, že byly skutečně spolu zachváceny; stačí však vzpomenouti si na tonsilitidy, vyvolané virem lidské poliomyelitidy, dále na určitě prokázané enteritidy a banální zánětlivé změny v mesenteriálních uzlinách s nahromaděním velikého množství viru při tak zv. gastrointestinální formě poliomyelitidy (Kling), abychom si uvědomili, že odchylky bornského viru od přísného neurotropismu, jenž byl dříve pro poliomyelitidu považován za dogmatický, nemusely by býti ještě považovány za absolutně platnou diferenciální

diagnostiku mezi oběma viry. Jsou zde však mezi nimi daleko hlubší rozdíly, spočívající v základních vlastnostech viru samotného. Virus poliomyelitický je považován za jeden z virů nejmenších, virus bornské nemoci co do velikosti svých částeček patří hned za virus variolovakcinální a patří tedy mezi největší. Dále je virus bornské nemoci poměrně snadno přenosný na laboratorní zvířata, a to někdy po nápadně dlouhé inkubační době, kdežto virus poliomyelitidy běžně pouze na opice. Konečně nebylo lze mezi nimi prokázati kříženou imunitou opravdové antigenní shody, ale je zajímavé, že v pokusech Nicolau a Gallowayových bylo prokázáno zcela zřetelné zvýšení odolnosti proti poliomyelitickému viru u opic, které před tím prodělaly mitigovanější infekci bornskou.

Druhou nejlépe prostudovanou encephalomyelitidou je encephalomyelitis koní ve Spojených státech. Má několik variant. Na ní je nejzajímavější její schopnost infikovat také člověka, zejména děti. U lidských případů nebyla nikdy encephalomyelita koní, přenesená na člověka, zaměněna s poliomyelitidou, neboť vyvolávala u dětí symptomy zřetelně odlišné od klasické poliomyelitidy, a pak se podařilo virus z mrtvých obětí bez nesnází identifikovat jako virus koňský. V Sovětském Rusku bylo popsáno několik druhů koňských encephalomyelitid, odlišných od bornské choroby, z nichž Wichélesskym popsaná meningoencephalitis koňská, vyvolaná virem č. 2 a č. 6, blíží se velmi značně jak některými klinickými symptomy, tak také schopností přenosu na kočky, eventuelně psy, a (co je nejdůležitější) částečně i kříženou imunitou, viru vzteklinovému.

Konečně tak zv. hemoragická infekční encephalomyelita koní Fröhner-Dobbersteinova jest klasickým příkladem septického onemocnění, vy-

volaného filtrovatelným virem, s krvácením do všech orgánů a s ohromně zvětšenou, téměř na anthrax upomínající slezinou. Tato choroba ukažuje při podrobném pathologicko-anatomickém studiu tolik odlišného od předcházejících, více neurotropních infekcí, že v ní můžeme právem viděti jejich druhý pól, a to ten, jímž nastává přechod k čistě septickým chorobám virovým, jako je u člověka žlutá zimnice, u zvířat vepřový mor.

Histologickým nálezem v centrálním nervstvu je dětské obrně nejpodobnější Kloboukem zevrubně probádaná těšínská choroba vepřů, o níž úmyslně neuvádíme zde podrobnosti, neboť jí je věnována velmi podrobná studie Fingerlandova, Hubova a Řehořova, o níž shora učiněna zmínka. K vůli úplnosti jenom upozorňujeme, že i tento virus je částečně organotropní, zejména enterotropní a pneumotropní, a že částečný pneumotropismus některých kmenů tohoto viru zavdal pravděpodobně Mackovi příčinu k domněnce, že je identický s virem vepřové chřipky (což jest podle našeho názoru nesprávné).

Tím jsme podali pouze naprosto zběžný přehled nejznámějších a nejlépe prostudovaných encephalomyelitických virů, jež zajímají veterináře nejvíce asi pro národochospodářské škody, jež při svých epizootiích vyvolávají. Existuje však ještě dlouhá řada podobných encephalomyelitických virů, které vyvolávají spontánní choroby menších zvířat, a to buď divoce žijících (liška, šelmy kočkovité), nebo domestikovaných. Ty nejsou z největší části vůbec prostudovány, nejsou také podrobněji klasifikovány a v důsledku toho o jejich eventuelní příbuznosti s virem lidské poliomyelity není naprosto nic známo.

Nezbytným předpokladem, jež by bylo nutno splnit, abychom byli oprávněni identifikovati některou z dosud již známých, nebo časem ještě po-

znaných encephalomyelitid zvířecích s poliomyelitou lidskou, by bylo zjištění antigenní shody obou virů kříženou imunitou, a to nejlépe experimentem na opici. Tento přísně vědecký požadavek dosud splněn nebyl, a proto všechny podobné domněnky nepřesahují rámec neprokázaných hypothes, jak to správně zdůrazňuje Levaditi. Časová shoda ve výskytu lidské obrny a popsaných zvířecích chorob je vyvolána asi tím, že dosud nepřesně známé, ale jistě nesmírně důležité faktory meteorologické, telurické i kosmické aktivují asi v určité chvíli latentní virus dětské obrny, takže z endemicálních ložisek vzniknou nové velké epidemie, a mohou mít stejný vliv na infekce viry epizootických encephalomyelitid zvířecích, do téže doby utajené. Nemusí tedy jít o skutečnost o přenos téhož viru z člověka na zvíře nebo obráceně, nýbrž spíše o uplatnění téhož faktoru v epidemiologii dvou nebo více různých, ale paralelně probíhajících onemocnění.

Přes tato fakta, dosud přísně vědeckou cestou zjištěná, o odlišnosti virů zvířecích a virů pravé dětské obrny, mají všechny srovnávací pokusy, obirající se studiem možného vztahu zvířecích chorob centrálního nervstva a lidské poliomyelidy, důležitý význam. Nezapomeňme, jak mnoho nového jsme se dozvěděli o poliomyelitidě ve světle nejnovějších výzkumů epidemiologických i experimentálních, jak ještě níže bude zdůrazněno (pokusy o přenos na jiná zvířata než opice). Téměř nám to připadá, jako by poliomyelitický virus byl v ustavičném vývoji, takže další překvapení a poznatky odlišné od dosavadních, nejsou vyloučeny. Uvážíme-li pak, že na př. virus vakcinální má široké možnosti experimentálního zachycení mezi nejrůznějšími druhy živočišnými, kdežto jeho lidská adaptační varianta, virus variolosní, jest podle většiny anglosaských, francouzských i našich

autorů schopen přímého přenosu pouze s člověka na opici, tu nemůžeme a priori zcela zavrhnuti domněnku, že i mezi tak zv. encephalomyelitidami zvířecími bude objevena taková, která je ve stejném vztahu k lidské poliomyelitidě jako vakcína k variole, a že tedy epidemiologické záhadu lidské obrny budou zúženy poznáním jiného možného zdroje infekce v přírodě, nežli je člověk. Tento případný jiný hostitel viru by spolu s lidmi tvořil epidemiologický kruh možná podobného rázu a podobné důležitosti, jako jej známe u vztekliny, psittakosy nebo endemických forem exanthematu.

Přenos viru dětské obrny na nižší zvířata, než opice, a to jednak zvířata domácí, zvláště však na malá laboratorní, není důležitý pouze pro poznání epidemiologie choroby. Částečně již pathogenesa, ještě více však terapie poliomyelitidy (ať už se jedná o chemotherapy, chemoprophylaxi nebo terapii specifickou) mají mnoho záhad zatím nerešitelných, neboť ani v nejlepších laboratořích není nikdy tolik opic, kolik by jich k tomu bylo zapotřebí. Úspěšný přenos choroby na menší laboratorní zvířata by usnadnil a učinil léčebný pokus přístupným badatelům v krajích, které oplývají poliomyelitidou, ale nikoliv většími prostředky. Zvláště těžce se tento nedostatek pocítuje při hodnocení dosud nejvíce rozšířeného therapeutického prostředku — antipoliomyelitického sera.

V souhlase s jinými autory pochybujeme značně o jeho účinnosti, neboť se serotherapy se pravděpodobně přichází relativně pozdě, t. j. ve chvíli, kdy už virus dávno vnikl do nervových buněk a zahájil zde svou ničivou činnost (Harrison a Woolpert). Souhlasíme také s názorem, že nepatrné kvantum protilátek, které se k nervovým buňkám dostane (podle Kampfa a Nungestera je to při intravenosní aplikaci sera asi $\frac{1}{330}$ vstříknuté dáv-

ky, při subdurální aplikaci kvantum o něco větší), nemůže mítí nějaký vážnější účinek na virus, již jednou fixovaný v nervové buňce. Serotherapy je však dále omezena ještě tou okolností, že ani sera rekovařských, ani sera hyperimmunních zvířat není při výbuchu rozsáhlější epidemie nikdy dost. Je sice pravda, že protilátky byly shledány nejenom u lidí, prodělavších chorobu (při čemž za nejúčinnější z rekovařských je považováno serum získané z meningeálních forem bez obrn a teprve v druhé řadě co do účinku stojí sera rekovařských s obrnami), ale zhusta i u zdravých osob z okolí nemocných, ba Gildemeisterem dokonce prokázán virulicidní účinek sera zdravých, chorobu nikdy neprodělavší žen, získaného z jejich retroplacentární krve. Tím získány nové, dosti výdatné zdroje (z nich poslední svědčí zvláště význačně o zřetelné nespecifitě antipoliomyelitických protilátek), v praxi však stále ještě nedostávající.

V novější době se konečně velmi správně stále více zdůrazňuje fakt, že protilátky v seru se dají u obrny dokázati již během několika prvých dní, kdy o imunitě nemůže býti ještě řeči, a že je tedy jejich vztah k ní velmi problematický (Kessel); i při profylaxi choroby je vliv humorální imunity naprosto nepatrny proti imunitě tkáňové. Nedivíme se tedy skepsi těch, kteří serotherapy dětské obrny vůbec odmítají a jsme ochotni si přiznat, že hlavním důvodem, proč se ještě serotherapy v tak velké míře používá, je, že nemajíce jiného, lepšího prostředku, užíváme setrvačnosti prostředku tradicí posvěceného a vžitého, neboť nemůžeme veřejnosti bráti naději v možnost léčení této hrozné choroby vůbec.

Je-li tedy serotherapy asi málo úspěšně ukončenou kapitolou léčení obrny, a chemotherapie (jež nebude podrobněji hodnocena v této práci) se ne-

dostala přes velmi slabé začátky, pokládáme za povinnost propagovati co nejvíce snahu o konečné vyřešení otázky problému imunisace aktivní, o níž jsme přesvědčeni, že může býti úspěšná.

Abychom si uvědomili, jaké jsou předpoklady aktivní imunisace, je nutno především zjistiti, jak dalece chrání před novým onemocněním choroba již jednou prodělaná. Souhlasné mínění všech světových autorů tvrdí, že nově akvirované onemocnění po chorobě klinicky patrně proběhlé dávno před tím, patří téměř mezi rarity. Je nutno ovšem pečlivě od nich oddělovati spontánní recidivu téhož onemocnění, za niž je nutno považovati každé poliomyelitické onemocnění, jež se vrátí do 3 měsíců po odběhnutí choroby prvé.

Podle Levaditiho se dostavuje po uplynutí těchto tří měsíců, v nichž jest možnost spontánní recidivy, imunita téměř absolutní, trvající $1\frac{1}{2}$ až 2 roky. Po uplynutí této doby je nová infekce možná, ale patří ke vzácnostem, takže Guigley, který se obíral touto otázkou, sehnal ve světovém písemnictví pouze 14 případů, Moore a jiní autoři ještě 5 dalších. Při epidemii v Americe v r. 1935 byly pozorovány reinfekce asi ve 2 promilech, při čemž prvá choroba musela proběhnouti nejméně před 2 roky. Právem říká Levaditi, že těchto několik případů mezi 10.000 pečlivě sledovanými poliomyelitidami na celém světě nemůže změnitni nic na poznatku, že dětská obrna patří mezi virová onemocnění, zanechávající solidní imunitu.

Otzáka imunity po překonaném onemocnění byla samozřejmě řešena také experimentálně, a tu je dlužno poukázati již na Flexnerovy práce, potvrzené později řadou jiných autorů, jež svědčí o tom, že druhé onemocnění experimentální poliomyelitidou lze vyvolati u opic jen velmi nesnadno. Jako zvláštnost byl Flexnerem nalezen kmen poliomyelitického viru, obdařený zvláštní viru-

lencí, jenž byl schopen vyvolávat druhé onemocnění u opic téměř pravidelně, bylo-li ovšem použito k vyvolání prvého onemocnění heterogenního kmene viru poliomyelitidy. Jinak usuzuje na podkladě experimentálního výzkumu Teomey, jenž tvrdí, že alespoň část tak zvaných recidív u poliomyelitidy je vyvolána nespecifickým vlivem nejrůznějších jiných infekcí, které ničí čerstvě regenerovaná nervová vlákna, čímž dochází znova k vzplanutí projevů, upomínajících na poliomyelitidu, jichž etiologický a pathologicko-anatomický substrát je však naprosto jiný. Tak se mu podařilo u 5 z 13 opic s obrnami a kontrakturami po prodělané těžké poliomyelitidě intranasální instalaci kultur, získaných ze spalničkových pacientů, vyvolati nové těžké obrny.

V celku však zůstává i experimentálně neotřesený fakt, že onemocnění jednou prodělané chrání do značné míry proti onemocnění druhému, přičemž, jak se zdá, těžká choroba imunisuje daleko dokonaleji, nežli onemocnění lehké.

Úspěšná možnost profylaktické aktivní imunizace a zejména jejího rozšíření po celém světě má ovšem ještě jeden nutný předpoklad, t. j. antigenní shodu všech virů poliomyelitických na celé zeměkouli. Tato otázka zdála se býti Levaditimu do r. 1938 a i Gildemeisterovi do r. 1939 rozrešena celkem jednoznačně tím, že předpokládali všude na světě viry obrny shodných antigenních vlastností asi tak, jak to platí až dodnes pro viry vzteklinové. Trask. James a spolupracovníci našli však při epidemii v r. 1939 virus, který byl podle křížené imunity a neutralisace serem sice antigenně shodný s jinými kmeny isolovanými při téže epidemii, ale zřetelně rozdílný od kmenů z epidemie v r. 1931 a 1937. Citované pokusy Flexnerovy a možnosti recidiv u opic, které jsou nejúspěšnější při použití heterogenního kmene, svědčí

rovněž pro částečnou antigenní diferenci virů poliomyelitických. Konečně pak poměrně novodobé pokusy Stimpertovy a Kesselovy ukázaly velmi zřetelně, že různé kmeny dětské obrny se liší od sebe navzájem nejenom virulencí, nýbrž také chováním imunologickým. Potvrdí-li se ve větší míře tyto novější údaje, lze mít i zato, že situace pro poliomyelitické viry všude na světě bude podobná, jako byla již s určitostí prokázána pro viry chřipkové. I poliomyelitický virus se zdá mít komplexní skladbu, při čemž proveniencí různé, ale imunobiologicky podobné kmeny mohou mít z celého známého antigenního spektra poliomyelidy pouze několik frakcí shodných a ostatní odlišné. Je samozřejmo, že toto chování virů poliomyelitických bude značně komplikovat otázku aktivní imunisace, která má, bohužel, i z jiných důvodů velmi daleko do úspěšného rozřešení, jak o tom svědčí malý úspěch dosud použitých metod, ať již v experimentu na zvířeti nebo v praxi lidské.

Jako vakcina byl nejdříve zkoušen virus plně usmrcený (teplem); takováto očkovací látka se však ukázala být naprostě inaktivní. Platí tedy i pro poliomyelidu totéž, co pro mnohé jiné filtrovatelné viry, že totiž virus mrtvý ztrácí antigenní schopnosti. Při tom je jistě důležitá i ta okolnost, že v suspensi inaktivované hmoty zahváceného centrálního nervstva jest poměrně velmi málo viru, srovnáno s ostatní nespecifickou míšní substancí, takže není zcela vyloučeno, že by virus zkonzentrováný buď střídavou adsorpce a elucí nebo získaný elektroforesou v čisté formě mohl i mrtvý přece jen vyvolávat jakýsi účinek.

V další řadě pokusů byl virus pouze mitigován, a to podle Shaughnessyho, Harmona a Gordona temperaturou něco nad 43° C, ale ani tento virus neměl žádného imunisačního účinku. Metoda, jež

je obdobou původní methody Pasteurovy, t. j. zezslabení viru vysoušením nad louhem draselným, ač se zdála dávati slibné výsledky, nemohla býti rozšířena v praksi, neboť tu a tam některé opice již po očkovacím procesu onemocněly obrnami.

Přidání kys. karbolové k viru, postupné ředění viru, případně virus precipitovaný taninem, jsou methody stejně nebezpečné, jako předcházející. Virus, vydaný ničivému účinku světla po sensibilisaci methylenovou modří (Lépine), nebo virus adsorbovaný na hydroxyd hliníku dávají výsledky o něco lepší nežli předchozí, ale daleko nikoliv tak uspokojující, aby jich mohlo býti použito v praksi lidské. Dobrou methodou se zdálo býti očkování viru maximálně adaptovaného na opici, který po dlouhých pasážích asi trvale zmírnil svoji původní virulenci pro člověka. Zvířata podkožně tímto virem očkovaná (Flexner a Amos) snášela bez poškození intracerebrální smrtelné dávky téhož viru. Lze však vážně pochybovat o tom, že by tento způsob imunisace (ostatně značně nebezpečný) chránil člověka před vysoce virulentním a čerstvým virem poliomyelitickým.

Mnoho nadějí vzbudila formolisovaná vakcina. Od počátečních pokusů Römerových, Abramsonových a Gerberových byl učiněn velký pokrok pracemi Brodieho, který přidává k 10% suspensi viru 1—3 promile formalinu a ponechává směs buď 16 hodin v thermostatu při 37° C, nebo několik dní v ledničce. Vakcina je pro opice celkem neškodná, zvedne zřetelně titr protilátek v jejich seru, ale jen poměrně malé procento z nich vzdoruje vážné infekci cestou intracerebrální nebo intranasální. U dětí očkovaných — ohodnoceno statisticky během epidemie — bylo lze pozorovat zřetelně menší morbiditu proti neočkované skupině; na neprospeč celé věci se však v některých případech i mezi očkovanými dodatečně objevilo několik pří-

padů lehce probíhající poliomyletidy, o nichž nebylo lze s určitostí zjistiti, zda jsou důsledkem spontánní infekce nebo očkování.

Na největším lidském materiálu byla vyzkoušena vakcina Kolmerova, při níž asi 4% suspense viru jest smíšená s 1% ricinolejanem sodným, načež směs zůstane 1 měsíc v ledničce. Vakcina je částečně virulentní při očkování intracerebrálním, ale má býti zcela neškodná při použití intradermálním (z imunologických důvodů je nutno prý dáti přednost tomuto způsobu aplikace před aplikací podkožní). S Kolmerovou vakcinou, připravenou podle originálních údajů v Pasteurově ústavě z materiálu nejrůznější provenience, vykonal Levaditi se spolupracovníky řadu experimentů na opicích. V těchto pokusech bylo nesporně zjištěno, že vakcina je nebezpečná, neboť řada opic byla infikována, a to začasté smrtelně. Vakcinu, připravenou Kolmerem samotným, snášela zvířata bez škody, ale vakcina také nevyvolala žádnou imunitu. Přes tyto varovné hlasy bylo jí během r. 1937 očkováno ve Spojených státech více než 10.000 lidí, z nichž podle Leakeho pozorování celkem 12 onemocnělo obrnou, o jejíž provenienci podle inkubační doby a také podle toho, že obrny většinou začaly na oné končetině, do níž bylo očkováno (vakcina aplikována v době mimo větší epidemie), nemohlo býti pochyb. Kolmer sám podle Levaditiho ani tak příliš nespolehlá na inaktivaci účinek ricinolejanu, jako spíše na způsob aplikace (relativní neškodnost injekcí sub- a intrakutálních) a hlavně na neprokázanou domněnkou, že jeho virus měl ztratiti afinitu k člověku, byv adaptován dlouhými pasážemi na opice.

Spíše jen jako zajímavé pokusy na opicích bez praktického vyzkoušení na člověku je nutno zaznamenati také methodu intradermální aplikace živého a virulentního viru Aycockem a Kaganem,

nebo simultánní vakcinace směsí sera (buď lidského nebo opičího) a jím neutralisovaného viru. Tato směs aplikována nejrůznějšími cestami, za nejlepší shledána opět injekce intradermální a podkožní. Prvá metoda je tak nebezpečná, že jistě nikdy nebude aplikována člověku. Druhou metodou bylo u opic docíleno výsledků uspokojujících, ovšem za podmínek, že bylo použito dostatečně silného viru a že nebyl serem přeneutralisován.

To jsou přibližně všechny dosavadní pokusy o docílení aktivní imunity při poliomyelitidě. Žádný z nich není imunisačními výsledky tak úspěšný, aby se vyplatilo velmi značné risiko, se kterým je doposud každé očkování, ať už kteroukoliv z těchto metod, spojeno. Všechny tyto obě tavé pokusy nám přinesly alespoň dva důležité poznatky, které platí ovšem pouze pro virus, s nímž zatím experimentováno, t. j. opičí:

1. Imunisovati lze pouze virem dostatečně aktivním, který, má-li býti očkování úspěšné, nelze zaváditi značného nebezpečí pro člověka.

2. Je-li virus příliš mitigován, takže je jeho aplikace bez nebezpečí, ztrácí schopnost vyvolati solidní imunitu proti vážnější infekci přirozenou cestou.

Je však ještě jedna zkušenost, které nás naučily výsledky tohoto rozsáhlého experimentování a kterou si, jak se zdá, většina autorů dosti neuvědomuje: Opičí virus (ačkoliv některé jeho kmeny, a to zejména kmeny vysoce virulentní, mohou býti proměněny v jakýsi druh fixního viru opičího, viz Pettit) je pravděpodobně člověku příliš blízký, než aby vůbec kdy mohl býti proměněn na vakcinvu, která při zachování plných antigenních vlastností by byla pro člověka bez nebezpečí. Zdá se nám, že by bylo ideálem, kdybychom se mohli úplně přiblížiti Pasteurovu způsobu aktivní imunisace proti vzteklině. Ani zde není pomyšlení na výrobu

vakciny z psího centrálního nervstva a teprve adaptace viru na zvíře fylogeneticky dostatečně vzdálené, t. j. na králíka, přinesla úspěch. Kdyby se podařilo přenést dětskou obrnu na některé z menších laboratorních zvířat a udržeti ji na něm v pravidelné pasáži, mohlo by se snad již tím samým docílit takové změny infekčního agens dětské obrny, že by očkovací látka, z těchto zvířat připravená (podobně jako virus fix vzteklinový), mohla sloužit bez příliš násilného dodatečného procesu mitigačního a tedy bez význačné ztráty jeho antigenních vlastností, jako úspěšná očkovací látka pro člověka.

V tom také (vedle studia epidemiologického, dalšího průzkumu pathogenesy a eventuelní titrace sera) vidíme nejhlubší smysl toho, proč je stále nutno přes dosavadní neúspěchy pátrati po případných jiných hostitelích viru v přírodě mimo člověka, a pracovati až do konečného úspěchu na otázce přenosu poliomyelitického viru na jiná laboratorní zvířata, než na opice.

První takový experiment byl učiněn Krausem a Meinickeem a po nich Dahmem v prvém desetiletí tohoto století; byli první, jimž se prý podařilo přenést poliomyelitu intracerebrální inokulací, výjimečně také intraperitoneálně, na králíka. Ten-to nález byl tím podivnější, že přenos se zdařil nejenom lidskou substancí míšní, nýbrž také likvorem cerebrospinálním a dokonce i krví a různými orgány zemřelého člověka. Zvířata zašla za paralytických symptomů a jejich centrální nervový systém jevil neklamné známky poliomyelity. Aby byl zaručen úspěch pokusů, bylo nutno použít zvláštní rasy králiků, ne větších nežli 1 kg, a vstřiknouti velkou dávku materiálu. Podobných výsledků jako jmenovaní autoři dosáhl později ještě Lenz a Huntemüller a dále Benecke. Všichni ostatní autoři, mezi nimi pracovníci v dětské

obrně velmi zkušení jako Flexner a Lewis, Levaditi a Leindsteiner, dále Roemer mohli zaznamenati pouze naprosto negativní výsledky podobných přenosů, a to nejenom při použití králíka jako experimentálního zvířete, nýbrž i po přenosu na koně, hovězí dobytek, vepře, drůbež, morče, krysu a kočku. Thompson a dále Hamon, Shaughnessy a Gordon, aby zvýšili penetrační schopnosti poliomielitického viru do buněk centrálního nervstva malých experimentálních zvířat, zkusili použít synergistického účinku viru vakcinálního, a to naprosto bez úspěchu.

Brodie zkoušel snížiti resistenci myší blokádou retikuloendothelu thoriumdioxydem, ale bez účinku. Rovněž hypofysektomie u krys nepřispěla k uchycení poliomielitického viru v pokusech téhož autora. Woolpert a Harrison zkoušeli učiniti morčata, krysy a myši hypovitaminosou B a C receptivní na experimentálni poliomielitickou infekci, rovněž bez zřetelného účinku. Kolmer, Rule a Werner ozařovali morčata, králiky a dokonce i fretky roentgenovými paprsky, aby tímto způsobem umožnili vniknutí poliomielitického viru do jejich orgánů a tím i vyvolání choroby; celá tato velká řada pokusů selhala, jako všechny předcházející. Podivně se vyjímá v rámci těchto kritických pokusů sdělení Cobanovo, kterému se prý podařilo přenést virus obrny na četná zvířata, zejména na jehňata, králiky, psy a holuby, a to dokonce již slinami psa, jenž byl v blízkém kontaktu s dvěma dětmi, nemocnými obrnou. Autor tvrdí, že psi mohou vůbec hrát význačnou roli v přenosu poliomielitidy. Z práce je patrno, že autor usuzoval na obrnu podle zevních symptomů a nepodrobil svoje výsledky podrobnějšímu rozboru, nelze tedy jeho nálezy hodnotiti vůbec vážně, již také se zřetellem na použitý materiál.

Naprosto jinak je nutno hodnotiti pokusy Nun-

gesterovy, který je snad prvým autorem (ani Krause, zkraje citovaného, nevyjímaje), jenž, jak se zdá, měl skutečné úspěchy v přenosu poliomyelitického viru, a to na myších, jímž současně s vírem intraperitoneálně inokulován mucin. Autorovi, jak tvrdí, se podařila řada pasáží, při čemž zvířata umírala za příznaků paralysy. Co nás na tom nejvíce zajímalo, je autorovo tvrzení, že při použití velmi virulentního viru se podařily pokusy i bez jakéhokoliv zatížení zvířecího organismu.

Refrakternost většiny experimentálních zvířat, experimentálně velmi pečlivě ověřená, nebrání samozřejmě tomu, aby virus dětské obrny, vstřiknut do jejich centrálního nervstva, nemohl tam býti krátký čas konservován. Tato doba přežití viru na př. v králičím mozku kolísá přibližně mezi 2—5 dny.

Jako souhrn všech těchto více méně neúspěšných pokusů uvádí Levaditi ve svém kompendiu o dětské obrně z r. 1938, že až do dnešního dne lze považovati jedině opici za zvíře citlivé na poliomyelitický virus; zvláště nevhodným zvířetem pak že je a zůstane králík. K týmž konklusím dochází Gildemeister ve své souborné, o rok pozdější práci.

Část II.:

Vlastní pokusy o přenos poliomyelitického viru z člověka na fretku.

Presto jsme se přece jen odhodlali k novému pokusu o přenos, a to na species, které v bádání o poliomyelitidě bylo až dosud použito jen zcela výjimečně, která se však naproti tomu osvědčila při výzkumu chřipkového viru.

Příležitost k těmto pokusům se nám naskytla během těžké epidemie dětské obrny, rádící v Čechách během letních a podzimních měsíců r. 1939.

V době, kdy byla epidemie na výši, počaly se vyskytovat i u dospělých osob smrtelné případy této choroby, probíhající buď jako ascendentní paralysa Landryho typu, nebo jako rychle smrtici bulbární forma obrny. Právem jsme mohli míti za to, že právě tyto případy byly vyvolány virem maximálně virulentním, tím spíše, že epidemie v dobách, kdy se vyskytovaly (září a začátkem října) právě vyvrcholila. Laskavostí doc. dr. Škorpila z ústavu prof. dr. Šikla, prosektora-primáře dr. Fingerlanda a prosektora-primáře dr. Huba, dostalo se nám několika částí míchů z těchto rychle smrtících případů. Právě v této době jsme skončili větší experimentální práci o chřipkovém viru, z níž nám zbyla ještě řada zdravých fretek, i napadlo nás zkousit přenos také na tato zvířata, která se ukázala být tak kuriosně citlivými na chřipku, na niž téměř všechna zvířata primárně rovněž jsou necitlivá. V pokusech na fretkách bylo pokračováno i přes technické (t. j. operační) nesnáze a přes to, že jsme se dočtli, jak v pokusech Kolmerových, Ruleových a Wernerových i těchto zvířat bylo použito bez pozitivního výsledku.

Několik případů dětských poliomyelitid bylo zpracováno již koncem měsíce září, a to intracerebrálním vstříknutím fretkám. Jelikož trepanace u fretky pro jejich velmi tvrdou lebku je výkon déle trvající a pracnější, nežli trepanace u králíka a dokonce i u malé opice, byli jsme nutenci prováděti celý výkon v lehké markose. Současně byl týž materiál vstříknut králíkovi, morčeti a bilé myšce. Po operaci byla fretkám měřena teplota celý týden a zvířata pečlivě pozorována v průběhu dalších asi 2 měsíců tak, aby ani eventuelní pozdní symptomy paretické nebo paralytické nemohly uniknouti. Použitá suspense mích byla zhruba asi 15 až 20%. Tři takto zpracované případy dětské obrny nevyvolaly u naočko-

vaných zvířat vůbec žádných zřetelných symptomů. U fretek den po operaci (bylo-li operováno ráno, ještě týž den k večeru) bylo pozorováno lehké zvýšení teploty (měřeno v rektu), které jsme znali již dříve z pokusů s těmito zvířaty jakožto důsledek narkosy, eventuelně operačního šoku, ale po dalších 12 hodinách se teplota vrátila ad normam a zvíře již zůstalo zdrávo. Teplota ve všech těchto případech vystoupila pravidelně z normálních $38^{\circ}4$ — $38^{\circ}6$ pouze na $39^{\circ}2^{\circ}$. Čtvrtý pokus byl založen 4. X. 1939. Šlo o míchu dospělého pacienta, který zemřel asi za 48 hodin od propuknutí příznaků nemoci ze symptomu bulbární paralysy. Mrtvola byla pitvána doc. Škorpilem, který vyšetřoval míchu histologicky, shledal typický nález poliomylitický a předal nám laskavě zbytek míchy ve sterilním glycerinu k provedení experimentu.

Suspense z míchy byla zhotovena po 48 hod. pobytu v glycerinu za -5° C. Byla vyzkoušena na sterilitu, a to za podmínek aerobních a anaerobních, při čemž nevykultivovány žádné zárodky pathogenní a pouze po pomnožení vyrostlo několik kolonií bílého mikrokoka neproteolytického a nekoagulujícího plasma. Této látky vstřiknuto fretce č. I. asi 0'3 ccm subdurálně v místech frontálního laloku levé hemisféry mozkové. Totéž kvantum vstřiknuto mladému králíkovi i morčeti po trepanaci a po 0'1 dvěma bílým myškám intracerebrálně. Myšky, morče a králík byly pozorovány až do konce prosince 1939, kdy vyřazeny z pokusu. Všechna tato zvířata zůstala naprosto bez symptomů. U fretky pozorováno rychle pominuvší zvýšení pooperační teploty, načež se teplota vrátila k normě (na $38^{\circ}5^{\circ}$), ale třetího dne k večeru stoupla znovu rektální temperatura na $39^{\circ}1^{\circ}$, ráno druhého dne byla $39^{\circ}2$ a v mezích mezi 39 a $39^{\circ}4$ se trvala celý den. Podle našich zkušeností nelze tyto temperatury již považovati za normál, ale ovšem

také nikoliv za horečku. Jsou však zřetelně symptomem neurčitého chorobného stavu tohoto velmi citlivého zvířete. Pátý den při vyndání fretky z klece jsme naprosto bezpečně pozorovali počínající slabost zadních končetin. Současně fretka jevila nechuť k žrádlu a zřetelně hubla, zejména na zadní polovině těla. Slabost zadních končetin se stále stupňovala, až sedmého a osmého dne dosáhla maxima. Zvíře se těžko dalo pohnouti k chůzi a když k ní bylo donuceno, běželo velmi nejistě, zřetelně se potácelo na zadních končetinách a jeho pohyby byly silně paretického rázu, takže to vypadalo, jako by mělo zvíře svázáno zadní končetiny neviditelným poutem. Současně zvíře ještě více zhulilo, svaly hýždové i svaly zadních končetin byly měkké, bez tonusu, a celá zadní půlka těla již na první pohled se nápadně odrážela svými zřetelně menšími rozměry, které upomínaly na svalovou atrofii, od půlky přední. Devátým dnem od operace počaly se paretické příznaky pozvolna zlepšovat, aby se přibližně za dalších 10 dnů upravily téměř na normál. Atrofický stav zadní poloviny těla, patrný již podle inspekce a zjistitelný také hmatem, trval ještě téměř 3 neděle, po kteréžto době zvíře zvláště vydatně živené nabyla stejného vzhledu jako před operací.

Druhý pokus byl založen dne 11. X. 1939 na fretce č. II., a to z míchy, přenechané nám laskavě primářem dr. Fingerlandem, rovněž z případu bulbární paralysy dospělého člověka, rychle probíhající k smrtelnému zakončení a jím také histologicky ověřeném. 13. X. vzestup temperatury z normálu na 39°2, načež temperatura kolísá mezi 39 a 39°4 až do 6. dne po operaci, kdy se dostavily zřetelné paresy zadních končetin, s nápadnou atrofií celé zadní části těla, stejně jako u případu prvého. Paresa zadních končetin se rychle horšila, až osmého dne po inokulaci bylo zvíře schopno

učiniti již pouze několik kroků, načež upadlo, a když se s námahou zvedlo, plazilo se, jsouc donuceno k pohybu, pouze po předních končetinách, při čemž zadní táhlo za sebou. V tomto stavu byla fretka filmována, což bylo spojeno se značnou námahou pro toto zvíře, jelikož bylo během několika hodin opětovně násilně donucováno k pohybům. Snad toto násilné přepětí sil bylo příčinou toho, že devátý den choroby začínaly býti i přední končetiny paretické a desátý den zvíře zašlo za příznaků úplné paralysy.

Při sekci nenalezeny žádné nápadnější změny v orgánech, pouze lehká hypostasá v plicích, vymizení tuku z podkožního vaziva, částečně také z peritoneální dutiny a zřetelně atrofické svalstvo hýžďové a zadních končetin. Kultivace ze srdce, vnitřních orgánů a centrálního nervstva negativní. Tento nález tedy nikterak nevysvětuje typické příznaky a smrt zvířete. Histologického zpracování se podjal prof. Šikl, který učinil tento nález:

Lumbální mīcha: Ganglionové buňky předních rohů jeví degenerativní změny různého stupně. Zejména silně je postižena skupina velkých motorických buněk v laterálním oddílu předních rohů. Buňky jsou zduřelé, zaobleného tvaru, dendrity jsou však zachovány. Jádra mají normální vzhled, jsou však často vysunuta k periferii. Nejvýznačnější změny jeví cytochromatin. Uspořádání v tigroidní hrudky je jen na některých buňkách vyznačeno, i zde však jsou hrudky nepravidelné, poměrně řidce uložené. V četných buňkách jsou hrudky zachovány jen v periferní části, většinou jsou však zcela vymizelé a místo nich je plasma poprášeno jemnými, nestejně velikými, slabě se barvícími granuly. Kolem takto změněných buněk jest opticky prázdný prostor, obklopující buňku srpkovitě s jedné strany nebo též po celém jejím obvodu, jde zřejmě o pericelulární edém. Rovněž perivaskulární štěrbiny jsou místy znatelně rozšířeny. Malé ganglionové buňky v ostatních částech šedé hmoty jeví namnoze též naznačené změny podobného rázu, ale daleko ne tak výrazné. Buničná reakce není nikde vyznačena. Počet jader makroglie a oligodendroglie není znatelně zmnožen. Ani mikroglia se nezdá

býti mobilisována, ačkoliv bez speciální impregnace, kterou nelze provést na tkáni fixované alkoholem, je lehký stupeň aktivace mikroglie nesnadno zjistitelný. V perivaskulárních prostorách a v meningách jsou zcela ojedinělé lymfocysty.

Krční mícha: Rozpad cytochromatinu a pericelulární edém je naznačen na některých motorických buňkách předních rohů; v celku jsou však změny daleko méně zřetelné než v lumbální míše.

Prodlooužená mícha: V ganglionových buňkách jader VII. a XII. n. tygroid málo výrazný, nepravidelný, namnoze zachován jen na periferii.

Mozek: V místě trepanace je arachnoidea změněna v granulační tkáň, obsahující drobné úlomky cizorodého materiálu; postižený okrsek má asi $1\frac{1}{2}$ mm v průměru. Také na jiných místech povrchu jsou ojediněle rozptýlena podobná drobnější ložiska cizorodého materiálu s nepatrnou zánětlivou reakcí arachnoidey, spočívající v proliferaci povrchové výstelky a v infiltraci několika lymfocyty.

Třetí mícha pocházela z případu Landryho paralysy a dostalo se nám jí laskavostí primáře dr. Huba z pardubické nemocnice; byla rovněž histologicky ověřena, s typickým nálezem. Byla zpracována stejně jako obě dvě předchozí, t. j. vyzkoušena na sterilitu i inokulována králíkovi, morčeti, myškám a fretce č. III. 14. X. 1939. K tomuto pokusu nebylo použito fretky albinotické jako v předchozích případech, nýbrž fretky tchořovité, které jsou běžně považovány za resistentnější, a to mladého, zdravého a velmi dobře vyspělého samce. U tohoto zvířete bylo zachyceno lehké zvýšení teploty až pátý den po operaci a k večeru týž den začaly první lehké paretické symptomy. Sestého dne se symptomy vystupňovaly takovou měrou, že mohla býti filmována současně s fretkou z předcházejícího pokusu a za stejných symptomů jako předchozí zvíře do 48 hodin po tomto výkonu zášla, t. j. celkem za 8 dní od operace. Symptomy několik posledních hodin před smrtí, t. j. celkový vzhled zvířete a zejména nápadné zhubnutí zadní

části těla, dále symptomy sekční na vnitřních orgánech byly zcela stejné, jako u zvířete předchozího. Vnitřní orgány i centrální nervstvo se ukázaly býti prosty jakýchkoliv pathogenních bakterií. Histologický nález byl následující:

Lumbální mīcha: Ganglionové buňky předních rohů, a to opět hlavně laterální skupina jejich, jeví analogické změny, jako byly popsány svrchu, ale ještě vyslovenější. Tygroidní hrudky úplně vymizely; plasma obsahuje jen drobné, nepravidelné, zčásti tyčinkovité granulace. Pericelulární edem je silně vyznačen a kontury buněk na straně obklopené opticky prázdným prostorem jsou namnoze nepřesné, neurčité, jakoby se zde plasma rozplývalo v tekutině edému. Jádra ganglionových buněk, zpravidla na periferii buňky zatlačená, jsou zčásti puchýřkovitá, s nepatrnnou bledou kresbou chromatinovou, zčásti jsou však zřetelně svraštělá, blána jaderná nepravidelně zřasena a obsah tmavěji zbarven difusně, takže lze mluvit o pyknose.

Perivaskulární štěrbiny v předních rozích jsou rozšířeny. V šedé hmotě mezi ganglionovými buňkami a též v přilehlé bílé hmotě je jistý počet tyčinkovitých tmavých jader, jež se zdají patřit k mobilisované mikroglii; také jádra oligodendroglioového typu jsou místy v sousedství ganglionových buněk poněkud zmnožena. V celku však je buničná reakce nepatrnná a perivaskulární infiltrace chybí zcela.

Krční mīcha: Analogické změny na ojedinělých g. buňkách předních rohů; v celku je však nález daleko méně výrazný.

Prodlevužená mīcha: Na g. b. kresba tygroidu většinou málo určitá a poněkud nepravidelná. Vyšetřovaný segment pochází z výše zkřížení pyramid a větší komplexy motorických buněk zde nejsou.

Mozek: Ojedinělá, nepatrnná ložiska granulační tkáně na povrchu arachnoidey. Jinak nic pozoruhodného.

Míchy a části mozku z fretky bílé i tchořovité, pokud nebyly zužitkovány v histologickém zpracování, uschovány v 50% glycerinu při -5° . K dalším experimentům bylo užito zprvu míchy (hlavně z lumbální části) ze zašlé fretky tchořovité (č. III.), jelikož nám jí zbylo více k disposici.

Z míchy zhotovena suspense ve fysiologickém roztoku stejně jako před tím z míchy lidské, vyzkoušena na sterilitu a vstřiknuta obyčejným laboratorním zvířatům jako v pokusech předešlých, intracerebrálně a mimo to 2 fretkám, a to jedné bílé č. IV., druhé opět tchořovité č. V. (surozenec ze stejného vrhu jako fretka č. III.). U fretky bílé (č. IV.) se operativní zákrok dobře nepodařil, jelikož bylo trepanováno na nevhodném místě a větší část injikované tekutiny vytekla zpět. I u tohoto zvířete vystoupila však teplota třetí den nad 39° a dvanáctého dne od okamžiku operace se vrátila k normálu. Zvíře onemocnělo jen málo charakteristicky asi za podobných symptomů jako prvé pokusné zvíře s úspěchem očkované, t. j. fretka č. I., při čemž však byly více vyznačeny paresy předních končetin, nežli zadních. U tohoto zvířete byly paresy pouze přechodného rázu, nebyly spojeny s žádnou nápadnější svalovou atrofií a kolem 12. dne, tedy současně s poklesem teploty, bylo možno zvíře považovati již za úplně zdravé.

U tchořovité fretky č. V. projevily se prvé známky onemocnění jako obvykle kolem třetího dne lehkým vzestupem teploty, ale prvé příznaky parasy se ukázaly po zřetelně delší inkubační době, t. j. až začátkem devátého dne, načež se však rychle stupňovaly, takže koncem jedenáctého dne od začátku operace zvíře zašlo stejně jako 2 zvířata předcházející.

Histologicky z fretky č. V. bylo zjištěno:

Z l u m b á l n í m í c h y: Zůstal pro mikroskopické vyšetření jen konus. Typické velké motorické buňky zde nejsou, změny jsou nevýrazné a pro značné mechanické poškození tkáně velmi neurčité.

V další částečce, jež byla označena jako krční mícha a jejíž topografie se jeví dosti nejistou, jsou velmi nápadné změny na g. b. předních rohů, podobného rázu jako v lumbální míše obou předešlých zvířat a ještě in-

tensivnější. Chromatická substance plasmatická je v těchto buňkách úplně rozprášena v drobná nepravidelná, ponejvíce tyčinkovitá granula. Pericelulární edém je velmi silně vyznačen, ohraničení buněk nepřesné, jádra namnoze pyknotická.

Zbytek centrálního nervstva uchován v glycerinu a použito ho k další inokulaci, tentokráté fretce albinotické č. VI. a laboratorním hlodavcům jako před tím. Trepanace albinotické fretky byla vykonána 14. XI. 1939, ale zvíře na rozdíl od předcházející pasáže mimo lehké postoperační zdvižení teploty neprojevilo vůbec žádných symptomů onemocnění, které bychom byli mohli pozorovati, a zůstalo i během dalších dvou měsíců zcela zdrávo. Laboratorní hlodavci ze všech těchto pokusů byli sledováni po dobu téměř 3 měsíců (u králíků i déle), aniž by u kteréhokoliv mohly být prokázány takové příznaky onemocnění, které by se podobaly alespoň přibližně příznakům fretek.

Abychom si ujistili, že u fretek jakožto velmi citlivých zvířat nejde snad o nějaký nespecifický vliv z podráždění cizorodou substancí míšní, vstřikli jsme 1 fretce č. VII. intracerebrálně hustou suspensi normální lidské míchy za stejných kautel, jako v předchozích pokusech míchu poliomylitickou. Zvíře zůstalo naprosto zdrávo.

Jiná možnost, na kterou jsme byli nuceni myslet, je ta, že fretky, chované u nás v ústavě, mohly být latentně infikovány svým vlastním encephalomyelitickým virem. Tento virus pak mohl být aktivován operativním zákrokem na mozku a zejména vstříknutím míšní substance ať už lidské nebo fretčí. Tuto možnost bylo nutno vyloučit, o což jsme se pokusili tím, že jsme obětovali na zabití 1 zdravou tchořovitou fretku z téhož vrhu jako byly fretky č. III. a č. V. Zvíře bylo, jako jeho sourozenci, bez jakéhokoliv příznaku onemocnění a ve velmi dobrém tělesném stavu. Pokládáme totiž za velmi pravděpodobné, že kdyby

latentní infekce encephalomyelitická v té době u našich fretek skutečně existovala, musela by parazitovat v centrálním nervstvu především všech zvířat téhož vrhu, která ještě k tomu společně žila v téže kleci po dobu několika měsíců, a to od odstavení až po okamžik pokusu. Centrální nervstvo tohoto zabitého zvířete nejen že nejelo žádných histologických změn, nýbrž také na očkování jiné fretce (č. VIII.) nevyvolalo žádných symptomů nervového onemocnění.

Rovněž pozorováním všech ostatních fretek během celých tří let, co jsou chovány v našem ústavu, nikdy před tím, ani po tom jsme nezjistili u žádného zvířete symptomy choroby nebo podezřelé úmrtí, o němž bychom mohli souditi, že bylo vyvoláno epizootickou encephalitidou těchto zvířat.

Je tedy těžko věřit, že by tato epizootie mohla probíhat tak latentně, že by ani u jednoho z přibližně 40 zvířat nevyvolala nikdy zřetelných příznaků choroby. Dále, jak jsme již uvedli, se nám nepodařilo fretčí encephalomyelitidu prokázati experimentálně ani z centrálního nervstva zvířete ze stejného vrhu.

Bylo by ovšem možné uvažovati také o tom, že by encephalomyelitický virus, vyvolávající onemocnění u fretek, mohl býti náhodně přítomen také v lidských míchách, třeba i poliomyelitických, a to jako virus latentní, pouze krátkou dobu přežívající. Ačkoliv jest tato pravděpodobnost velmi nepatrná, je možno na ni mysleti. Je však téměř nemožno připustit, že by takováto latentní infekce, zcela náhodná, mohla současně s poliomyelitidou postihmouti 3 lidská individua v době krátce po sobě následující a na třech místech velmi od sebe vzdálených.

Konečně veliká většina zvířecích encephalomyelitid je přenosná také na menší laboratorní zvířata, a to zejména na králiky, případně mor-

čata, nebo myši. Nenašli jsme sice v literatuře popsánu žádnou encephalomyelitu fretčí, ale je velmi pravděpodobné, že existuje a stejně tak je možno, že (jako většina encephalomyelitid koňských) by byla přenosná na laboratorní hlodavce. V každém případě však by musela být schopna seriového přenosu u fretek s typickými zánětlivými změnami v jejich centrálním nervstvu. To vše se nám v celé řadě přesných pokusů nepodařilo prokázati a v důsledku toho myslíme, že jsme plně oprávněni usuzovat, že symptomy popsané u 4 fretek i histologický nález v jejich centrálním nervstvu neměly nic společného s přirozeným onemocněním těchto zvířat a že také nebyly vyvolány nespecifickým podrážděním jejich centrálního nervstva.

Mezi tím již síla epidemie ochabovala, nedocházelo již k úmrtí dospělých osob za těžkých symptomů a krátkodobého průběhu nemoci, takže bylo čím dále těžší si opatřiti nový, pitvou získaný materiál. Celkem jsme koncem října a začátkem listopadu dostali na vyšetření ještě 2 míchky dětské, které byly zpracovány jako všechn předchozí materiál, ale bez jakéhokoliv pozitivního výsledku.

Bylo naším ideálem pokračovati ve svých experimentech studiem zkřížené imunity na opicích, t. j. tak, aby bylo lze dokázati, do jaké míry bylo námi pozorované onemocnění fretek imunologicky příbuzné s opičím virem poliomyelitickým. Bohužel jsme získali v této době pouze jediné zvíře, a to vyspělého samce druhu *Maccacus rhesus* jako dar z naší zoologické zahrady. Opice byla inokulována 27. XI. 1939 intracerebrálně suspensí míšní tkáně skládající se převážně z míchky fretky č. III., z menší části také z míchky fretky č. II. Celkové vystříknuté kvantum činilo asi 0,4, injekce byla provedena do krajiny pravé frontální hemisféry.

K našemu podivení opice zůstala prosta jakýchkoliv symptomů poliomyelity, po polovině prosince však začala hubnout, počínala býti skleslá, byla smutná a silně kašlala. Jak se později ukázalo, onemocněla tuberkulosou, která také byla z velké části příčinou její smrti. Když se do 4. ledna 1940 nedostavily žádné symptomy, rozhodli jsme se zkusiti, jak bude zvíře reagovati na inokulaci virulentního materiálu z poliomyelity lidské. V polovině prosince se nám podařilo získati ještě jednu míchu z Landryho paralysy, konservovanou v glycerinu, která z interních důvodů nemohla býti již zpracována na fretkách. Husté, alespoň 20% suspense této míchy bylo použito v kvantu asi $\frac{1}{2}$ ccm k nové intracerebrální inokulaci do levé hemisféry zvířete.

Přes to, že bylo použito více než dostatečného kvanta infekčního materiálu, který pocházel z těžkého případu lidského, opice 20 dní po inokulaci nejevila nejmenších symptomů paralytického onemocnění (průměrná inkubační doba při naočkování větším kvantem lidského materiálu obnáší 7—12 dní, pouze při použití materiálu velmi zředěného nebo filtrovaného viru 18 až i přes 20 dní). 22. den po inokulaci dostalo zvíře, které tuto dobu bylo již velmi těžce sešlé následkem tuberkulosy, první paretické symptomy od zadních končetin, načež symptomy pokračovaly na končetiny přední, aniž by došlo k úplným paralysám, až konečně 25. den od inokulace zvíře zašlo za příznaků velmi těžkého oslabení a úpadku tělesných sil, což vše na první pohled rovněž mohlo imponovati jako paralysa, ačkoliv při podrobnějším vyšetření bylo shledáno, že při přímém podráždění bylo zvíře schopno reagovati vsemi končetinami, i když velmi nesnadno.

Při sekci byla nalezena generalisovaná tuberkulosa všech orgánů, zejména plic a jater, přičemž plíce byly

úplně rozpadlé caseosní pneumonii. Na první pohled byla tedy příčinou smrti tuberkulosa. Při histologickém rozboru mích bylo však shledáno, že je sídlem typických poliomyelitických změn. Je ovšem těžko říci, zda by poliomyelitida sama o sobě usmrtila toto zvíře, nebo zda by snad vedla k jeho smrti ještě mnohem později, kdyby nebylo současného těžkého tuberkulosního onemocnění, které podle rozsáhlosti nálezu jsme nuceni poklädati za hlavní příčinu smrti.

Neodvážíme se činiti z tohoto pokusu žádných přesvědčivých dedukcí, neboť jsme si vědomi toho, že mu chybí hlavní, t. j. kontrolní inokulace též poliomyelitické mích jiné opici, před tím ničím neočkováné. Přes to však se nemůžeme ubrániti dojmu, že inkubační doba je mnohonásobně delší, než by odpovídalo kvantu i provenienci očkovaného materiálu, a to ještě u zvířete primárně nesmírně oslabeného tuberkulosním onemocněním. Nechceme mluviti o získané imunitě, na to je náš pokus příliš málo přesvědčivý, ale že byla zvysena zcela patrným způsobem resistance tohoto zvířete (nejméně tak, jak se to podařilo Nicolauovi a Gallowayovi s pokusem u bornské nemoci) poklädáme za velmi pravděpodobné.

Jde nyní o to, jak vyložiti zajímavý a charakteristický obraz onemocnění, který se nám podařilo vyvolati u tří našich fretek (I., II. a III.), očkováných materiálem přímo z člověka a u čtvrté (IV.), na níž se podařila druhá pasáž z fretky předchozí (č. III.), a to za stejných symptomů klinických a pathologicko-anatomických.

Nespecifické podráždění centrálního nervstva cizorodou nervovou substancí jsme mohli vyloučiti jednoduchým pokusem, jak uvedeno svrchu.

Jsme dále přesvědčeni, že jsme jednak dlouhodobým pozorováním všech našich fretek, dále experimentální inokulací mích fretky z téhož hnizda jinému zvířeti téhož druhu a konečně negativním výsledkem přenosu na ostatní laboratorní zvířata mohli vyloučiti latentní infekci.

těchto zvířat nějakým, až do té doby saprofytickým encephalomyelitickým virem, specificky patogenním pro tato zvířata. Pro totéž svědčí ne možnost dalšího seriového přenosu v rámci tohoto živočišného druhu a dále pro encephalomyelidy zvířecí naprostě nepatrný a necharakteristický nález, jaký téměř nelze předpokládat u zvířete, infikovaného neurotropním virem pro ně specificky patogenním.

Nezbývá než jediná možná supozice, kterou po važujeme tímto pokusem za prokázánu: že se nám podařilo výjimečně přenést na tato zvířata skutečný poliomylitický virus humanní, po jehož uchycení v centrálním nervstvu onemocněla, případně zašla za symptomů, nápadně podobných poliomylitidě lidské. Uvážíme-li u všech zvířat téměř stejnou inkubační dobu, necharakteristické horečnaté předchorobi a prakticky stejné symptomy paretické až paralytické s tak velkým zeslabením muskulatury zachvácených částí těla, že upomínalo velmi nápadně na lidské atrofie, tu nacházíme tak nápadné analogon mezi obrazem u fretek a experimentální poliomylitidou u opic, že by bylo skutečným násilím vykládati je jinak, než jak právě činíme.

Histologický nález v mísě inokulovaných a onemocnělých zvířat se ovšem nikterak nekryje s obrazem lidské poliomylitidy. Jediné změny, jež bylo možno zjistit, pozůstávaly ve velmi nápadném edému šedé hmoty, hlavně v předních rozích lumbálního úseku míchy, a dále v degenerativních zjevech na velkých motorických buňkách předních rohů; ty se projevují zduřením buňky a rozpadem basofilních struktur plasmatických (tigroidu) v jemná nepravidelná zrněčka, u dvou zvířat též zřetelných pyknotickým svrásťením jádra. Připomínají poněkud t. zv. retrográdní onemocnění ganglionových buněk, jež se vyvinuji po

přerušení periferního motorického neuronu, ale liší se od nich postižením jádra a edémem základní hmoty. Acidofilní inkluze v jádrech gangliových buněk, jak je popsal Hurst a nověji Gawrilow při experimentální poliomyelitidě u opice, jsme nenašli. Dále též, kromě nepatrných náznaků aktivace glie, zjistitelných jen v některých řezech, úplně chyběla pro poliomyelitu typická zánětlivá reakce buničná v nervové tkáni a v meningách.

Degenerace motorických gangliových buněk dostatečně vysvětluje pozorované příznaky u onemocnělých zvířat. Jiná je otázka, jak dalece je lze považovat za projev infekce poliomyelitickým virusem. Je známo, že týž virus může u různých druhů zvířecích vyvolat značně odlišný histologický obraz. Tak virus lyssy u člověka, psa i králíka způsobí převážně jen degeneraci gangliových buněk, kdežto u kuřete k tomu přistupuje velmi zřetelná buničná reakce zánětlivá. Podobně virus louping ill vede u vepře k intensivním zánětlivým změnám, kdežto u jiných druhů zvířecích se projevuje pouze nekrosa gangliových buněk (Brownlee a Wilson). Naproti tomu mohou různé viry u vnímatelných druhů vyvolat velmi analogický obraz, jako je na př. lidská poliomyelitis a těšínská nemoc vepřů. Nelze tedy pro průkaz zdařilého přenosu klást požadavek naprosté analogie v histologickém nálezu, zvláště jede-li o species tak značně od sebe vzdálené a při tom o virus s tak význačnou adaptací druhovou. Odchylný obraz může být prostě projevem poměrně nepatrné vnímatnosti fretky vůči viru lidské poliomyelitidy; rozhodně jej nelze považovat za důkaz, že o infekci tímto virem nešlo.

Je jistو, že přenos poliomyelitického viru přímo z člověka na fretky, ač zásadně možný, je přece jen výjimkou, a pochybujeme, že by těchto živo-

čichů někdy mohlo býti použito jako běžných pokusných zvířat na virus obrny a dokonce už k jeho seriovému přenosu. Měli jsme pravděpodobně štěstí, že jsme při kulminaci poliomyelitické epidemie zachytili několik kmenů polim. viru zejména výjimečně silných, jak o tom svědčí zejména okolnost, že se přenos nepodařil míchami z případů na počátku října, t. j. před vrcholem, a potom koncem listopadu, t. j. na sklonku epidemie. A snad i naše zvířata, jak tomu na podzim bývá, byla k pokusu zvláště disponována buď vnitřně sekretoricky, nebo i úbytkem vitaminů. Je pochopitelné, že u zvířat na virus poliomyelitický tak relativně málo citlivých jako fretka, ztrácí tento virus rychle na své virulenci; jak se v našich pokusech ukázalo, může býti ještě schopen přenosu v jedné další pasázi, ale pak již pravděpodobně není možno vyvolati jím další onemocnění nejen těchto zvířat, nýbrž ani opic. Nepokládáme však rovněž v důsledku našeho, bohužel, nedokončeného pokusu za vyloučenu ani tu možnost, že fretčí virus, ačkoliv již není schopen vyvolati klinické onemocnění u opic, přece jen jim snad propůjčuje zvýšenou resistenci proti inokulaci čerstvým a virulentním materiálem lidským, čili má zachovánu alespoň část svých antigenních a imunogenních vlastností.

Snad jsme právě tím ukázali na jednu z možných cest, kterou by se měly ubírat další pokusy při pátrání po bezpečné, ale účinné vakcině k lidské aktivní imunisaci.

Pátráme-li v nejnovější literatuře, najdeme dva doklady, potvrzující exaktnost našich pokusů. Gawrilow a Fester dokázali 1940 přenéstí poliomyelitický virus opici o velmi značné virulenci pro tato zvířata (Flexnerův virus, jeden z nejsilnějších známých poliomyelitických virů, jenž po intracerebrální aplikaci dává pozitivní symptomy obrny již třetí až pátý den a usmrcuje zvířata za

7 nebo 8 dní) po intracerebrální inokulaci na fretku, která zašla 11. den za symptomů paralytických. Z této fretky se podařila ještě jedna pasáž na další fretku, jež zašla po 17 dnech, ale centrálním nervstvem z této druhé fretky se nepodařilo již opici infikovati. Histologický nález byl zhruba stejný, jako v našich případech. Ještě nověji se podařilo Armstrongovi a Lilliemu přenést i jiný virulentní pasážový kmen, a to kmen Lansingův, na zvláštní druh krys (cotton rat) a odtud na bílé myšky, na nichž je pak prý schopen seriových pasáží. Jelikož nám tato práce byla v originále nedostupná a dosud jsme našli pouze jedinou publikaci, která ji potvrzuje (ostatně od téhož autora — Haas, Armstrong), nemůžeme se o věci s určitostí vyjádřiti, ale po svých pozorováních nevidíme příčiny, proč by to nebylo možné.

V celku tedy jme oprávněni z našich pokusů uzavírat, že se nám podařilo, a to jako prvním, přenést poliomyletitický virus z člověka přímo na fretku, udržeti jej ještě v jedné další pasáži a snad i zvýšiti jím resistenci opice proti smrtelné dávce čerstvého víru. I když možnost tohoto přenosu je dána naprostě výjimečnými faktory, takže je malá pravděpodobnost, že by fretka se někdy stala zvířetem, na němž by mohl být pravidelně přenos poliom. víru v laboratoři realisován, přispěli jsme jistě svou prací k otresení dogmatu, podle něhož opice je jediným citlivým zvířetem na poliomyletidu lidskou. Není vyloučeno, že pokus nebude mít sám o sobě dalších experimentálních důsledků; rozhodně však ukazuje cestu a otvírá nové možnosti k dalšímu plodnému badání v temných kapitolách epidemiologie, pathogenesy a imunologie poliomyletidy.

R e s u m é.

Autor ukazuje ve světle novějších výzkumů na problémy imunologie, pathogenesy, serotherapie a aktivní imunisace u poliomyelitidy, které nebyly dosud rozřešeny. Ježto zůstává stále otevřená otázka případného jiného reservoiru viru v přírodě, nežli je člověk (viz již prokázané přežití viru ve vodě čisté i odpadové jako možný zdroj nákazy), dále pak proto, že na jiném, nižším experimentálním zvířeti, nežli je opice, by bylo možno snáze řešiti řadu problémů shora naznačených, považuje za velmi důležité, aby se neustávalo v pokusech o přenos viru obrny na přístupnější laboratorní zvířata. Kdyby se to zdařilo, mohlo by to mít zvláště pronikavý význam při výrobě očkovací látky k preventivní imunisaci, neboť virus opicí je pro člověka příliš blízký a v důsledku toho příliš pathogenní, než aby mohl být bez nebezpečí používán pro člověka. Pasážový virus ze zvířete, fylogeneticky dostatečně vzdáleného od člověka, by mohl — podobně jako Pasteurův fixní virus — nabýti nových příznivých vlastností pro genus humanum beze ztráty schopnosti antigenních.

Veden touto snahou, využil autor těžké epidemie dětské obrny v Čechách v říjnu 1939 a naočkoval řadu fretek intracerebrálně míchou několika zemřelých lidí. Ve 3 různých případech, pocházejících z rychle smrtících případů lidské obrny, vyvinuly se u zvířat po přibližně týdenní inkubační době za zvýšené teploty symptomy parés až paralys se zřetelnou atrofií postižené muskulatury, a dvě fretky zašly za příznaků úplné obrny. Z jedné z nich mohl být přenesen virus ještě v druhé pasáži na další fretku, která zašla za stejných symptomů, ale po delší inkubační době. Králíci, morčata a bílé myši, očkované současně s fretkami.

neprojevily během tříměsíční pozorovací doby žádných symptomů choroby. Z druhé fretči pasáže nemohl býti virus přenesen již na další zvíře a dokonce ani na opici po intracerebrálním očkování.

Opice se však ukázala o půldruhého měsíce později při očkování čerstvým a virulentním materiálem lidským zřetelně resistentnější, než by asi bylo zvíře normální.

V další řadě pokusů autor vyloučil, že u nemocných fretek nešlo ani o nespecifické podráždění centrálního nervstva cizorodou míšní substancí, ani o spontánní epizootickou encephalomyelitidu fretek. Odlišný histologický nález v míchach zaslých fretek, který se lišil od normálního obrazu poliomyelitidy nedostatkem zánětlivých změn, ale zato s význačnými degenerativními symptomy v motorických buňkách šedé hmoty míšní, lze vysvětliti tím, že (per analogiam jako u jiných neurotropních infekcí) virus se uchytil u zvířete málo citlivého.

Autor považuje své pozorování za zjev celkem výjimečný a chová málo naděje, že by bylo možno používat fretek k pravidelnému přenosu viru lidské obrny. Příčinou jeho úspěchu byl pravděpodobně náhodný nález kmenů viru o zvlášť vysoké virulenci a snad i vhodná disposice zvířat (podzimní vlivy vnitřněsekretorické anebo avitaminosy). V každém případě však považuje svůj nález (první popsáný v odborné literatuře) za důležitý pro potření dogmatu, podle něhož měla býti opice jedině citlivým zvířetem na dětskou obrnu a v důsledku toho i za úspěšný casus praecedens, vybízející k dalšímu experimentování v tomto směru.

Literatura.

- 1. Levaditi:** Les ultraviruses des maladies humaines: Poliomyélite infec. épid. Paris 1938. — **2. Gildemeister:**

- Handbuch der Viruskrankheiten: Poliomyelitis. Jena 1939. — 3. Kling, C. A.: Off. internat. Hyg. publ. 30, 2775, 1938. — 4. Olson, Byron, J.: Off. internat. publ. 30, 2783, 1938. — 5. Kleinschmidt Hans u. Mitarbeiter: Zbl. Ref. 135, N. 3/4, 1939, S. 75. — 6. Lépin, P. - Sédallian, P.: Presse méd. 206, 1939. — 7. Müller: Ztbl. f. die ges. Hyg. 36, 1936. — 8. Laidlaw: Journ. Amer. med. Assoc. 99, 1932. — 9. Frauchiger, E. - Hofmann, V.: Schweiz. Arch. Tierheilk. 80, 260—262, 1938. — 10. Frauchiger, E. - Messerli, V.: Schweiz. Arch. Tierheilk. 81, 207—212, 1939. — 11. Nicolau, Galloway: C. r. Soc. Biol. 100, 607, 1929. — 12. Wichelessky: Rec. de Méd. vét. 111, 357, 1935. — 13. Harrison, J. A. - Wollpert: J. inf. Dis. 65, 214—218, 1939. — 14. Kessel, J. F. - Stimpert: Amer. J. Hyg. 29, Sect. B, 45—56, 1939. — 15. Moore: Brit. med. J. 168, II., 1934. — 16. Toomey, J. A. - Weaver, H. M.: Amer. J. dis. Childr. 57, 541, 1939. — 17. Trask, James, Paul, Vignec: Proc. Soc. exper. Biol. a Med. 41, 241—245, 1939. — 18. Stimpert-Kessel: Amer. J. Hyg. 29, Sect. B, 57—66, 1939. — 19. Shaughnessy-Harmon-Gordon: J. Prevent. Med. 4, 1930. — 20. Lépine: Rev. d' Immunolog. 480, I., 1935. — 21. Flexner-Amos: J. exper. Med. 39, 625, 1924. — 22. Brodie: J. Amer. med. Assoc. 105, 1089, 1935. — 23. Kolmer: J. of Immunol. 26, 505, 1934. — 24. Leake: J. amer. med. Assoc. 105, 2152, 1935. — 25. Aycock-Kagan: J. of Immunol. 14, 85, 1927. — 26. Krause-Meinicke: Deutsche med. Woch. 14, 647, 1910. — 27. Coban A.: Wien. med. Wschr. 1939, 775—778. — 28. Nungester: Proc. Soc. exper. Biol. Med. 30, 1128, 1933. — 29. Kolmer-Rule-Werner: J. inf. Dis. 61, 63, 1937. — 30. Brownlee a Wilson: Ring. L. S. Journ. amer. med. assoc. 113, 1940, 1939. — 31. Gavrilov-Fester: Arch. ges. Virusf. 1, 404, 1940. — 32. Lillie-Armstrong: Publ. Rep. 55, 718, 1940. — 33. Haas-Armstrong: Publ. Health Rep. 1061, 1940.
-