

Laboratoř pro výzkum obrny vepřů při ústavu pro lékařskou mikrobiologii a imunologii Karlovy university.

Dr Patočka a Dr Kubelka, Dr Žáček:

576.858.23[:619.4].093.1

Pokus o částečnou purifikaci viru encefalomyelitis enzootica suum.

Pokusy o purifikaci, případně i koncentraci nejrůznějších virů jsou relativně starého data a tvoří velmi významnou kapitolu virologického bádání.

Z počátku byly vedeny hlavně snahou o získání pokud možno čistého virového materiálu k výrobě účinných vakcin. Nověji nadto ještě jsou purifikáty zhotovovány také za tím cílem, aby mohla býti poznána a prostudována chemická skladba virů, jejich fysikálně chemické konstanty, jejich skutečná resistence a případně také tvar v elektronovém mikroskopu.

Skvělý přehled téměř všech method, jichž až do doby téměř nejnovější bylo k tomu cíli použito, lze nalézt v práci Tovarnického (1), na níž zde odkazujeme.

Výsledky, získané purifikováním zvířecích a lidských virů, hodnotí a to zejména po stránce fyzikálně-chemické, částečně i chemické, ve svém známém souborném referátu Beard (2).

Celkem lze říci, že řada prací, obírajících se tímto thematem, jest dnes již ku podivu veliká; dle našeho názoru lze tyto rozdělit zhruba do dvou období. Období starší vykazuje pracovní výsledky často velmi neurčité a jak již svrchu uvedeno, použitelné většinou pouze k praktickým cílům aktivní immunisace. Moderní období začíná nesporně fundamentálním objevem Stanleyovým (3), jenž první získal absolutně čistý rostlinný virus, nejdříve v parakrystalické, pak i v krystalické formě.

Je pochopitelné, že jím použitá methodika (v podstatě dvojí, jednak frakcionovaná precipitace ammonium-sulfátem, jednak diferenciální ultracentrifugace) byla propracována a používána nadále ve snaze získati stejně purifikované viry živočišné, nebo lidské. Bohužel však nelze říci, že by u těchto posledních byly výsledky purifikace tak význačné jako u virů rostlinných, naopak jest téměř jisto, že až do této chvíle ani jediný z živočišných nebo lidských virů nebyl 100% purifikován a případně (pokud by šlo o malé viry) získán alespoň v parakrystalické formě. Příčinou těchto relativních neúspěchů jest, jak se zdá, především větší složitost buněčného prostředí, v němž se živočišné a lidské viry nacházejí a pak to, že až na několik málo, jsou tyto mnohem komplexnější povahy. Proto také pouze jediný z nich, virus králičího papilomu, který se svým složením nejvíce podobá rostlinným virům, byl získán v čistotě takového stupně, jež se blíží maximálně ideálu u těchto dosaženému.

Zvláště nesnadným problémem se zdá býti purifikace některých neurotropních virů, jednak pro jejich malé rozměry, pak pro zvláštní charakter tkáně, z níž musí býti uvolňovány. Pokud lze tyto pěstovati v kuřecích embryích, neb pokud mají vysoký infekční titr, je práce o něco málo snazší (viry infekčních encefalitid).

S nejtíže překonatelnými obtížemi se pochopitelně setkáváme u oněch, které se dosud nepodařilo žádnou z běžných virologických method pomnožovati a ještě nadto mají relativně nízký infekční titr (lidská poliomyelitis). Tyto nesnáze při purifikaci jsou také jednou z příčin, proč o skladbě virů lidské polio je dosud tak málo známo. Kdežto u virů větších s vyšším infekčním titrem a zejména těch, které při kultivaci v kuřecím embryu přecházejí masivně do allantoidní tekutiny, znamená purifikace prakticky vždy také mnohonásobnou koncentraci vzhledem k výchozí suspensi či tekutině, nemusí tomu býti nutně tak u virů posledně zmíněných. U těchto purifikace znamená sice ztrátu balastních bílkovin (případně také lipidů) do určitého stupně, ale současně též ztrátu samého virus-proteinového komplexu. Je

tedy zde konečný produkt sice čistším, ale při tom jeho virulence bývá nesmírně kolísavá, zhusta dokonce nižší než u výchozího materiálu. Pochopitelně platí tato poslední skutečnost spíše pro chemické metody purifikace, nežli pro diferenciální ultracentrifugaci.

Při studiu viru encefalomyelitis enzootica suum jsme obrátili velmi brzy svoji pozornost ke snaze o získání tohoto viru co možná v nejčistším stavu. Mohli jsme se svému vytčenému cíli tím spíše věnovati, jelikož jsme věděli, že jiné kolektivy pracovníků řeší hlavně otázku úspěšné aktivní immunisace. Zdálo se nám, že by bylo účelno, seznámiti se blíže se skladbou, velikostí a biologickými vlastnostmi tohoto viru a teprve potom se pokusiti o aktivní immunisaci virem purifikovaným a případně i purifikací koncentrovaným, při čemž jsme současně pomýšleli na možnost určení antigenní plurality viru modifikovanou methodou Robertsova flokulačního testu. K tomuto je zapotřebí viru velmi vysoce vyčištěného, což (jak jsme předem věděli) bude spojeno s velikými nesnáze, vyplatí se však při event. úspěchu přehlednou, málo nákladnou a snadno proveditelnou reakcí, která by i jen orientačním způsobem, je schopna poskytnouti přehled o antigenní pluralitě viru vepřové obrny rychleji, nežli dlouho trvající a nákladné zkoušky zkřížené immunity nebo seroneutralizačního testu.

Při úvaze o tom, které z purifikačních procedur by bylo možno námi použiti, padla pochopitelně volba především na diferenciální centrifugaci jakožto na methodu, která i u neurotropních virů, vepřové obrně blízkých, jako je poliomyelitis, dává pozoruhodné výsledky. [Loring, Raffel, Anderson [4] a Rhian, Lensen, Williams (5).] Bohužel jsme museli uznati, že násobky gravitace dosažitelné naší rychlou centrifugou (maximum 15 000 obr. za min.) jsou příliš malé, než aby byly schopny zkoncentrovati a oddiferencovati z výchozí míšní suspense partikule viru, jež se vší pravděpodobností jsou asi téže velikoszi, jako u lidské obrny.

Rovněž čištění viru dle Casalovy methody (6) jsme museli zamítnouti, neboť, přesto, že je tato methoda jednou z nejlepších pro získání hodnotného antigenu u infekčních encefalitid, skýtá málo naděje, že by uchovala aktivním a koncentrovala virus v pathologické tkáni relativně tak řídko roztroušený, jako je virus obrny.

Urátová methoda Tovarnického (7), velmi praktická a výborně promyšlená nemohla býti prozatím použita, jelikož nám ze začátku chyběly určité technické předpoklady pro její provedení. Bude však na ní intenzivně pracováno v serii dalších pokusů.

V mezích našich experimentálních možností jsme zkusili 2 skupiny method, jež byly pro různé neurotropní viry již s úspěchem vyzkoušeny. Prvá methodika užívá kyselá precipitace k izolaci té frakce míšní suspense, která na sebe váže maximum viru. Byla použita pro Theilerův virus Rackerem (8).

Druhá skupina method vychází z principu, použitého Tovarnickým a Chalkinou (9) nato Stanleyem a později propracovaného Coxem (10).

Ruští autoři první prokázali, že lze získati vysoce čistý chřipkový virus z plicní tkáně precipitací ethanolem za studena, čímž se odstraní více než 90% balastních látek.

Cox našel mnohem později, že lze k témuž cíli použití methanolu, jehož ničivý účinek na virus chřipky při temperaturách pod 0°C je minimální, pakliže není překročena jeho konečná koncentrace více, nežli 25 objemových procent, jež současně zaručují také optimum úspěchu.

Casals ukázal mimo to, že u neurotropních virů lze dodatečného vyčištění methanolového precipitátu docíliti střídavým zmrazováním a rozmrazováním eluátu, vzniklého rozpuštěním methanolové sraženiny. Podobně jako methanolu lze užití k precipitaci i absolutně chemicky čistého acetonu, jehož optimum účinku kolísá kolem 30 objemových procent. Gollan (11) použil principu Tovarnického a Coxovy metodiky kombinované kyselou precipitací a zmrazováním i tavením eluátu s dokonalým úspěchem k vyčištění a koncentraci hlodavčího MM viru, který, jak se zdá, stojí poliomyelitickým již relativně blízko. Purifikát jím získaný byl po dialyze vyčištěn dokonce tak dokonale, že ho bylo možno použítí přímo k účelům elektronoptickým. Konečně Roberts (12) podobnou kombinací předchozích method dosáhl v některých zvláště úspěšných pokusech — které však, jak se zdá, nemohl ani on sám kdykoliv reprodukovati — preparátů tak čirých a při tom tak koncentrovaných (titr u Lansigova kmene až 10^{-5}), že ho mohl s opičím hyperimunním serem po přidání protaminsulfátu použítí k velmi zajímavému flokulačnímu testu, jímž zřetelně odlišil od sebe různé antigenní typy lidského poliomyelitického viru. O něco méně povzbuzující výsledky u kmene MEF₁ dosáhli methanolovou precipitací Pollard a Finegold (13), kteří se však neodvážili rozhodnouti, zda jimi docílené zvýšení infekčního titru bylo vyvoláno pouhou dispersí supponovaných virových agregátů nebo vyloučením nějakého inhibičního faktoru v myším mozku.

Jelikož methodika propracovaná Rackerem se nám zdála býti nejjednodušší, použili jsme k první řadě pokusů této.

Purifikace kyselou precipitací:

10% suspense myšího mozku a míchy (použito autorem pro starý Theilerův virus) v destilované vodě se převede 1 mol. octovou kyselinou na pH 4. Kyselá precipitace probíhá bezprostředně nato v ledničce po dobu 30 min., načež se sediment odcentrifuguje při 3—4 tis. obr. Tekutina, která zbude nad sedimentem, se dekantuje a centrifugát se resuspenduje při pH 8 fyziologickým roztokem v $1/10$ původního objemu 10% suspense. Autor předpokládá, že v precipitátu vzniklém snížením pH na 4, je obsaženo maximum viru. Většina balastních proteinů zůstává v tekutině nad precipitátem. Při pH 8 se virus obsahující precipitát znovu převede do jemné suspense a použitím pouhé $1/10$ původního množství tekutiny je koncentrován. Koncentro-

vaná virová suspence se ještě jednou odcentrifuguje asi při 2 tis. obr., aby byla zbavena hrubších částic. Zbylá tekutina obsahuje koncentrovaný a purifikovaný virus.

V našich pokusech jsme používali v převážné většině případů pouze materiálu z mích vepřů, utracených při objevení se prvých symptomů choroby a které byly dle naší metodiky standardně konservovány na suchém ledu. Předpokládali jsme totiž (per analogiam s lidskou poliomyelitidou), že jednak mícha obsahuje více viru nežli mozek, a za druhé, že obsah viru v iniciálních stadiích onemocnění je nejvyšší a poté rychle klesá.

Koncentrát získaný kyselou precipitací jsme v některých případech ještě dodatečně purifikovali tím, že jsme k němu přidali $\frac{1}{3}$ objemu etheru při teplotách pokud možno nízkých a poté odcentrifugovali. Lipoidů zbavený purifikát lze pak snadno odpipetovat. Purifikát podle Rackera byl zkoušen ve 2 seriích pokusů, jednak na začátku léta a pak po několika měsících opět na podzim 1949. Zkoušen samozřejmě na infekciositu také preparát delipoidovaný. Výsledek pokusů je uveden v tabulce č. 1.

Tabulka 1.

Inkubační doby podle zředění preparátu získaného kyselou precipitací.

Pokusné zvíře	Zředění preparátu			
	Výchozí materiál (konc.)	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
R 90	7			
R 79	8			
R 10	10			
R 6	16			
R IX		9		
R I		14		
R 9		15		
R 7			∞	
R III			∞	
R X			∞	
R 13			∞	
R 2				∞
R VI				∞

Čísla udávají počet dnů inkubace.
 ∞ = zvíře neonemocnělo.

Jak z tabulky patrně, měl koncentrovaný purifikát získaný kyselou precipitací, vstříknut vepřům intracerebrálně do frontálního laloku v množství kolem 0,7 ccm, inkubační dobu (t. j. k objevení se prvých symptomů, které v průběhu několika dalších hodin postupovaly v tak těžké konvulze, že bylo jasno, že by zvířata v dalším průběhu uhynula), 7—16denní. Byli-li

purifikát zředěn na 10^{-1} měl inkubaci 15denní, kdežto ve zředění na 10^{-2} a 10^{-3} nevedl vůbec ke klinicky patrnému onemocnění.

Ze serie podzimních pokusů lze viděti, že purifikát zředěný na 10^{-1} vyvolal jednou onemocnění po 9denní a jednou po 14denní inkubační době. Další vepř z tohoto pokusu zašel na intracerebrální krvácení. Týž preparát zkoušen na podzim, zředěný na 10^{-1} , 10^{-2} a 10^{-3} , každý vstříknut dvěma vepříkům, nevyvolal, stejně jako v jarní serii pokusů, zřetelného onemocnění.

Ačkoliv z uvedených experimentů nelze pro relativně malý počet pokusných zvířat vykalkulovat přesně LD_{50} dle Reeda a Munche, lze přece jen usuzovati, že limitní infekční dávka u purifikátu, získaného kyselou precipitací, leží někde mezi zředěním vyčištěné suspence na 10^{-1} a 10^{-2} . Již toto zjištění bylo pro nás překvapením, neboť jak z popisu metody patrně, měl by býti virus, proti výchozí suspensi, koncentrován. Při tom však virulence našeho purifikátu byla zřetelně menší nežli u 10% míšní suspence, neboť tato u našeho stabilisovaného viru vyvolávala pravidelně onemocnění do zředění 10^{-3} a teprve zředění 10^{-4} , vstříknuto stejným způsobem a ve stejném kvantu, jak shora udáno, nevyvolalo nikdy v našich pokusech zřetelných symptomů. (V tabulkách uvádíme tuto 10% suspensi míšní jako výchozí materiál, odpovídá však ředění 10^{-1} ve srovnání s ředěními purifikátů.)

Již z těchto pokusů je zřejmo, že purifikace kyselou precipitací, použita pro virus vepřové obrny, znamená sice zbavení viru balastních proteinů, ale je současně methodou ztrátovou, neboť virus resuspendovaný (i když v koncentrované formě vyvolává onemocnění po stejné inkubační době jako 10% suspence) není koncentrován, nýbrž oslaben. Zda-li toto oslabení je vyvoláno skutečnou ztrátou viru při purifikační proceduře nebo odstraněním nějaké substance, jež umožňuje penetraci viru do nitra citlivých buněk, nemůžeme prozatím rozhodnouti.

V několika dalších pokusech byl purifikát, získaný kyselou precipitací, ještě dodatečně zbaven volných lipidů třepáním etherem.

Tabulka 2.

Inkubační doby podle zředění preparátu získaného kys. precipitací a následující delipidací.

Pokusné zvíře	Zředění preparátu			
	Vých. materiál (koncentr.)	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
dR 1	7	∞	16	∞
dR 2				
dR 3				
dR 4				

Jak z tabulky patrně, vepř, očkovaný koncentrovaným delipoidovaným purifikátem, onemocněl po 7denní inkubační době. Vepřík inokulovaný delipoidovaným materiálem zředěným na 10^{-1} a 10^{-3} ne onemocněl vůbec, zato však zcela výjimečně onemocnělo zvíře, očkované delipoidovaným purifikátem zředěným 10^{-2} a to po 16 dnech. Lze tedy viděti z této serie pokusů, že delipidace neoslabuje nijak zřetelně virus vepřové obrny a je současně markantním důkazem jeho resistance na ether, kteroužto vlastností se tento nápadně podobá viru lidské obrny.

Metoda podle Gollana:

Použita byla jedna z jeho modifikací a sice ta, která má nejméně pracovních fází, ale přesto skýtá virus do té míry purifikovaný (použito pro MM virus), že ji lze použiti i pro elektrooptické znázornění viru. Výchozím materiálem je 25% suspence míchy, homogenisované ve fosfátovém nárazníku při pH 7. Tato suspence se chová 24 hod. v ledničce při -20° , načež po rozmrznutí vytvořený precipitát balastních tkáňových zbytků se odcentrifuguje a zbylá tekutina extrahuje $\frac{2}{3}$ objemu etherem. Suspence s etherem se důkladně protřepe a centrifuguje při 2500 až 3000 obr. Po skončené centrifugaci se vytvoří na povrchu gelatinosní zátka lipidů, jež se prorazí pipetou a tekutina pod ní se odpipetuje. Ether, zbyvší v této delipoidované suspensi se odstraní ve vakuovém exikátoru, načež se suspence přes noc zmrazí. Po roztátí se vytvoří opět precipitát balastních bílkovin, jenž se odstraní centrifugací. Teplotura zbylé suspence se sníží na 0° , načež se přidává methylalkohol, zmražený přibližně na -30 až -40° a to zprvu po kapkách, později ve větších kvantech až do celkového množství 30 objemových procent. V suspensi se počne vytvářeti precipitát, který dosáhne maxima po době 6 hod. v lednici při -10° . Po této době se precipitát odcentrifuguje, zbylá tekutina odleje a precipitát se ještě jednou propláchně stejně zmraženým 30% roztokem methylalkoholu v nárazníku. Nato jest precipitát resuspendován v $\frac{1}{10}$ původního objemu suspence fyziologickým roztokem s nárazníky při pH přibližně 7,5. Takto koncentrovaný virus se opět přes noc zmrazí a po roztátí se vzniklý precipitát odcentrifuguje a vyhodí. Zbylá suspence viru se dialysuje v destilované vodě po dobu 24 hod., čímž se její objem asi zdvojnásobí. Pokud v něm zůstanou nerozpustné částičky, odstraní se centrifugací. Zbylá suspence, která je téměř úplně čirá, zmrazí se ještě po několik dnů, vzniklý precipitát opět odstraní centrifugací a konečný produkt je autorem používán přímo k zhotovování elektrooptických preparátů.

Podle zkušeností, které jsme nabyli při částečné purifikaci viru metodou kyselé precipitace, nedoufali jsme vůbec, že by konečný a opticky téměř čirý purifikát dle Gollanovy metody (t. j. po dialyze) obsahoval takové množství viru, které by v použitelném množství mohlo vyvolati onemocnění. To se také, jak z následující tabulky patrně, potvrdilo. Proto jsme ve většině případů používali purifikátu ihned po methanolové precipitaci resus-

pendovaného v $1/10$ objemu, případně téhož, ale ještě jedním zmrznutím a roztavením zbaveného další části balastních proteinů. Při resuspensi methanolového precipitátu jsme opětovaně zjistili, že se z něho ve fyziologickém roztoku s nárazníkem homogenně resuspenduje pouze část vysráženého materiálu; druhá sedimentuje ve formě hrubých vloček a lze ji snadno odstraniti obyčejnou centrifugací. Inokulací této nerozpustné frakce intracerebrálně jsme se přesvědčili, že stále ještě obsahuje velká kvanta viru, i když zřetelně menší, nežli frakce rozpustná. Již z toho lze viděti, že metoda methanolové precipitace není ideálním prostředkem ke koncentraci viru. Jiným citlivým momentem této metody je přidávání methanolu, které se musí díti velmi opatrně, aby temperatura směsi v žádném okamžiku nepřestoupila 0° ; naopak je nutno, aby rychle klesala pod -1 až -5° .

Tabulka 3.

Inkubační doby podle zředění preparátu získaného methanolovou precipitací.

Pokusné zvíře	Zředění preparátu			
	Vých. mater. (koncentr.)	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
G 15	11			
G 9*	11			
G 14††	13			
G 10*	14			
G 5	31			
G 2	∞			
G 13	∞			
G 11†	∞			
G 12*†	∞			
G 6		∞		
G 7			∞	
G 3*				28
G 4				∞
G 8				∞

Čísla udávají počet dnů inkubace.

∞ = zvíře neonemocnělo.

* = preparát inokulován s hyaluronidásou.

† = preparát dialysovaný.

†† = preparát $2 \times$ zředěn.

Ze shora uvedených výsledků je patrné, že metoda methanolové precipitace je relativně málo úspěšnou pro virus vepřové obrny a v žádném případě nedochází ke koncentraci viru. Z několika úspěšných pokusů lze však přece jenom uzavřít, že resuspendovaný methanolový precipitát může obsahovati tolik viru, že vyvolá onemocnění po inkubační době kolísající mezi 11—31 dny. Dokonce i nerozpustný sediment obsahuje virus v množství, jež vyvolává onemocnění po inkubační době přibližně o týden delší, nežli roz-

pustná frakce v témže případě. Dialysovaný purifikát nevyvolal nikdy onemocnění, takže nelze zjistiti, zda vůbec obsahuje aktivní virus či nikoliv. Nemělo tedy pro nás smyslu pokusiti se o elektrooptické znázornění viru v preparátech takto získaných.

Velmi zajímavé a těžko vysvětlitelné resultáty jsme získali, když jsme se snažili zvýšiti invasivitu purifikovaného viru dle Gollana před dialysou přidáním hyaluronidasy z hovězích varlat, za níž děkujeme Dru Jiřímu Málkovi. (Viz tabulka č. 3.)

Intracerebrální vstříknutí hyaluronidasy samé je pro vepře zcela neškodné. Inkubační doba 11 denní u nezředěného eluátu po precipitaci a zejména onemocnění, byť i výjimečné, u preparátu zředěného na 10^{-3} s hyaluronidasou ukazují, že tato substance skutečně asi zvyšuje invasní schopnosti viru i při přímé inokulaci do centr. nervstva. Je to poznání těžko vysvětlitelné, neboť, kromě v cévách, je asi stěží jiný substrát v mozku, jenž by mohl býti tímto enzymem rozpouštěn. Nejsme oprávněni zacházeti do oblasti hypotheses, ale téměř se vtírá domněnka, supponovaná ostatně řadou autorů pro virus dětské obrny, že to nejsou buňky centr. nervstva, nýbrž mimonervové tkáně, v nichž dochází k primárnímu pomnožování viru encefalomyelitidy.

V celku lze shrnouti tuto řadu pokusů ve výsledek, že metoda methanolové precipitace za našich experimentálních podmínek je pro virus vepřové obrny málo výhodnou methodou purifikační a v žádném případě methodou koncentrační. Lze dokonce i říci, že skýtá mnohem méně pozitivních resultátů, nežli metoda kyselé precipitace, při čemž purifikační efekt je u obou přibližně stejný, pokud se týče bílkovin, jedině s tím rozdílem, že v Gollanově principu jsou primárně odstraněny téměř veškeré volné lipoidy, což opět při kyselé precipitaci lze učiniti dodatečnou extrakcí etherem. Měřeno Kjeldahlovou methodou má suspense, získaná kyselou precipitací přibližně 27,78 mg procenta dusíku, kdežto purifikát methanolový má asi 27,6 mg procenta. Porovnáno s normální míšní suspensí jsou oba druhy purifikátů zbaveny něco více nežli 50% všech proteinů, obsažených v infikovaném materiálu.

Kombinovaná metoda purifikační, modifikovaná zhruba dle schematu Robertsova: 10—20% suspense z infikované vepřové míchy se vyjasní 30 min. centrifugací při 12 000 obr. Nato se pH sníží na 6,0 a následuje $10 \times$ opakované zmrznutí a rychlé roztátí takto vyjasněné suspense. Zmrznutím a roztáváním vzniká precipitát, který se odstraní opětným odcentrifugováním při 12 000 obr. Nato se pH zvýší na 8,0 a precipituje při teplotě -5° asi 33 objencovými procenty chemicky úplně čistý acetonem. Precipitát, jehož kvantum stoupne dále při pobytu v ledničce, se odcentrifuguje a rozpustí v $\frac{1}{10}$ až $\frac{1}{20}$ původního objemu míšní suspense ve fysiolog. roztoku s nárazníky při pH 7,1.

Takto vzniklý eluát tvoří lehce zkalenou tekutinu, která má velmi daleko do čirosti, aby jí bylo lze bez dalšího čištění použití k precipitačním reakcím. Preparát byl vstříknut jednomu zvířeti v této formě, druhému po dodatečné asi 4násobné koncentraci rychlou centrifugou při 14 tis. obr.

Tabulka 4.

Inkubační doby u preparátu získaného acetonovou precipitací.

Pokusné zvíře	Preparát	
	prostý	po centrifugaci (15 000)
Ro 1 Ro 2	19	13

Jak z pokusu patrně, je mezi koncentrovanějším a zředěnějším purifikátem dobře patrný rozdíl co do infekciivity měřeno délkou inkubační doby. Nechceme ze dvou pokusů činiti žádných dedukcí, ale zdá se, že ani tento způsob nekoncentruje skutečně virus i když zřejmě zaručuje přesvědčivější výsledky nežli předchozí metoda.

Diskuse:

Výsledky našich pokusů ukazují, že chemické metody purifikační viru vepřové obrny nejsou ideální a v žádném případě neznamenaají skutečnou

Tabulka 5.

Srovnání koncentrace a infekciivity míšní suspence a purifikovaných preparátů.

Preparát	Koncentrace			
	výchozí materiál	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Suspence (10%)†	17/17	7/7	1/1	0/1
Po kyselé precipitaci	4/4	4/4	0/4	0/2
Po kyselé precipitaci a násl. delipoidisaci .	1/1	0/1	1/1	0/1
Po methanolové pre- cipitaci	5/9	0/1	0/1	1*/3
Po acetonové precipi- taci	2/2	—	—	—

Jmenovatel udává počet infikovaných zvířat.

Činitel udává počet zvířat z toho onemocnělých.

* = preparát inokulován s hyaluronidásou.

† = 10% suspence míšní odpovídá vlastně zředění na 10^{-1} ostatních preparátů částečně purifikovaných.

koncentraci viru. Nejúspěšnější je zcela nesporně metoda kyselé precipitace, jíž lze získati preparáty infikující pravidelně ještě ve zředění na 10^{-1} . Methanolová precipitace lipidů zbavených suspenzí, dává výsledky velmi nepravidelné, kdežto metoda acetonové precipitace se zdá býti o něco šetrnější. Ztráty viru při všech purifikačních procedurách jsou takové, že ani jednou methodou nelze docíliti lepších výsledků, nežli obyčejnou 10%ní suspenzí míchy o stabilisované virulenci. Do jisté míry záhadou zůstává výsledek kyselé precipitace, kde koncentrovaný preparát (výchozí materiál pro další ředění) má proti 10%ní míšní suspenzi nezmenšenou virulenci (měřeno délkou inkubační doby). Této však ředěním velmi rychle ubývá. Je možno, že při této methodě nejde pouze o úbytek samotného viru, což by se pravděpodobně projevovalo prodloužením inkubační doby již při použití přípravku nezředěného, nýbrž odstraněním nějaké, zatím neznámé látky, která umožňuje invasi viru do buněk centr. nevstva. *Tabulka č. 5.*

Virus vepřové obrny je svými vlastnostmi a pathogenním projevem zřejmě velmi blízkým viru lidské obrny. Zřejmě je, stejně jako tento, velmi odlišným od viru infekčních encefalítid a encefalomyocarditid. Poslední mají mnohem vyšší infekční titr a lze je dle výsledků, získaných Gollanem a spolupracovníky i jinými autory, relativně snadno purifikovati chemickými cestami, jak shora popsány. Virus obrny vepřů a jak se zdá, i virus obrny lidské, při použití těchto method, dávají výsledky nepravidelné. Z ústního sdělení Dra. Hammona je nám známo, že 100%ní zvýšení virulence viru lidské poliomyelitidy purifikací, docílené příležitostně Robertsem, nelze kdykoliv podle libosti reprodukovati.

Jednou z možných příčin těchto neúspěchů u virů lidské i vepřové obrny je pravděpodobně jejich nízký infekční titr a jak se lze právem domnívati i ta okolnost, že se tyto méně liší od normálních proteinů centr. nervstva, nežli viry infekčních encefalítid, které lze popsánymi methodami snáze selektivně odstraniti. Námi získané výsledky budí v nás dojem, že jedinou skutečně účinnou methodou, nejen purifikace, nýbrž i skutečné koncentrace obou virů je buď samotná diferenciální centrifugace, jak bylo pro lidskou poliomyelitidu již téměř prokázáno, nebo snad ještě spíše kombinace chemické purifikace s dodatečnou diferenciální centrifugací. (Sven Gard [14], Patočka [15].)

Резюме.

Авторы сделали попытку очистки вируса *Encephalomyelitis enzootica suum* тремя способами:

1. кислой преципитацией,
2. преципитацией при помощи метанола,
3. преципитацией ацетоном.

В двух последних случаях при температуре ниже 0°C .

Материал полученный очистительным процессом был исследован в дес-

ятичных последовательных разбавлениях на содержание инфекционного количества вируса путём внутримозговой прививки и сопоставлен с воздействием 10 проц. спинномозговой инфекционной суспензии у заражённого животного.

Ни в одном случае не найдено, чтобы вирус свиного паралича в очищенных препаратах был действительно сконцентрирован, так-как в общем имели низшую инфекционность чем данная. Наилучших результатов было достигнуто кислой преципитацией. Предполагается, что прибавление гиалуронидазы повышает отчасти способность проникновения очищенного вируса.

Авторы заключают, что химические методы очистки вируса паралича хотя и освобождают инфекционный субстрат от балластных белков больше чем на 50 проц., в некоторых случаях и от большинства больных липидов, но никоим образом вирус не концентрируют. Повидимому, к этой цели нужно было бы их комбинировать с методом дифференциального ультрацентрифугирования.

Summary.

The authors describe 3 attempts of purification of Encefalomyelitis enzootica suum virus from infected spinal cord by means of

1. acid precipitation
2. methanol precipitation at low temperature
3. acetone precipitation under the same conditions.

The partly purified virus has been compared in tenfold dilutions with the activity of 10 p. c. suspensions of infected spinal cord in serial experiments by the route of intracerebral inoculation in pigs. The best results could be obtained with the method of acid precipitation. It seems that the addition of hyaluronidase enhances the invasiveness of partly purified virus. All described methods of virus purifications never led to the true concentration of virus because the infectious titre of partly purified preparations was always lower than that one of ordinary suspension of spinal cord. The authors conclude that the chemical procedures of hog-paralysis virus purification remove about 50 p. c. of the tissue proteins and about 80 p. c. of lipoids. It seems that none of purely chemical methods is able to purify and concentrate the hog polio virus itself. For this purpose it would be necessary to combine some of above described methods with the method of differential centrifugation.

Literatura:

1. Tovarnickij: Voprosy medicinskoj virusologii, Akad. med. nauk SSSR 1948. — 2. Beard: J. of Imm. 1948, 58, 49. — 3. Stanley: Science, 1935, 81, 644. — 4. Loring, Raffel, Anderson: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1947, 66, 385. — 5. Rhian, Lensen, Williams: J. of Imm., 1949, 62, 487. — 6. Casals: J. of Immun., 1947, 56, 337. — 7. Tovarnickij: Biochimija, 1946,

11, 247. — 8. Racker: ústní sdělení. — 9. Tovarnickij a Chalkina: Akad. nauk SSSR, 1944, 42, 194. — 10. Cox, Cheer, Aiston, Bohnel: J. of Immun., 1947, 56, 149. — 11. Gollan, Marvin: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1948, 67, 366. — 12. Roberts: Public Health Reports, 1949, 64, 212. — 13. Pollard, Finegold: Texas Rep. on Biol. Med., 1948, 6, 200. — 14. Sven Gard: Acta Med. Scand., suppl. 143. — 15. Patočka: ČLČ 1949, 88, 1263.