

Věstník československé akademie zemědělské

MĚSÍČNÍK PRO ZEMĚDĚLSKOU VĚDU A PRAXI · ČÍSLO 10

O některých biologických vlastnostech viru Encephalomyelitis enzootica suis. (Těšínská choroba.)

Prof. MUDr Fr. PATOČKA, MUDr V. KUBELKA, RNDr K. SLAVÍK za spolupráce MVDr J. BOHÁČE

Práce vykonána za podpory ministerstva zemědělství ČSR v Praze. Předneseno 14. října 1951 na zasedání ČAZ.

О некоторых биологических свойствах вируса Encephalomyelitis enzootica suis (Тешинская болезнь).

Biologické vlastnosti viru veprové encephalomyelidy (Kloboukovy či Těšínské choroby) nebyly dosud dostatečně prostudovány. Základní práce Kloboukovy ukázaly, že jde o filtrovatelný virus, značně resistentní, jenž je v největším kvantu přítomen v CNS infikovaných veprů a přenosný přirozenou cestou (jež není s jistotou známa) nebo experimentální infekcí pouze na týž zvířecí druh. Úspěšné cesty pokusné nákazy jsou: inokulace intracerebrální, méně pravidelně intranasální, vzácněji krmením a nepravidelně i injekcí intramuskulární a intraperitoneální. Virus se zdá být velmi resistentní (Klobouk¹-Košťanský²-Fortner⁷).

Poznání hlavních vlastností viru bylo doplněno zejména Kloboukovými spolupracovníky^{3, 4, 5, 6} a Fortnerem⁷, v nejnovější době Andrejevem¹⁰, Sven Gardem¹⁸ a Lépinem¹⁶. Fortner⁷ byl prvním, který prokázal vylučování viru stolicí, jež je však podle všeho mnohem méně pravidelně nežli u viru lidské poliomyelidy. Týž autor doplnil a rozšířil nálezy Kloboukovy a ostatních českých autorů o resistenci viru na různá antiseptika, zejména louh, formalin, chloramin, chlorové vápno a kresoly. Dále prostudoval jeho resistenci na teplo, vyschnutí, uzení, hnilobné procesy a konečně prokázal, že kromě CNS a stolice nelze virus prokázati v žádném jiném orgánu ani v krvi. Lépine¹⁶ přenesl virus veprové encephalomyelidy na divokého veprě a prokázal jeho identitu

s virem, vyvolávajícím chorobu zvířat na Madagaskaru^{20, 21}. Sven Gard¹⁸ první publikoval přesné kvantitativní určení ID₅₀ obrnového viru, s nímž pracoval, potvrdil jeho resistenci na ether a uzavřel přes odchylky v histologickém nálezu, že virus Těšínské choroby patří do stejné kategorie jako lidská Poliomyelitis a patrně i viry ze skupiny Coxsackie, je však odlišný od virů ostatních encephalomyelid. Týž autor potvrdil Kloboukův nález možnosti infekce perorální a snažil se propátrati cestu přirozené infekce.

V prvé serii našich prací, kterou tímto předkládáme, jsme se vynasnažili prohloubiti dosavadní znalosti o biologických vlastnostech viru Těšínské choroby, a to za použití — pokud možno — kvantitativních metod. Druhá serie našich pokusů, jež bude předložena dodatečně, zabývá se jeho antigenními vlastnostmi, sleduje otázku jeho antigenní plurality, určuje hladinu sero-neutralisačních protilátek a ukazuje nové možnosti aktivní immunizace.

OBSAH VIRU V CNS, KONSERVACE VIRU A DOCÍLENÍ JEHO FIXNÍCH PATOGENNÍCH VLASTNOSTÍ

Většina starších prací uvádí, že virus Těšínské choroby kolísá nesmírně co do patogenetiky, takže docílení kmene o fixních patogenních vlastnostech se považovalo za prakticky nemožné. V našich pokusech se ukázalo, že toto tvrzení není exaktní, použije-li se následující inokulační a konservační metodiky. Náš kmen viru, který prodělal již téměř 100 pasáží

zvířaty, je standardně inkulován intracerebrálně do frontálního laloku v kvantu 0,5—1 ccm centrifugované míšní suspenze, zředěné 10^{-1} až 10^{-2} . Po inkubační době, kolísající mezi 6 až 12 dny, dostaví se první symptomy choroby, t. j. zvýšená temperatura a ataxie, příp. počínající konvulse. Při zcela prvních zřetelných symptomech ataxie je zvíře zabito a cervikální i lumbální část míchy je konzervována na suchém ledě. Tato jednoduchá procedura udržuje neměnnou virulenci víru (u neimunních selat) vždy s přibližně stejnou inkubační dobou, takže je možno mluvit o pasážovém fixním víru. K pokusu používáme selata mezi 10—25 kg tělesné váhy, ale ani u velkých zvířat (50 až 70 kg) nebylo lze pozorovati podstatné prodloužení inkubační doby. Rovněž není prakticky znatelný rozdíl mezi použitou suspensi ve zředění 10^{-1} a 10^{-2} . Konzervována na suchém ledě, podržuje mícha svoji patogenitu po řadu měsíců. Virulence suspenze zřetelně klesá, je-li použito mích ze zvířat druhý, třetí nebo dokonce čtvrtý den od počátku zřetelných symptomů onemocnění, tedy již v pokročilém stadiu paralytickém. Mícha zvířat, přeživších těžké paralysy po dobu 6—7 dní, neobsahovala již žádný prokazatelný vírus, ačkoliv chovala rozsáhlé a typické histologické změny.

Lze tedy používáním míchy cervikální a lumbální zvířat, zabitých v nejranějším stadiu onemocnění, konzervované na suchém ledě, docílit víru o stálé maximální virulenci.

JINÉ MOŽNOSTI EXPERIMENTÁLNÍ INOKULACE VIRU

Veliká řada pokusů (provedených námi z části za účelem aktivní imunisace živým virem) potvrdila starší zkušenosť, že intranasální instilace víru asi 10 cm hluboko od nosního otvoru pod konchy (suspense 10^{-1}) vyvolává v převážné většině případů typické onemocnění po inkubační době 11 až 18denní. Intrasperitoneální inkulace víru vyvolává nepravidelné onemocnění, zhusta spontánně reparabilní. Intramuskulární injekce víru, použita k aktivní imunisaci (suspense 10^{-1}) vyvolává jen naprostě vzácně onemocnění po 12 až 30denní inkubační době, obvykle lehkého a přechodného rázu, zcela výjimečně ve formě ascendentní paralysy Landryho typu (patrně tehdy, je-li injekcí víru zasažen nervus ischiaticus).

Inokulace víru do varlat v množství 10 ccm suspenze 10^{-1} nevede ke zřetelnému klinickému onemocnění, vyvolává však pravděpodobně inaparentní infekci, jež někdy vede k imunitě (5 případů).

Intralinguální injekce suspenze víru 10^{-1} v kvantu 1—2 ccm vedla v jednom ze 6 případů ke klinické infekci po 24 dnech. U ostatních probíhala infekce inaparentně a vedla v $\frac{1}{3}$ případů k solidní imunitě.

Intravenosní injekce ohromných kvant víru (10—20 ccm míšní suspenze 10^{-1}) vstříknuta ve 3 případech s hyaluronidásem, ve 3 případech bez ní, nevedla ani jednou ke klinické či inaparentní infekci, neboť žádné ze zvířat nebylo imunní. Tento pokus ukazuje, že přenos víru v přirodě hmyzem, ssajícím krev, je velmi nepravděpodobný.

URČENÍ INFECTNÍCH DÁVEK VIRU V RŮZNÝCH ČÁSTECH CENTRÁLNÍHO NERVOVÉHO SYSTÉMU

Starší práce a naše pokusy ukázaly, že vírus je konstantně a ve větších kvantech přítomen pouze v centrálním nervstvu. V řadě pokusů stanovenno, jaký je infekční titr víru v krční a lumbální časti míchy (jíž pravidelně používáme v seriových pasážích k svým pokusům) a jaký v ostatních částech centrálního nervstva, jež podle starších i novějších studií chovají nejvíce histologických změn. Tím ménime:

1. mozeček,

2. mozkový kmen s thalamickou krajinou a se spodinou mozku (bulbus olfactorius).

Materiál k titraci víru odebrán metodou, jak slíbila popsáno, t. j. z intracerebrálně očkovávaného seletu, zabitého při prvních příznacích onemocnění. V prvém případě titrována pouze mícha. Po zjištění nejvyšších účiných zředění víru v míše, vyvolávajících ještě onemocnění, titrovány v druhé serii pokusů (získané z téhož zvířete) mícha, zvláště pak mozeček a konečně spodina mozku s thalamem a olfaktoriickým bulhem. Výsledek prve serie pokusů (k ředění víru 10^{-2} použito jen 1 zvíře, jelikož toto ředění vždy dává kladné výsledky po krátké inkubační době;

Tabulka 1.

Ředění míšní suspense	1:100	1:300	1:500	1:600	1:1000	1:1500	1:2000
Poměr onemocněvšich k inokulovaným	1/1	2/2	3/3	3/3	2/3	1/3	0/3

pro zředění viru 1:300 použita 2 zvířata, k ostatním po 3 zvířatech) ukazuje tabulka 1.

Inkubační doba nemocných zvířat kolisala mezi 9–19 dnů (ředění 10^{-3}), onemocnění byla vesměs těžkého rázu, vedoucí k smrtelným paralysám. Pokus ukončen po 40 dnech (průměrná pozorovací doba pro zvířata intracerebrálně inokulovaná jest v našich pokusech 32 dny).

Kalkulací podle Reeda a Muenche byl určen obsah viru v míše při pasážových pokusech, vyvolávajících paralysu u 50% nakažených zvířat na $PD_{50} = 10^{-3.1}$. Tato hodnota je zhruba stejná jako ta, kterou určil ve svých pokusech Sven Gard¹⁸ pro infikující dávku viru, t. j. $ID_{50} = 10^{-3.2}$. Propočteno podle Kärbera, jenž stanovil vhodnější metodu pro malý počet experimentálních zvířat, byla získána cifra $PD_{50} = 10^{-3.02+6}$. (Za přesný výpočet obou hodnot děkujeme prof. Dru Janků.)

V novější serii pokusů pozorováno, že lze infekciostu míchy zvýšit uvolněním dalších kvant viru ze suspense tím, že se tato podrobí 4–6krát vystavení střídavému zmrznutí a roztavení. Tímto způsobem preparován infekční materiál pro druhou pokusnou serii, v níž porovnáváno kvantum viru v mozku, mozečku a mozkové spodině. K vůli úspoře experimentálních zvířat použito všech 3 druhů materiálu pouze v maximálním účinném zředění (10^{-3}) a ještě ve zředění dvojnásobném (1:2000). Výsledek ukazuje tabulka:

Tabulka 2.

Použitá část CNS	Koncentrace 10^{-3}	Koncentrace 1:2000
Mozek	1/2	0/2
Mozeček	1/2	0/2
Mícha	2/2	2/2

Stanovení PD_{50} našeho pasážového míšního viru ukazuje jeho relativně velmi nízký infekční titr, jak je charakteristické

pro viry poliomyelitické (na př. lidská polio či Lansing), kdežto viry encephalomyelitické mají — jak známo — infekční titr mnohem vyšší (10^{-6} – 10^{-9}). Opakováním mrznutím a roztáváním lze sice zvýšit infekční titr míšní suspense, přesto však ani zde nedosahuje hodnot charakteristických pro typické arthropody přenosné encephalomyelitidy. Z téhož pokusu je patrno, že z celého CNS je nejbohatším orgánem na virus — mícha. Množství viru v mozečku, v mozkovém kmeni a spodině mozku, přes rozsáhlé histologické změny, jest daleko nižší. I to svědčí o tom, že virus Těšínské choroby je svými biologickými vlastnostmi daleko bližší viru lidské poliomyelitidy nežli na př. Japonské B encephalomyelitidě i když jsou histologické leze v mozečku u obou afekcí podobné.

PŘIHLÍŽNÉ URČENÍ VELIKOSTI VIRU TĚŠÍNSKÉ CHOROBY ULTRAFILTRACÍ

Jelikož žádný z předcházejících autorů se nezmíňoval o tom, že by použil ultrafiltrace k určení přibližné velikosti viru, považovali jsme za svůj úkol, využiti i této metody pro jeho bližší poznání. Ze starších pokusů Kloboukových^{1, 2, 4} a později Fortnerových⁷ bylo známo, že virus (i když relativně nesnadno) prochází Berkefeldovými filtry, zejména N a V. Ke svým pokusům jsme použili kolodiové membránové ultrafiltry dle Zsigmondyho, firma Sartorius, Göttingen. K disposici jsme měli 3 druhy filtračních membrán, z nichž jemné mají póry v rozměrech mezi 10–50 μ, střední mezi 50–80 μ a velké mezi 80 až 200 μ. Ultrafiltrační proces se ukázal být velmi nesnadným, takže musil být celkem v 7 seriích pokusů opakován, z čehož pouze 3 experimenty byly úspěšné. Přirozeně byly dodržovány všechny nutné filtrační kautely, filtry udržovány vlhké, v některých pokusech ke snížení povrchového napětí bylo použito přidání stop natrium-desoxycholátu. Filtrační proces probíhal při nízkých teplotách, aby vitalita viru nebyla porušena. Jako nevhod-

Tabulka 3.

Filtrace I.

Průměr pórů	I. 10—50 mu	II. 50—80 mu	III. 80—200 mu
Poměr onemocněvších k i. c. inokul.	*) 1/3	2/3	1/3
3 kontroly o zředění 1:100, 1:250, 1:500		3/3	

*) Zřetelné příznaky obrny, ale přechodného rázu.

nější výchozí materiál se ukázala býti míšní suspense, zředěná v prvém a druhém pokuse 10^{-2} , ve třetím 10^{-1} , vesměs centrifugované 30 minut při 10.000 obrátkách. Výsledek 3 úspěšných exemplářů je patrný z tabulek: 3, 4 a 5.

Tabulka 4. Filtrace II.

Průměr pórů	I. 10-50 mu	II. 50-80 mu
Poměr onemocněvších k inokulovaným	0/3	1/4
Kontroly: 2 o zředění 10^{-2} , 2 o zředění 1:500		4/4

Tabulka 5. Filtrace III.

Průměr pórů	I. 10-50 mu	II. 50-80 mu
Poměr onemocněvších k inokulovaným	0/2	2/3
Kontroly		2/2

Filtráty vstříkovány vesměs intracerebrálně v kvantu 1—2 ccm, kontrolami byly k filtraci použité suspense neředěné i ředěné, které vždy prokázaly dostatečnou aktivitu viru. Zvířata onemocněší po intracerebrálním vstříknutí filtrátů, projevila symptomy onemocnění po inkubační době, kolísající mezi 8—32 dny.

Podle Elforda dlužno hodnotiti velikost viru, procházejícího membránami ultrafiltru přibližně $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ průměru filtrového pórů, jímž virus prošel (platí pro jemné póry, přibližně do 100 mu). Vzhledem k tomu, že v prvém z pozitivních pokusů mělo zřetelné symptomy obrny i 1 ze zvířat, naočkovaných filtrátem, prošlým malými póry, hodnotíme přibližnou velikost viru spíše $\frac{1}{3}$ průměru středních pórů filtrů. Tím docházíme k přibližným

rozměrům viru kolem 25 mu. Zdá se tedy, že virus Těšínské choroby (předpokládáme-li jeho zhruba sférickou podobu) je přibližně stejně velikosti jako virus lidské poliomyletitidy nebo malé viry encephalomyelitické, t. j. má rozměry mezi 18 až 28 mu, určeno filtrační metodou.

RESISTENCE VIRU NA ETHER, ZVÝŠENOU TEPLOTU, CHLORAMIN A JEHO ÚČINNOST PŘI RŮZNÝCH pH

Již zkušenosti Kloboukovy a jeho spolupracovníků, později pak práce Fortnerova, ukázaly, že virus Těšínské choroby v suspensi CNS je značně resistantním na nejrůznější fysikální i chemické činitele. Zkusili jsme některé z těchto pokusů opakovati a doplniti za podmínek co možno nejpřesnějších, při čemž, jako virus obsahujícího materiálu, jsme užívali míšní suspense ve zředění 10^{-1} , vzácněji 10^{-2} . V některých případech jsme porovnávali odolnost viru v centrifugované míšní suspensi s virem, částečně purifikovaným protaminsulfátem podle metody Warren-Weil-Russovy¹⁰ a její modifikace podle Slavíka. Tyto druhé zkoušky jsme považovali za nesmírně důležité proto, že jsme přesvědčeni, že virus, jímž nastává infekce v přírodě (at již vylučovaný stolicí nebo případně nasofaryngeálním sekretém) je mnohem citlivější, neboť postrádá ochranného pláště velkého množství lipojdů a proteinů centrálního nervstva. Jelikož — jak jsme se přesvědčili — protaminsulfát při shora popsané purifikační proceduře precipituje hlavně kyselé proteiny a na ně vázané lipidy, považujeme takto připravený virový materiál za blízký citlivosti onomu, jímž se v přírodě pravděpodobně onemocnění rozšiřuje.

Velmi charakteristická pro virus Těšínské choroby je jeho resistance na ether. Prokázal ji mimo jiné také Sven Gard a považuje právě tuto vlastnost za jednu

z těch, jež virus řadí do kategorie t. zv. virů poliomyelitických. V našich pokusech jsme si ověřili etherresistenci viru již od samého začátku práce (1949), kdy jsme k immunisaci i k různým jiným purifikačním pokusům používali suspense delipidované $\frac{1}{3}$ objemu etheru, jenž působil po dobu 30 minut až 2 hodin. Takto získaná delipidovaná suspense až do zředění 10^{-2} jest prakticky téměř stejně infekční jako míšní suspense nedelipidovaná. Zředění 10^{-3} dává ovšem již výsledky mnohem méně pravidelné, než nedelipidovaná suspense téhož ředění. I když nelze zcela potvrditi názor, že by resistance na ether byla charakteristická jen pro viry poliomyelitické (proti encephalomyelitickým), lze připustiti, že necitlivost na tak veliké kvantum etheru při několikahodinové době kontaktu, je společná jak viru lidské poliomyelityd, tak viru Těšínské choroby.

RESISTENCE VIRU NA CHLORAMIN A ZVÝŠENOU TEPLITU

Bylo užito čistého chloraminu československé výroby. Chloramin přidáván jednak k 10% míšní suspensi, jednak u většiny pokusů k viru, částečně purifikovanému protaminem. Konečná koncentrace chloraminu byla v 5 případech 0,5%, ve 4 případech 1%. Doba působení antiseptika od 5 do 30 minut při pokojové temperatuře. Po této době byl chloramin neutralisován kyselým siřičitanem sodným. Neutralisace v našich pokusech musila být velmi přesná vzhledem k tomu, že virová suspense, příp. virový purifikát, na nějž působeno chloraminem, nesměl obsahovat ani stop volného chloru, ani

přebytek bisulfitu, jelikož k inokulaci opět užito intracerebrální cesty.

Proto bylo předem množství aktivního chloru v roztoku chloraminu a množství nutného bisulfitu určeno přesně u obou roztoků jodometrickou titrací, načež se vypočetlo přesné množství bisulfitu, právě potřebné k redukci aktivního chloru v chloraminu. Jelikož po přidaném bisulfitu pH suspense velmi značně klesá, bylo nutno před přidáním této látky alkalizovat směs nasyceným roztokem NaHCO_3 . Virová suspense s chloraminem po redukcí bisulfitem nesměla ani z roztoku jodu draselného vylučovat jod (což by svědčilo pro přebytek aktivního chloru), ani odbarvovat Lugolův roztok (přebytek bisulfitu). — Za těchto kautel lze virus obsahující suspense, na něž bylo působeno chloraminem, injikovat intracerebrálně za poměrně malého risika pro operovaná zvířata. Výsledky tohoto pokusu jsou patrný z tabulky 6:

Z pokusu vysvítá jasně, že protaminem částečně purifikovaný virus — jehož aktivita je jen o málo menší nežli celé míšní suspense — je ničen 0,5% chloraminem již za 5minutovou dobu působení. Naproti tomu virus v suspensi, chráněný barierou komplexních lipoidů a lipoproteinů CNS, potřebuje k inaktivaci alespoň 15 až 30 min. účinku téhož antiseptika o stejné nebo 1% koncentraci.

Výsledky thermické inaktivace viru skýtají mnohem jasnější obraz, neboť nejsou kaleny toxicitou antiseptika. Bylo inaktivováno ve vodní lázni, ihned po skončení účinku teplot vloženy suspense i purifikáty do ledničky ($+2^\circ\text{C}$) až do okamžiku operace. Tabulka 7.

Tabulka 6.

Koncentrace chloraminu	0,5%				1%	
Doba účinku	5 min.	15 min.	30 min.	15 min.	30 min.	
Míšní suspense 10^{-1}		*	1/2	0/1	1/2	†) 1/1
Částečně purifikovaný virus	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	
Kontroly				3/3		

*) Sele zašlo laesi mozku chloraminem.

†) Sele zašlo 5. dne laesi chloraminem.

Tabulka 7.

Thermické resistance víru.

Teplota po 20 minut	40°	45°	50°	55°	60°	65°	70°
Suspense míšní 10 ⁻¹	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1
Protaminový purifikát	1/2	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	neděláno
Kontroly					1/1		

Je tedy virus vepřové encephalomyelity v 10% míšní suspensi ničen teplotou 65° C, působící 20 minut, kdežto virus částečně zbavený balastních látek je inaktivován již teplotou kolem 50° C za stejnou dobu. Pokud lze posoudit z dosavadní literatury, je thermoresistence Kloboukova víru přibližně téhož rádu (spíše snad o něco vyšší) jako víru lidské obrny (Lépine.¹⁹)

ÚČINNOST VIRU PŘI RŮZNÉM pH

Pro zkoušky resistance víru Těšínské choroby na různá pH použito míšní suspense 10⁻², která v kvantu 1 až 1½ ccm inokulována intracerebrálně. Doba působení různého pH byla průměrně 110 až 115 minut, čili téměř 2 hodiny při pokojové temperatuře. Dosažená hodnota pH v suspensi kontrolována přesně potenciomětricky, při čemž poslední kontrola byla těsně před intracerebrálním vstříknutí víru. Nejnižší zkoušené pH bylo 2.07, nejvyšší pH 13. Suspense v nízkém pH byla zvířaty tolerována velmi dobře, při pH 12 a zejména pH 13 byla zvířata po operaci několik hodin paralytická či dokonce v bezvědomí s občasnými konvulsemi, do druhého dne se však zcela uzdravila. pH 2 až 3.5 bylo dosaženo přidáním 0,5 n kyseliny solné, pH až do 5—0,5 n kyseliny octové, pH 6 až 8 přidáváním 1/10 objemu suspense 0,2 M fosfátového nárazníku téhož pH, kterého mělo být dosaženo. pH 8 až 10 upravováno přidáním 0,2 M veronalnatria a pH 10 až 13—0,5 normálním NaOH. Výsledek je patrný z tabulky 8, jež shrnuje pokusy několikrát opakované:

Z přehledu je patrno, že pH 2 při 2hodinovém působení vírus inaktivuje. Od pH 2,5 až pH 12 je vírus prakticky normálně aktivní, při čemž z délky inkubační doby se zdá, že aktivita víru spíše stoupá při alkalických hodnotách. Při pH 13 je vírus účinný přibližně pouze pro 33% zvířat. Tento účinek, při neobvykle širokém rozmezí pH, řadí vírus Těšínské choroby nesporně mezi nejresistentnější viry vůbec a vysvětluje, proč ve veterinární praxi obvyklá louhová desinfekce nemusí mít žádoucích účinků.

PRŮKAZ VIRU VE STOLICI ZVÍŘAT, INFIKOVANÝCH INTRACEREBRÁLNĚ

Celkem 5 zvířat naočkováno intracerebrálně virovou suspensí, ředěnou 10⁻² a stolice jim odebrána v počátečním stadiu choroby, t. j. při přechodu mezi stadiem ataktickým a konvulsemi. Až do okamžiku zpracování uchovány stolice na suchém ledě. Poté z nich zhotoveny přibližně 20% suspense, které smíchány a zbaveny bakterií dvojím způsobem. Při prvé metodě odstraněna bakteriální flora kombinovaným působením etheru a sří davou centrifukací při 3.000—6.000 obrátkách, načež ether odstraněn v exsikátoru. Celkem pracováno podle metody, používané k průkazu poliomyelitického víru z lidských stolic ve Francisově laboratoři. Druhá použitá metoda spočívala v centrifugaci stolic při 12.000 obrátkách s následovným přidáním penicilinu a streptomycinu. Materiál, získaný každou z obou metod, vstříknut vždy 4 zvířatům intracerebrálně v kvantu 1,5 ccm a 2 následu-

Tabulka 8.

pH	2,07	2,5	2,85	4,2	6	7,2	8	9	10,2	11,1	12	12,5	13
Poměr onemocněvších k inokulovaným	0,2	3/4	2/2	2/2	2/2	3/3	6/6	2/2	2/2	1/2	4/4	2/2	1/3

jící dny ještě také intraperitoneálně. Současně s intracerebrálními a intraperitoneálními injekcemi dostala všechna zvířata v narkose intranasálně několik ccm suspense těchž stolic bez jakékoliv desinfekční procedury. Přes toto důkladné inkubační schema neonemocnělo žádné z pokusných zvířat po 40 pozorovacích dnů (dodatečná challenge ukázala, že zvířata nebyla imunní). Zdá se tedy, že na rozdíl od přirozeného onemocnění (prokázáno Kloboukem), nebo experimentální infekce, vzniklé intranasální instilací viru (Fortner) nebo konečně Sven Gardem dosažené choroby, vyvolané infekcí do zažívacího traktu, nevede intracerebrální infekce k pravidelné eliminaci viru stolicí.

POKUS O PŘENOS VIRU TĚŠÍNSKÉ CHOROBY NA JINÉ ZVÍŘE NEŽLI VEPŘE DOMÁCÍHO

Podle shodných zkušeností všech dosavadních autorů nelze virus Těšínské obrny přenést na žádné jiné zvíře nežli vepře domácího, příp. jeho odrůdu, vepře divokého (Lépine¹⁶). Zcela nejnověji se ukázal být citlivým na Madagaskaru divoce žijící vepř Potamochaeerus larvatus (Pilet - Vegre²⁰). Zkoušeli jsme svůj pasážový virus, a to cestou intracerebrální inkulace na velké řadě zvířat, včetně většiny zvířat domácích. Tak zejména jsme inkulovali asi 14 dní staré tele, jehňata ihned po vylíhnutí a týden stará, velmi mladá štěňata, koťata, mladé fretky, ježka, kachny, holuby a slepice, a to vše bez úspěchu. Jelikož jsme předpokládali, že by v některých případech mohlo dojít k inaparentní infekci, spojené s vylučováním viru, zabíjeli jsme mnohá z těchto zvířat 10–25 dní od inkulace a jejich centrální nervstvo, příp. jejich střevní obsah vstřikovali selatům intracerebrálně. Ani v tomto případě nebyly přenosy úspěšné. Opakování si zaslouží pouze 2 experimenty, jež zůstaly nevysvětleny.

Jedno ze 4 kočat, očkovaných virem Těšínské choroby intracerebrálně, onemocnělo za 1½ měsíce za příznaků ascendentní paralysy, jež během 36 hodin spěla k smrtelnému konci. Těsně před exitem bylo kotě zabito, mícha a část mozku jednak vyšetřena histologicky, jednak uschována na suchém ledu. Histologické vyšetření míchý prokázalo rozsáhlé degenera-

tivní změny v ganglionových buňkách předních míšních rohů. Chyběly zde však větší změny zanětlivé a neuronofagie. Přenos z kotěte na vepře se nepodařil.

V jiné serii pokusů infikováno intracerebrálně 8 dospělých a 10 malých syrských křečků asi 8 dní starých (*Cricetus auratus*). Z dospělých zvířat neonemocnělo žádné z mláďat 2 po 21–23denním inkubační době za příznaků zřetelné ataxie a parés. Ze CNS zabitych zvířat infikováni další syrští křečci, ale bezvýsledně.

V poslední serii pokusů zkoušena selata divokých vepřů, asi 20 kg těžká, na citlivost proti viru obrny, jelikož se ve střední Evropě tvrdí, že jsou resistentnější nežli vepř domácí a nejsou hlášena žádná onemocnění těchto zvířat, žijících polodivoce v oborách. Výsledky tohoto pokusu jsou patrný z následující tabulky.

Tabulka 9.

Koncentrace inkul. suspense	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Počet diviaků, inkulov. i. c.	1	2	2
Inkubační doba	8 dní	*) 11 dní 13 dní	13 dní 14 dní
Kontrola — domáci vepři	—	—	14 dní

*) Uzdravil se po ataktickém stadiu

Z výsledků je vidět, že citlivost divokého vepře na virus Těšínské choroby při intracerebrálním vstříknutí je prakticky stejná, jako u vepře domácího. Dlužno ovšem přiznat, že klinické příznaky jsou poněkud odlišné, zejména konvulsivní stadium je pouze velmi slabě vyznačeno a ataxie rychle přechází do paralys. Také histologický nález je výraznější.

POMNOŽOVÁNÍ VIRU OBRNY V KUŘECÍCH EMBRYÍCH

Podle všeho se dosud žádnému z autorů nepodařilo s jistotou prokázat, že by se virus Těšínské choroby pomnožoval v kuřecím zárodku za patologických symptomů pro embryo (opačný názor zastává Harnach^{11, 12}). I naše pokusy dopadly podobně, embrya naočkovaná všemi možnými cestami zůstávala většinou naživu a

líhla se v normální kuřata. Poučení Henleovou zkušeností s virem infekční hepatitidy, zkusili jsme, zda snad nedochází k inaparentní infekci embrya a bezsymptomovému pomnožení viru v něm. Proto vykonán pokus, v němž infikována jednadvacetinní embrya 0,5 ccm míšní suspense ve zředění 1:5 (centrifugované při 8.000 obrátkách) do žloutkového vaku a 11denní embrya 0,2 ccm též suspense do amniotické prostory. Po 7denní inkubaci přeživší embrya otevřena, při čemž k intracebrální inokulaci pokusných vepřů bylo použito:

1. Z aminoticky inokulovaných embryí odebrány po 7denní inkubaci mozky a 10 proc. suspense z nich byla inokulována 1 vepři.

2. Z embryí, naočkovaných po žloutkovém vaku (tedy při odběru 13denních), byla vstříknuta zvláště allantoidní tekutina 1 zvířeti, 2. zvířeti 10% suspense žloutkového vaku, zbaveného žloutku a 3. zvířeti celé hlavičky (bez očí a zobáku) rovněž v 10% suspensi.

Výsledky pokusu jsou patrný z tabulky.

Tabulka 10.

Inokulum	Výsledek
Allantoidní tekutina	negativní
Hlavičky embryí	negativní
Žloutkové vaky	negativní
Mozky po amniotické inokulaci	negativní
Kontrola použitého viru	paralysa za 8 dní

Z výsledku tohoto pokusu lze s velkou pravděpodobností uzavřít, že náš laboratorní kmen viru vepřové obrny se nemnoží ani inaparentně ve vyvíjejícím se embrýu, což opět by bylo důkazem jeho příbuznosti s virem lidské poliomyelitidy.

POKUSY O PURIFIKACI VIRU OBRNY VEPŘŮ CHEMICKOU CESTOU

Studium biologických vlastností viru obrny vepřů nemůže být úplné bez snahy o získání, pokud možno čistého virového preparátu, který by byl vhodný pro koncentraci ultracentrifugou. Proto jsme vel-

kou řadu pokusů a mnoho zvířat obětovali purifikačním procedurám podle nejrůznějších metod. Jejich konečným cílem bylo získati čistý virus znásobeného účinku k dalším rozborům. Zjistili jsme totiž, že na př. i nejaktivnější míšní suspense (příp. delipidované) nelze použíti ani jako dostatečně vydatného antigenu k deviaci komplementu, tím méně pak k biochemickému a elektroforetickému rozboru, příp. k elektronoptickým studiím.

Je nutno hned konstatovati, že všechny pokusy o získání čistého viru Těšínské choroby jsou nesmírně obtížné, stejně jako u viru lidské poliomyelitidy hlavně proto, že viru, jak z předcházejícího patrno, je v centrálním nervstvu velmi málo.

Ve starších pokusech jsme se pokoušeli o částečnou purifikaci viru, jednak delipidací (viz resistance proti etheru), jednak kyselou precipitací, dále precipitací methanolem při temperatuře pod 0°C a precipitací acetonem za těchže podmínek. Methanolová precipitace, prováděna v principu podle Golana⁹ (popsáno pro MM virus), acetonová precipitace podle Robertse¹³, jenž ji zkoušel pro purifikaci lidské polio. Kyselá precipitace provedena podle principu uvedeného Rackerem (ústní sdělení) asi takto:

10% suspense myšího mozku a míchy (použito autorem pro TO virus) v destilované vodě se převede 1 mol. octovou kyselinou na pH 4. Kyselá precipitace probíhá bezprostředně nato v ledničce po dobu 30 minut, načež se sediment odcentrifuguje při 3.000—4.000 obrátkách. Tekutina, která zbude nad sedimentem, se dekantuje a centrifugát se resuspenduje při pH 8 fysiologickým roztokem v 1/10 objemu 10% suspense. Výsledky těchto našich prvních pokusů lze shrnouti do přehledné tabulky 11.

Na rozdíl od virů encephalomyelitických (MM virus) ztrácí virus Těšínské choroby, purifikován kteroukoliv z uvedených metod, značně na své aktivitě, takže bez koncentrace ultracentrifugou nedosahuje tyto metody žádoucího cíle (Patočka-Kubelka-Žáček¹⁵).

Z těchto důvodů v novějších pokusech přezkoumány jiné způsoby purifikace, z nichž nadějným se ukázalo zejména en-

Tabulka 11.

Preparát	Koncentrace			
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Suspense (10%)	17/17	7/7	2/3	0/3
Po kyselé precipitaci	4/4	4/4	0/4	0/2
Po kyselé precipitaci a násl. delipoidisaci etherem	1/1	0/1	1/1	0/1
Po methanolové precipitaci	5/9	0/1	0/1	—
Po acetonové precipitaci	2/2	—	—	—

zymatické natrávení CNS trypsinem nebo papainem. Výchozím materiélem byla obyčejná míšní suspense nebo suspense delipidovaná etherem.

Při enzymatickém natravování podle našich metod postupováno takto:

Natrávení papainem: Ke 100 ccm suspense míchy ve fys. roztoku jsme přidali 100 mg papainu (Merck 1:200) a 10 mg l-cystein-hydrochloridu, obojí rozpuštěné v 5 ml vody. pH suspense jsme upravili 0.5 n kys. octovou za potenciometrické kontroly do pH 5.0, suspensi jsme ponechali při 37° C 2 hodiny, pak jsme upravili pH 1 n NaOH z pH 5 na pH 7.5, suspensi jsme potřepali s 30 ccm čistého etheru (bez stop peroxydu). Odstředili jsme a spodní čirou kapalinu odpipetovali. Zbytek jsme rozmíchali ještě s 50 ccm vody a znova jsme odstředili. Čirou spodní kapalinu jsme odpipetovali a přidali k prvé frakci delipidované suspense. Obě spojené frakce jsme okyselili znova 0.5 n kys. octovou do pH 4.5. Vyloučilo se malé množství sraženiny, které jsme oddělili odstředěním při 5.000–8.000 obrátkách. Svrchní tekutinu jsme odlili a sraženinu rozmíchali do 100 ccm 0.1 M fosfát. nárazníku o pH 7.5. Roztok jsme zno-

vu odstředili a čirý svršek jsme užili k inokulaci.

Natrávení trypsinem: Ke 100 ccm suspense míchy jsme přidali 100 mg trypsinu Merck a pH upravili 10% roztokem sody na 8.9, inkubovali 2 hodiny při 37° C. Pak jsme přidali 30 ccm etheru bez peroxydu, protřepali a odstředili. Čirou spodní kapalinu jsme odpipetovali. Zbytek jsme rozmíchali ještě s 50 ccm vody a znova odstředili, čirou spodní kapalinu jsme přidali k prvé, pH jsme upravili 0.5 kys. octovou na 4.5 a vzniklou sraženinu jsme odstředili. Svrchní tekutinu jsme odliši a sraženinu jsme resuspendovali do 10 ccm 0.1 M fosfátového nárazníku o pH 7.5. Nerozpuštěný podíl jsme odstředili a čirý supernatant užili k inokulaci.

Účinnost takto získaných přípravků, v jednom z optimálně probíhajících pokusů, je patrná z tabulky 12.

Jak patrno, výsledky této purifikační metody nejsou špatné, zejména když uvážíme, že konečný preparát byl zbaven balastních proteinů více nežli z 95%, jak určeno stanovením dusíku Kjeldahlovou metodou. Výchozí suspense obsahovala 0.6% bílkovin, kdežto konečný purifikát pouze 0.0031% bílkovin (purifikováno 200krát). Nutno ovšem doplniti, že i touži purifikační procedurou byla odstraněna část virového proteinu, neboť takto vyčištěný preparát byl přibližně 10krát méně účinný nežli suspense, z níž byl vyroben.

V docela poslední serii pokusů pak přezkoušena metoda purifikace protaminsulfátem, jak ji zavedli Warren, Weil, Russ a Jeffries¹⁴, jejíž provedení a výsledky jsou patrný z následujícího přehledu.

V našich pokusech jsme použili jako protaminu nám jedině přístupného*)

*) Za laskavé přenechání clupeinsulfátu děkujeme prof. Dru S. Šormovi.

Tabulka 12.

Zředění purifikátu při digesci	Koncentrace odpovídá susp. 10 ⁻¹	10krát zředěno odpovídá susp. 10 ⁻²
Poměr onemocnělých selat k inokulovaným po trypsinové digesci	2/3	1/1
Po papainové digesci	5/5	2/3

clupeinsulfátu. místo uvedenými autory použitého salminsulfátu. Podle našich zkušeností, kdy jsme zkoušeli protaminovou purifikaci na etherem delipidované míšní suspensi, sestává sediment kromě ze spolustrženého protaminu hlavně z lipoidů, lipoproteinů, nerozpustných buněčných fragmentů a celých buněk, neboť při použití nedelipidované suspenze byl sediment velmi mohutný, při použití delipidované byl nepatrný. Část použitého protaminu ovšem zůstává v čiré svrchní tekutině. Jmenovaným autorům se podařilo touto metodou rozdělit viry do 2 kategorií. V prvé jsou ty, jež po precipitaci protaminem zůstávají ve svrchní čiré tekutině a jsou tam obsaženy v relat. purifikovaném stavu. Sem patří na př. Poliomyelitis Lansing a většina transmisivních encephalitid. Viry z této kategorie lze ze svrchní čiré tekutiny dále vy-purifikovati některými fermenty, na př. krystalickým trypsinem. Druhá kategorie virů přechází téměř kvantitativně do precipitací vzniklého sedimentu. Sem patří na př. virus myší encephalitidy GD VII, vztekliny a influenze. Tato kategorie virů se hodí již méně k další purifikační proceduře natravením poměrně voluminosního sedimentu, lze však tohoto použít jako depot (analogon adsorbátových vakcín) k aktivní imunisaci¹⁷.

Naším úkolem bylo zjistiti: 1. vlastnosti viru Kloboukovy nemoci vzhledem k protaminu a jeho zařazení do jedné z těchto kategorií. 2. Pakliže by patřil do I. kategorie, určiti, zda je možno protaminovaného principu použíti jako prvého kroku, prakticky snadno proveditelného a efektivního, k další purifikaci. Při tom nás naše experimenty dovedly k tomu, že jsme si zčásti ověřili podstatu protaminové purifikace vůbec.

S protaminovanými purifikáty vykonána řada pokusů, z nichž některé uvádíme. Hned při prvém pokusu se ukázal překvapující zjev, že i vrchní čirá tekutina i bohatý sediment obsahují virus. Zdá se tedy, že virus Kloboukovy nemoci zaujímá intermediární posici mezi oběma svrchu citovanými kategoriemi, že totiž zčásti je precipitován, zčásti zůstává ve vrchní čiré tekutině. Podobný experiment proveden i s delipidovanou suspensi a zjištěno, že i v tomto případě virus mohl být na-

lezen jak v čiré tekutině nahoře, tak i v sedimentu. Prokázalo se dokonce, že čirá svrchní tekutina, zředěná 10krát i 100krát, obsahovala zjistitelná kvanta viru, při čemž desateronásobné zředění pravidelně usmrcovalo, stonásobné pouze někdy.

Proto jeden z nás modifikoval uvedenou metodu tím způsobem, že k nedelipidované neb etherem delipidované suspensi byl přidán koncentrovaný roztok (asi 20%) protaminsulfátu, aby jej na 1 ccm suspenze připadlo 5 mg. pH, které tím kleslo na 4.5, bylo ihned upraveno 0,5 n NaOH na pH 7, roztok byl uložen na půl hod. do lednice a pak teprve odstředěn. Supernatant byl čirý, slabě nažloutlý. Sediment, pokud ho bylo užito k inokulačím, byl 3krát promyt fysiologickým roztokem.

Dva orientační pokusy ukázaly, že i při této modifikaci se virus nachází jak v čiré svrchní tekutině, tak v sedimentu. Pro kvantitativní objasnění těchto výsledků byl proveden další pokus, při kterém sediment, získaný protaminovou precipitací, byl převeden do takového kvanta suspense, z něhož byl precipitací získán a kromě toho ještě dále decimálně ředěn. Při tom bylo použito naší modifikace, t. j. úpravy pH před centrifugací (co nejdříve po přidání protaminu). V tomto pokuse se ukázalo, že čirá svrchní tekutina po protaminové sedimentaci, ještě 10krát zředěná (odpovídá míše, ředěné 10^{-2}), u obou ze 2 použitých selat vyvolala příznaky s letálním koncem po relativně krátké inkubační době. Táž tekutina, zředěná 100krát (odpovídá míše 10^{-3}), ze 2 selat, i. c. očkovaných, vyvolala u jednoho smrtelné příznaky obrny. Protaminový sediment, naředěný do kvanta suspense, z níž precipitací vznikl (na př. sediment vznikl precipitací 10 ccm suspense 10^{-1} , po odcentrifugování resuspendován v pu-frovaném fysiologickém roztoku rovněž do kvanta 10 ccm), byl protřepán, aby dával pokud možno homogenní suspensi a dále ředěn v prvním pokuse 10krát, ve druhém 100krát.

Z obojího zředění 10krát i 100krát vstřiknuto i. c. vždy 2 selatům po kvantu 1 ccm, tedy stejně, jako svrchní čiré tekutiny. Výsledek byl překvapující, neboť obě selata, očkovaná 10krát a 100krát ře-

děným sedimentem, zašla na obrnu po stejně krátké inkubační době (8—12 dní), jako ona, očkovaná purifikovaným svrškem.

Výsledek tohoto experimentu je nesmírně zajímavý a těžko vysvětlitelný. Ukazuje totiž, že i purifikovaná svrchní tekutina i sediment obsahují přibližně stejná kvanta viru; co je však nejzáhadnější, každé z obou těchto kvant se prakticky rovná konečnému infekčnímu titru obrnového viru v míše, jak námi byl zjištěn v předcházejících pokusech. Přirozeně by bylo lze očekávat, že když se virus stejnoměrně rozdělí mezi precipitát a svrchní tekutinu, měla by každá z frakcí obsahovat pouze jeho poloviční množství. Není tedy vyloučeno, že princip protaminové purifikace znamená snad současně i prozatím nevysvětlitelné uvolnění viru, který by jinak zůstal vázán na částice CNS.

Celý tento pokus byl porovnán dodatečně s frakcemi, získanými kyselou precipitací podle Rackera, jak shora popsána. Při Rackerově metodě je používáno pouze sedimentu, získaného precipitací, kdežto tekutina, jež se odcentrifuguje, jest jako balastní odvrhována. V tomto pokuse byla však tato tekutina, a to dokonce 10krát, zředěná, použita k inokulaci a to v dávce 1 ccm i. c. Shledalo se, že obsahuje relativně značná kvanta viru, neboť obě selata, naočkovaná 10krát zředěnou svrchní tekutinou, jež zbude po kyselé precipitaci, těžce onemocněla po 11denní a 14denní inkubační době. Sediment (z něhož se při Rackerově metodě virus eluuje převedením do 10krát menšího kvanta lehce alkalického fysiolog. roztoku a pH 8) byl v tomto pokuse naředěn do původního objemu suspenze, z něhož získán (podobně jako v předchá-

zejícím pokuse s protaminem) a pak ještě dodatečně zředěn 100krát (odpovídá tedy sedimentu z míchy, ředěné přibližně 10^{-3}). Tabulka 13.

Celá tato serie pokusů ukazuje tato zčásti nová, zčásti námi dosud přehlédnutá fakta:

1. Purifikace viru protaminsulfátem jest co do aktivity precipitátu i supernatantu alespoň zčásti blízká, ne-li analogická kyselé precipitaci. Liší se však od ní tím, že při protaminové metodě snad dochází k prozatím záhadnému uvolňování většího množství viru, nežli ho lze přímo prokázati ve výchozí suspensi, jež byla k protaminové purifikaci použita.

2. Kyselá precipitace, t. j. převedení virové suspenze do blízkosti isoelektrického bodu, charakteristického pro virový mukleoprotein, podobně jako protaminová purifikace zanechává dostatečná kanta viru v balastní svrchní tekutině.

Přeneseno konkrétně na virus obrny vepřů znamená to, že bud' isoelektrický bod Kloboukova viru je nižší nežli pH 4 nebo že pro příliš velké množství balastních a protekčních látek, přítomných ve vepřovém CNS, nelze tento virus vůbec převésti kvantitativně do sedimentu.

Ačkoliv touto titrací zjištěno, že virus Těšínské choroby zůstává v tekutině, zbyvší po precipitaci protaminsulfátem slabě změnšen ve své aktivitě, byl učiněn pokus o optimální vyčištění viru papainovým natrávením protaminového purifikátu. Jeho výsledek lze viděti z tabulky 14.

Pochopitelně je velmi těžko stanoviti stupeň čistoty protamin — papainového purifikátu Kjeldahlovou metodou. Ukázalo se totiž, že při precipitaci clupeinsulfátem přechází část tohoto protamINU do precipitátu, ale nezjistitelná frakce

Tabulka 13.

Výchozí materiál: suspenze 10^{-1} .

Zředění	Koncentrované: purifikát odpovídá suspensi 10^{-1}	10krát zředěno	100krát zředěno
Supernatant při protaminové purifikaci	neděláno	2/2	1/2
Sediment při protaminové purifikaci	neděláno	2/2	2/2
Supernatant při kyselé precipitaci	neděláno	2/2	neděláno
Sediment při kyselé precipitaci	neděláno	neděláno	2/2

Tabuľka 14.

Zředění purifikátů	Koncentrovaný, odpovídá suspensi 10^{-1}		10krát zředěno	
	supernatant	sediment	supernatant	sediment
Frakce po protaminové purifikaci podrobena papainové digesci	-	-	-	-
Poměr onemocněvšich k inokulovaným	4/4	2/2	1/2	neděláno
Kontroly (suspense 10^{-1})			2/2	

zůstává v aktivní vrchní tekutině. Tato frakce pak spolu s použitým papainem zvyšuje kvantum dusíku, stanovitelné Kjeldahlovou metodou v purifikátu, takže skutečný a konečný obsah N purifikovaného viru je těmito faktory zastřen.

Jak patrno, zachoval si i tento purifikát značnou virovou aktivitu a bude námi — stejně jako pouze papainem natrávená míšní suspenze — použit v dalších pokusích ke koncentraci viru ultracentrifugou.

DISKUSE

Pokusili jsme přinésti některé nové poznatky, prohlubující podle našeho názoru znalost biologických vlastností viru inf. obrny veprů. Zvláště jsme pracovali na určení virologických faktorů, jež jsou u virů obrně blízkých již známy, u tohoto však dosud nikým nebyly podrobně studovány.

Dosud nejlépe byla propracována histologie CNS v průběhu experimentální nebo přirozené infekce veprů. Klobouk, Klobouk—Košťanský, Doubrava, později Fortner, Riedmüller, Lépine, Sven Gard, dále Horstmann — Manuelidis — Sprinz zjistili především komplex změn v míše, jenž je nápadně podobný změnám u lidské polio. Kromě toho však popisují také i rozsáhlé změny v mozečku, mozkovém kmeni a prodloužené míše (v thalamické krajině), v bulbus olfactorius a difusní lese i mozkové koře. Komplex histologických změn jest analogický oněm, jež byly nalezeny u hlodavčích encephalomyelitid (MM virus, GD VII), jednak se blíží (zvláště destrukcí Purkyňových buněk v mozečku) podle Horstmanna—Manuelidis—Sprinze „Japonské B encephalitidě“. Haškovec, který vyšetřoval histologicky

část našeho experimentálního materiálu, nachází též změny, podobné lidské poliomielitidě svou povahou, na rozdíl od ní však je prokazuje také i ve středním a zadním rohu míšním. Podobně jako předchozí autoři potvrzuje, že navíc proti lidské obrně není choroba omezena pouze na míchu s relativně malým zachvácením mozku, nýbrž i značně postihuje mozkový kmen a hemisféry.

Skupina posledně citovaných autorů se na základě histologického studia experimentální infekce veprů přiklání nejspíše k názoru, že Těšínská choroba je snad příbuzná Japonské B encephalitidě²². Naproti tomu Sven Gard tvrdí, že rozhodnutí může přinésti pouze podrobné studium samého viru. Podle svého vlastního studia, zejména zjištěním resistance viru na ether a schopnosti vylučovati se stolicí, jej řadí do blízkosti viru lidské polio, příp. skupině virů Coxsackie.

Naše práce měla v podstatě dvojí cíl: jednak jsme věřili, že prohloubeným studiem viru přispějeme k rozhodnutí otázky jeho taxonomie, za druhé jsme se snažili získati z CNS virus co možná nejčistší, který by byl vhodný pro studie elektrooptické, příp. biochemické a mohl sloužiti také jako specifický a účinný virový antigen.

Již v prvních pokusech o experimentální přenos bylo námi zjištěno, že jedinou, naprostě spolehlivou cestou infekce jest intracerebrální inokulace suspenze míchy, odebrané zvířeti v počátečních stadiích onemocnění a konservované na suchém ledu. Druhou nejúspěšnější cestou infekce je intranasální instilace viru, kdežto krmení virem a intraperitoneální injekce vedou k pozitivním výsledkům pouze méně pravidelně. Intramuskulární infekce, stejně jako subkutánní a intralinguální,

vedou ke klinickému onemocnění vzácně, intravenosní v našich pokusech nikdy. Uvážíme-li, že arthropody přenosné encephalitidy i C viry jsou snadno přenosné i cestou periferní inokulace, svědčí již tato zkušenost o podobnosti viru vepřové obrny s virem lidské poliomyelitidy.

Přesnými pokusy nalezeno, že větší kvanta viru obsahuje u pokusně infikovaného zvířete pouze CNS, nepravidelně také střevní obsah. Z CNS je daleko nejbohatší na virus mícha, zvláště její cervikální a lumbální část. Mozeček a mozkový kmen, příp. bulbus olfactorius, chovají prokazatelně menší kvanta viru nežli mícha, a to i v době, kdy klinické příznaky svědčí s jistotou pro jejich zahvácení (ataxie, konvulse).

Infekční titr viru v míše i v době, kdy je ho v ní nejvíce, t. j. na počátku onemocnění, je nízký. Námi propočítaná (podle Reeda a Muenche) průměrná hodnota PD_{50} se rovná 10^{-3} ,¹ jež jest přibližně stejná, jako ji zjistil Sven Gard.

Množství viru prokazatelného v míšní suspensi lze zvýšiti alespoň 6krát opakováním zmrazováním a roztáváním, ale ani tak nikdy nelze docílit infekčních titrů, charakteristických pro viry, arthropody přenosných encephalitid.

Viru v míše paralytického, ale přeživšího zvířete rychle ubývá, takže 5.—7. den od počátku onemocnění jej nelze již vůbec v ní dokázati.

Všechna tato uvedená fakta, zejména orgánová distribuce a nízký infekční titr viru ukazují na jeho podobnost s lidským virem polio. Zdá se však — podle našich dosavadních zkušeností — že eliminace viru Těšínské choroby střevem je méně pravidelná, alespoň při experimentální infekci intracerebrální cestou.

Ultrafiltrací kollodiovými membránami podařilo se nám stanoviti přibližnou velikost viru Těšínské choroby z CNS, a to přibližně na 25 mu (v rozmezí 20—28 mu), předpokládáme-li jeho sférickou podobu. Tyto rozměry se určitě blíží rozměrům viru lidské polio, udávané podle téže metodiky některými autory (C viry a Japonská B encephalitida se zdají spíše být menších rozměrů nežli virus vepřové encephalomyelitidy).

Možnosti experimentálního přenosu víru lidské polio jsou — jak známo — vel-

mi omezené, neboť pouze kmeny t. zv. typu Lansing jsou přenosny mimo opici také na hlodavce. Podle dosavadních zkušeností i našich pokusů se zdá, že virus Těšínské choroby je po této stránce ještě specifičejší. Nebylo totiž dosud možno, kromě na vepře (*sus scrofa domestica*) a jeho divokou odrůdu (*sus scrofa*), kteří se v našem pokuse ukázali býti přibližně stejně citlivými, přenést virus na vůbec žádné jiné domácí či laboratorní zvíře. Podle našeho názoru tato velmi omezená schopnost přenosu je jednou z nejtypičtějších charakteristik poliomyelitického viru. Ještě větší specifita víru Těšínské choroby je pravděpodobně způsobena tím, že vepř (*sus scrofa*) nemá prakticky blízkých zoologických příbuzných.

Virus lidské polio se dosud nepodařilo pomnožiti žádnou ze známých metod ve vyvíjejícím se kuřecím zárodku, čímž se velmi ostře odlišuje od víru encephalitid (včetně Japonské B), jež se množí relativně snadno, do vysokých titrů a zhusta zabíjí embryo za typických symptomů (viz Západní a Východní koňské encephalitidy). S výjimkou ojedinělých pokusů (Harnach), nepodařilo se dosud většině ostatních autorů vírus Těšínské choroby pomnožiti tímto způsobem, a to prozatím ani inaparentrně. Toto poslední prokázal i jeden ze serie našich pokusů, provedený ovšem pouze na našem pasážovém laboratorním víru.

Odolnost víru na teplo (suspenze míšní 10^{-1} je inaktivována 20 min. teplotou 65°C) a zejména účinost víru při širokém rozmezí pH (zůstává aktivním v rozmezí od pH 2,5 do pH 13 při 2 hod. působení) je velmi blízká resistenci víru lidské obrny. Naše pokusy rovněž zcela potvrďily Sven Gardovo zjištění necitlivosti víru Těšínské choroby na ether jež je tak veliká, že je možno delipidace míšní suspenze etherem používat jako pomocné metody k částečné purifikaci víru. I tato vlastnost ukazuje na obdobné chování víru lidské i vepřové obrny.

Na rozdíl od víru infekčních encephalomyelitid (zejména hlodavcích), lze vírus vepřové obrny sice částečně purifikovat, a to buď kyselou či methanolovou nebo acetonovou precipitací, ale každá z těchto metod současně vírus Těšínské choroby oslabuje značně v jeho aktivitě.

Precipitace míšní suspense clupeinsulfátem prokázala intermedierní postavení viru Těšínské choroby mezi těmi viry, jež zůstávají téměř kvantitativně v čiré svrchní tekutině a oněmi, jež jsou kvantitativně strhovány do sedimentu.

Za dosud nejúspěšnější a přitom naprostě jednoduchou metodu je možno považovat námi propracované natrávení míšní suspense papainem, kombinované purifikační procedurou, sestávající z delipidace etherem a kyselé precipitace. Touto cestou lze získati virus, jehož aktivita u dosud nejlepšího přípravku je pouze přibližně 10krát slabší nežli míšní suspense, z níž byl připraven, přičemž však množství proteinů (propočítáno podle N, určeného Kjeldahllovou metodou) se zmenší asi 200krát.

Je pravděpodobno, že touto metodou dosaženo purifikátu, příp. purifikátu, získaného papainovým natrávením suspense, vyjasněné protaminsulfátem (rovněž námi s úspěchem propracováno), bude lze použít jako výchozího materiálu pro koncentraci viru ultracentrifugou za účelem dalšího studia (elektronoptika, biochemie viru, koncentrovaný virový antigen).

V celku snad lze svrchu uvedenými faktami míti za prokázáno, že virus Těšínské choroby je svými biologickými vlastnostmi podobnějším viru lidské obrny, nežli virům arthropody přenosných encephalitid. Naše další sdělení ukáže, že týž virus jako antigen pro deviaci komplementu i při aktivní immunisaci má vlastnosti, jež ještě více zdůrazňují jeho podobnost (i když je antigenně odlišný) s virem lidské obrny.

RESUMÉ

Výsledkem serie pokusů, zaměřených k podrobnému studiu biolog. vlastností viru Encephalitis ezootica suum, jsou tato zčásti nově zjištěná, zčásti starší, námi nově ověřená fakta:

Virus Těšínské choroby je pravidelně v seriích přenosný cestou intracerebrální inokulace, použije-li se pasážové míchy zvířete zabitého v ataktickém stadiu onemocnění, konzervované na suchém ledu. Inkubační doba pro zvířata těžká mezi 10 až 25 kg, jimž vstřiknuto intracerebrálně

$\frac{1}{2}$ —1 ml centrifugované míšní suspense 10^{-1} nebo 10^{-2} , kolísá mezi 6 až 12 dnů.

Méně pravidelně úspěšnou je experimentální infekce cestou intranasální či intraperitoneální. Velmi vzácně lze přenést virus intramuskulárně, nikdy intravenosně (i při použití ohromných kvant viru se současným vstřiknutím hyaluronidasy).

Virus při prvních symptomech choroby je v nemocném zvířeti přítomen v největším kvantu v CNS. Z něho daleko nejvíce ho chová mícha, podstatně méně mozeček a mozkový kmen s olfaktorickým bulbem. V dalším průběhu choroby viru v mísce rychle ubývá, takže 5. až 7. den od počátku onemocnění nelze jej už vůbec experimentálně prokázat.

U zvířat infikovaných intracerebrálně nebyla námi prokázána eliminace viru stolicí, a to ani při kombinovaném inkulačním schematu intracerebrálním a intranasálním.

Množství viru v mísce i na počátku onemocnění je relativně malé, takže 50% paralytická dávka našeho laboratorního kmene viru byla námi propočítána podle Reeda a Muenche na $PD_{50} = 10^{-3.1}$, podle Kärbera na $PD_{50} = 10^{-3.0246}$.

Množství viru v míšní suspensi před centrifugací lze zvýšit rozbitím buněk centrálního nervstva alespoň 6kráte opakováním zmrazováním a tavením. Ani pak však infekční titr viru nedosahuje hodnot charakteristických pro arthropody přenosné encefalitidy.

Ultrafiltrací kollodiovými membránami byla námi určena přibližná velikost viru Těšínské choroby hodnotou kolem 25 mu (v rozmezí 20—28 mu), předpokládáme-li jeho shruba sférický tvar.

Virus Těšínské choroby se nám podařilo s jistotou přenést kromě vepře domácího pouze na vepře divokého, jenž je na intracerebrální infekci přibližně stejně citlivý (zkoušeno až do ředění 10^{-3}). Záhadnou zůstává Landryho paralysa u koťete, vypuklá po déle než měsíc trvající inkubační době po intracerebrální inokulaci viru Těšínské choroby. Stejně tak zůstalo nevysvětleno paretické onemocnění 2 mláďat syrských křečků, infikovaných intracerebrálně 8. den po narození.

Nepodařilo se nám pomnožiti náš laboratorní kmen viru Těšínské choroby žádnou z běžných metod v kuřecím embryu.

Virus je inaktivován v 10% míšní suspensi temperaturou 65° C za dobu 20 minut. Je-li částečně purifikován protamin-sulfátem, ničí ho již teplota 50° C za tu též dobu. Stejně purifikovaný virus je inaktivován 0.5% chloraminem za 5 minut. Táž koncentrace tohoto antiseptika ničí virus v 10% míšní suspensi až za 15 až 30 minut.

Virus Těšínské choroby je účinným při velmi širokém rozmezí pH, a to od pH 2.5 do pH 13 při 2hodinovém působení před inokulací. Podle délky inkubační doby se zdá, že alkalická pH, a to od pH 8—11 spíše zvyšuje aktivitu viru.

Virus vepřové obrny je prakticky necitlivý na ether, takže 30 objemovými procenty etheru delipidovaná míšní suspense si zachovává plnou účinost až do zředění 10^{-2} .

Virus lze z míšní suspensem částečně purifikovat buď kyselou precipitací nebo methanolem, či acetonom při temperatuře pod 0° C. Purifikáty však ztrácejí značně na původní aktivitě.

Při pokusu o purifikaci viru clupeinsulfátem jsme zjistili, že virus zůstává přibližně ve stejném kvantu i v čiré vrchní tekutině i přechází do sedimentu. Jelikož clupeinsulfát značně snižuje pH suspensem a působí tedy kromě adsorbce či snad chemické vazby také kyselou precipitaci viru, byla námi metodika amerických autorů takto modifikována: po přidání clupeinsulfátu zvýšeno pH ihned na 7,2 a pak teprve sediment odcentrifugován. I potom však virus zůstává rozdělen mezi čirý svršek a sediment.

V dalších srovnávacích pokusech shledáno, že protaminová purifikace viru vepřové obrny je skutečně částečně analogická purifikaci kyselou precipitací. Protaminová metoda je však šetrnější a výhodnější, neboť, jak se zdá, uvolňuje ze suspensem větší kvanta viru (jenž se ovšem dělí mezi svršek a sediment), než lze dokázat v též materiálu před purifikací. Protaminový purifikát viru Těšínské choroby lze ještě dále vyčistit natrávením

papainem, při čemž si zachovává relativně značnou virovou aktivitu.

Propracovali jsme novou metodu purifikace viru Encephalitis enzootica suum, a to přímým natrávením míšní suspensem papainem při pH 5.5, po níž následuje delipidace a kyselá precipitace viru. Konečný preparát je prakticky zbaven všech volných lipoidů CNS a obsahuje přibližně 200krát méně proteinů nežli suspensem, z níž byl připraven. Takto připravený virový purifikát je pouze jen asi 10krát méně aktivní nežli výchozí suspensem.

Podle souboru všech těchto uvedených vlastností viru obrny veprů se zdá, že tento má mnohem více podobností s virem lidské poliomyelitidy nežli s encephalitidami, přenosnými arthropody.

LITERATURA

1. A. Klobouk — Zvěrolék. rozpravy 1933, 85.
2. A. Klobouk — Zvěrolék. rozpravy 1933, 97, 133.
3. Doubrava-Kraus — Zvěrolék. obzor 1935, 93.
4. A. Klobouk — Zvěrolék. rozpravy 1935.
5. F. Scheuer — Zvěrolék. obzor 1936, 189.
6. K. Hruška — Zvěrolék. rozpravy 1938, 37.
7. J. Fortner — Zeitschr. für Infektionskrankh. u. Hyg. der Haustiere 1942, 81—123.
8. Festschrift prof. Dr Oscar Bürgi, Dr L. Riedmüller 1943, 275.
9. Gollan, Marvin — Proc. Soc. exp. Biol. & Med. 1948, 67.
10. P. N. Andrejev — Infekcionnye bolezni svin. Ogiz — Selchozgiz Moskva 1948.
11. Harnach — Referát na Sjezdu mikrobiologů, Karlovy Vary 1949. Dodatečně publikováno: Čas. čs. vet. 1950, 5, 2.
12. Gallia — Čas. čs. vet. 1949, 4, 403.
13. Roberts — Public Health Reports 1949, 64, 212.
14. Warren, Weil, Russ, Jeffries — Proc. Soc. exp. Biol. & Med. 1949, 662.
15. Patočka, Kubelka, Žáček — Biol. listy 1950, 31, 45.
16. P. Lépine, Atanasiu P. — Annales de l'Institut Pasteur 1950, 113.
17. A. Hansen, Holm P. — Acta path. microbiol. scand. 1950, XXVII, 882.
18. Sven Gard — Archiv f. die gesamte Virusforschung 1951, 249.
19. P. Lépine, Nantel A. — Annales de l'Institut Pasteur, 1951, 80, 231.
20. E. Pilet, Verge J. — Office Inter. des Epizoot. 1951.
21. R. Letort, Verge J. — Bull. Acad. Vet. 1951, 4, 195.
22. Horstmann, Manuelidis, Sprinz — Proc. Soc. exp. Biol. & Med. 1951, 77, 8.

Dědičnost je výsledkem koncentrace vlivů podmínek vnějšího prostředí, asimilovaných organismy v řadě předcházejících pokolení.

T. D. LYSENKO: O stavu současné biologie