

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

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

About Some biological Properties of the Hog Paralysis Virus

Prof. MUDr FR. PATOČKA, MUDr V. KUBELKA, RNDr K. SLAVÍK, MVDr J. BOHÁČ

Pokusili jsme se přinésti některé nové poznatky, prohlubující podle našeho názoru znalost biologických vlastností viru inf. obrny vepřů. 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 vepřů. 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 v mozkové koře. Komplex histologických změn je analogický oněm, jež byly nalezeny u hlodavčích encephalomyelitid (MM virus, GD VII), jednak se blíží (zvláště destrukcí Purkyňových buněk v mozečku) podle Horstmann - Manuelidise - Sprinze „Japonské B encephalitidě“. Haškovec, který vyšetřoval histologicky část našeho experimentálního materiálu, nachází též změny, podobné lidské poliomelytidě 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 vepřů přiklání nejspíše k názoru, že Těšínská choroba je snad příbuzná Japonské B encephalitidě. 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, naprosto spolehlivou cestou infekce je intracerebrální inokulace suspense 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 poliomelytidy.

Přesnými pokusy nalezeno, že větší kvanta viru obsahuje u pokusně infikovaného zvířete pouze CNS, nepravidelně také střevní obsah. Z CNS je daleko nej-

*) Diskuse z práce, otištěně (včetně literatury) ve Věstníku ČAZ, roč. 1951, č. 10.

bohatší 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 zachvácení (ataxie, konvulse).

Infekční titr viru v mísce 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 je přibližně stejná, jako ji zjistil Sven Gard.

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

Viru v mísce 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 víru 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 25μ (v rozmezí 20—28 μ), předpokládáme-li jeho sférickou podobu. Tyto rozměry se určitě blíží rozmezí viru lidské polio, udávané podle téže metodiky některými autory (C viry a Japonská B encephalitida se zdají spíše býti menších rozměrů nežli virus veprové encephalomyelityd).

Možnosti experimentálního přenosu viru lidské polio jsou — jak známo — velmi 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 specifitější. 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 viru na vůbec žádné jiné domácí či laboratorní zvíře. Podle našeho názoru tato velmi omezená schopnost přenosu je jednou z nejtypičtějších charakteristik poliomielitického viru. Ještě větší specifita viru 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 viru 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 virus Těšínské choroby pomnožiti tímto způsobem, a to prozatím ani inaparentně. Toto poslední prokázal i jeden ze serie našich pokusů, provedený ovšem pouze na našem pasážovém laboratorním viru.

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

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

Precipitace mísni suspensem clupeinsulfátem prokázala intermediérní 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 naprosto jednoduchou methodu 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 Kjeldahlovou metodou) se zmenší asi 200krát.

Je pravděpodobno, že touto methodou dosaženého 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, koncentrovany virový antigen).

Vcelku snad lze svrchu uvedenými faktyními 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.

Závěr. Výsledkem serie pokusů, zaměřených k podrobnému studiu biolog. vlastností viru Encephalitis enzootica 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, konсервované na suchém ledu. Inkubační doba pro zvířata těžká mezi 10 až 25 kg, jimž vstříknuto 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 vstříknutím hyaluronidásy).

Virus při prvých 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 inokulačním 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 Karbera na $PD_{50} = 10^{-3,0246}$.

Množství viru v míšní suspensi před centrifugací lze zvýšit rozbitím buněk centrálního nervstva alespoň 6kráte opakovaným 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 $25 \text{ } \mu$ (v rozmezí 20 — $28 \text{ } \mu$), 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 kotěte, vypuklou 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 pomnožit 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 protaminsulfátem, ničí ho již teplota 50° C za tutéž 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 účinnost až do zředění 10⁻².

Virus lze z míšní suspense částečně purifikovat buď kyselou precipitací nebo methanolem, či acetonem 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 suspense 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 suspense větší kvanta viru (jenž se ovšem dělí mezi svršek a sediment), než lze dokázat v témže 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 suspense 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 suspense, z níž byl připraven. Takto připravený virový purifikát je pouze jen asi 10krát méně aktivní nežli výchozí suspense.

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

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

Мы попытались получить некоторые новые сведения, углубляющие познание биологических свойств вируса инфекционного паралича у свиней. Главное наше внимание было обращено на определение вирулологических факторов, известных уже у инфекций близких параличу, но до сих пор еще ни кем не изученных.

До сих пор лучше всего была проработана гистология центральной нервной системы (ЦНС) во время экспериментальной или естественной инфекции у свиней. Клобоук, Клобоук — Коштянский, Доубрауа, позднее Фортнер, Ридмюллер, Лепинэ, Свен Гард, далее Горстманн — Мануэлидис — Спринц исследовали прежде всего комплекс изменений спинного мозга, который является весьма сходным с изменениями с человеческим полиомиелитом. Кроме того сообщают об обширных изменениях в мозжечке, мозговом стволе, (в продолговатом ростке спинного мозга), в bulbus olfactorius и диффузном лесе, а также и в мозговой коре. Комплекс гистологических изменений является ана-

*) Опубликовано в Вестнике Чехословацкой земледельческой академии № 10 1951 г.

логичным тем, которые были найдены у энцефаломиэлита грызунов (ММ вирус, GD VII), с одной стороны приближается в особенности деструкцией клеток Пуркине в мозжечке, по мнению Горстмана — Мануэлидиса и Спринца «Японскому В энцефалиту». Гашковец, который гистологически исследовал часть нашего экспериментального материала, нашел также изменения, похожие по своему характеру человеческому полиомиэлиту, но в отличие от него проявляется все же в переднем и заднем углах спинного мозга. Так же как и предыдущие авторы, он подтверждает, что в отличие от человеческого паралича, болезнь не ограничивается только спинным мозгом с относительно малым поражением его, но в значительной мере захватывает мозговой ствол и полушарии мозга.

На основании гистологического исследования экспериментальной инфекции свиней, последняя группа приведенных авторов склонна скорее к мнению, что Тешинская болезнь, вероятно, родственна «японскому В энцефалиту». Свен Гард, напротив, доказывает, что решение может принести только подробное изучение самого вируса. На основании своего личного изучения, особенно расследования стойкости вируса в эфиру и способности выделения со стулом, зачисляет его в ряды близких к человеческому полио или же к группе вирусов Caxsackie.

Наша работа имела две основные цели: с одной стороны мы верили, что дальнейшим изучением вируса поможем разгадке вопроса о его таксономии, а с другой стороны мы старались получить из ЦНС вирус по возможности наименее опасный, который был бы подходящим для электроноптического или биохимического изучения и мог бы быть так же как специфический и действующий вирусовый антиген.

Уже в первых опытах экспериментального переноса нами было установлено, что единственным и вполне положительным путем инфекции являются интракраниальные инокуляции супензии спинного мозга, взятого у животного в зачаточной стадии заболевания, и консервированного на сухом льду. Другим наиболее успешным путем инфекции является интранасальная инстиляция вируса, в то время как кормление вирусом и интраперитональные впрыскивания ведут к позитивным результатам не регулярно. Внутримышечные инфекции, так же как субкутальные и интравагинальные, ведут редко к клиническому заболеванию, интравенозные в наших опытах — никогда.

Примем ли во внимание, что артроподами переносные энцефалиты и С вирусы являются легко переносимыми путем периферийной инокуляции, свидетельствует уже этот факт о сходстве свиного вируса с вирусами человеческого полиомиэлита.

Точными опытами найдено, что большое количество вирусов у подопытного животного находится в ЦНС, и не всегда в содержании кишечек. Из ЦНС содержит больше всего спинной мозг, особенно его цервикальная и лумбальная часть. Мозжечок и мозговой ствол, или *bulbus olfactorius*, содержат явно меньшее количество вирусов чем спинной мозг, и даже в то время, когда клинические признаки указывают с полной гарантией их распространение (атаксия, конвульсии).

Инфекционный титр вирусов в спинном мозге бывает низкий и даже в то время, когда его в нем наибольшее количество т. е. в начале заболевания. Нами вычисленная (по Реду и Мюнху) средняя величина РД равняется $10^{-3,1}$ т. е. приблизительно такая же, как ее определил Свен Гард.

Количество вирусов в спинно-мозговой супензии, присутствие которых можно доказать, возможно повысить, по крайней мере в 6 раз повторным замораживанием и оттаиванием, но при этом никогда не возможно получить инфекционных титров, характеристических для вирусов, артроподами переносных энцефалитов.

Вирусы в спинном мозгу, парализованного, но пережившего животного быстро исчезают, так что на 5—7 день от начала заболевания уже не возможно их в нем найти.

Все вышеприведенные факты, особенно распределение их в органах тела и низкий инфекционный титр вирусов, подтверждают его сходство с человеческим вирусом полио. На основании нами проведенных опытов, повидимому можно утверждать, что элиминация вирусов Тешинской болезни кишечником является не регулярной, по крайней мере при экспериментальной инфекции интракраниальным путем.

Ультрафильтрацией коллоидными мембранными удалось нам определить приблизительный размер вирусов Тешинской болезни из ЦНС, который достигает приблизительно 25 мк (от 20 до 28 мк), предполагаем ли его сферическую форму. Эти размеры определенно приближаются к размерам вирусов человеческого полио, устанавливаемых на основании этого же метода некоторыми авторами. С вирусы и японский В энцефалит должны бы быть, скорее меньших размеров нежели вирус свиного энцефаломиэлита).

Возможности экспериментального переноса вируса человеческого полио, как известно, весьма ограничены, так как только виды так называемого типа Лансинг, являются переносными кроме на обезьян и на грызунов. На основании раньше произведенных исследований и наших опытов можно предполагать, что вирус Тешинской болезни является, в этом отношении, еще более специфическим. До сих пор пока не удалось, кроме домашней свиньи (*Sus scrofa domestica*) и ее дикой разновидности (*Sus scrofa*), которые в нашем опыте оказались приблизительно одинаково чувствительными, перенести вирус ни на одно домашнее или лабораторное животное. По нашему мнению эта, весьма ограниченная, способность переноса является одной из типичных характеристик полиомиэлитического вируса. Еще большая специфичность вирусов Тешинской болезни повидимому вызвана тем, что свинья (*Sus scrofa*) практически не имеет близких зоологических родственников.

Вирус человеческого полио до сих пор не удалось размножить ни одним известным методом в развивающемся зародыше цыпленка, чем весьма остро отличается от вирусов энцефалитов (включительно японских В), которые размножаются относительно легко, в высокие титры и часто убивают эмбриональный зародыш при типичных симптомах (см. Западные и Восточные конские энцефалиты). Кроме отдельных случаев (Гарнах) до сих пор не удалось большинству остальных авторов размножить вирус Тешинской болезни этим способом, и ни инапарентно. Тоже самое наблюдалось и в одном из серии наших последних опытов, проведенном, конечно, только на нашем лабораторном вирусе.

Сопротивляемость вирусов теплу (спинно-мозговая синтезия 10⁻¹, подверженная действию тепла 65° С в течении 20 минут) и особенно активность вирусов широких границах рН (вирус остается активным при рН от 2,5 до рН 13 при 2-х часовом воздействии) является весьма близкой сопротивляемости вирусов человеческого паралича. Наши опыты тоже всецело подтвердили открытия Свен Гара о нечувствительности вирусов Тешинской болезни к эфиру, и которая так велика, что есть возможность делипидации спинно-мозговой супензии эфиром употреблять как вспомогательного метода к частичной пурификации вирусов. И это свойство указывает на аналогичное поведение вирусов человеческого и свиного паралича.

В отличие от вирусов инфекционного энцефаломиэлита (особенно грызунов), можно вирус свиного паралича, правда, частично, пурifyовать кислотой, метаноловой или же ацетоновой преципитацией, но каждый из этих методов значительно ослабляет вирус Тешинской болезни в его активности.

Преципитация спинно-мозговой супензии клупеинсульфатом доказала интермедиарное положение вирусов Тешинской болезни среди тех вирусов, которые остаются, почти целиком в чистой верхней части жидкости и теми, которые в большом количестве осаждаются вместе с осадком.

Самым успешным и при том совершенно простым методом, можно считать нами разработанный метод натравления спинно-мозговой супензии папаином, комбинированной очистительной процедурой состоящей из делипидации эфиром и кислотой преципитацией. Таким путем можно получить вирус, активность которого у до сих пор наилучшего препарата, приблизительно только в 10 раз слабее, чем у спинно-мозговой супензии, из которой был приготовлен, при чем все же количество протеинов (вычислено по азоту (N), определенного методом Кьелдагла) уменьшится приблизительно в 200 раз.

Возможно, что этим методом полученный пурifikат или же пурifikат полученный папаиновым натравлением супензии, очищенной протаминсульфатом (тоже нами с успехом пробаротано), можно будет применить как исходный материал для концентрации вируса ультрацентрифугой с целью дальнейшего изучения (электроноптика, биохимия вирусов, концентрированный вирусовый антиген).

В общем, кажется можно считать вышеприведенными фактами доказано, что вирус Тешинской болезни своими биологическими свойствами более схож с вирусами человеческого паралича, чем с вирусами артроподами переносных энцефалитов. Наше дальнейшее исследование покажет, что тот же вирус как антиген для девиацию комплементов и при активной иммунизации имеет свойства, которые еще больше подчеркивают сходство (и даже когда антигено разный) с вирусом человеческого паралича.

Заключение. Результатом серии опытов, направленных к подробному изучению биологических особенностей вируса *Encephalomyelitis enzootica suis*, являются отчасти вновь установленные факты, отчасти старые, но нами снова проверенные.

Вирус Тешинской болезни является, как правило, переносным в сериях, путем интрацеребральной инокуляции, используется ли спинной мозг животного,

убитого в атактической стадии болезни и консервированного на сухом льду. Инкубационный период для животных весом между 10 и 25 кг., которыми вспринято интрацеребрально $\frac{1}{2}$ — 1 мл центрифужованной спинно-мозговой супензии 10^{-1} или 10^{-2} , колеблется между 6—12 днями.

Как правило, менее успешной является экспериментальная инфекция интранасальным путем или интраперитональным. Изредка можно перенести вирус интрамускулярно, но никогда интравенозно (и при применении больших доз вируса с одновременным впрыскиванием гиалуронидазы).

При первых симптомах болезни, вирус находится в больном животном в ЦНС. Большинство его находится в спинном мозге, относительно меньше в мозжечке и мозговом стволе с ольфакторическим бульбом. В дальнейшем течении болезни вирусы в спинном мозге быстро убывают, так что на 5—7 день от начала заболевания совершенно не возможно их экспериментально проявить.

У животных интрацеребрально инфицированных нами не была выявлена элиминация вирусов стула, а именно и не при комбинированной интрацеребральной и интранасальной схеме.

Количество вирусов в спинном мозге и в начале заболеваний является относительно малым, так что 50% доза нашего лабораторного вируса было нами вычислено по Рееду и Мюнхе на $PD^{50} = 10^{-3.1}$, по Керберу $PD^{50} = 3.0246$.

Количество вирусов в спинно-мозговой супензии перед центрифугированием можно повысить раздроблением клеток центральной нервной системы, по крайней мере 6 раз повторяющимся замораживанием и оттаиванием, но и потом инфекционный титр вирусов не достигает качеств характерных для артроподами переносных энцефалитов.

Ультрафильтрацией коллоидовыми мембранами нами была определена приблизительная величина вирусов Тешинской болезни, которая составляла около $25 \text{ m}\mu$ (от 20 до 28 $\text{m}\mu$), предполагаем ли у них сферическую форму.

Нам удалось перенести с полной гарантией вирус Тешинской болезни кроме домашней свиньи только на свинью дикую, которая почти одинаково чувствительна к интрацеребральной инфекции (испытано вплоть до разжижения 10^{-3}). Остается загадочным паралич Ландра у котенка, который обнаружился больше чем месяц продолжающегося инкубационного периода, по интрацеребральной инокуляции вирусов Тешинской болезни. Не объясненным осталось также и паретическое заболевание двух детенышей сирийских хомяков, интрацеребрально инфицированных на 8-й день рождения.

Ни одним обычным методом нам не удалось размножить лабораторное племя вирусов в зародыше цыпленка.

Вирус является инактивированным в 10% спинно-мозговой супензии при температуре 65°C в течении 20 минут. Если отчасти очищен протаминальфатом, уничтожает его уже теплота в 50°C за тоже время. Однаково очищенный вирус является инактивированным 0.5% хлорамином в течении 5 минут. Также концентрация данного антисептика уничтожает вирус в 10% спинно-мозговой супензии даже за 15—30 минут.

Вирус Тешинской болезни является действующим при весьма широких границах, а именно: от рН 2.5 до рН 13 при двухчасовом воздействии перед инокуляцией. По продолжительности инкубационного периода, можно предполагать, что алкалическая рН, а именно от рН 8 — II скорее повышает активность вирусов.

Вирус свиного паралича практически не чувствителен на эфир, так что 30 объемовыми процентами эфира делипидированная спинно-мозговая супензия сохраняет свое полное воздействие даже до разбавления 10^{-2} .

Вирус спинно-мозговой супензии можно отчасти пурифицировать или кислой преципитацией или метанолом, или же ацетоном при температуре ниже 0°C . Пурификаты все же значительно теряют на первоначальной активности.

При опыте пурификации вирусов клупеинсульфатом мы обнаружили, что вирус остается приблизительно в одинаковом количестве и, только в верхнем слое жидкости, и переходит в седимент. Так как клупеинсульфат значительно снижает рН супензии и влияет, таким образом кроме адсорбции или может быть химического склеивания тоже кислой преципитацией вирусов, метод американских авторов нами был модифицирован так: после прибавления клупеинсульфата повышенна рН сразу же на 7.2 и только теперь седимент отцентрифугирован. И все же и потом вирус остается разделенным между чистым верхом и седиментом.

В дальнейших сравнительных опытах обнаружено, что протаминовая пурификация вирусов свиного паралича является действительно отчасти аналогичной пурификации кислой преципитацией. Но протаминный метод является более экономным и выгодным, так как, кажется, освобождает из супензии большее

количество вирусов (который, безусловно, делится между верхом и седиментом), прежде чем можно доказывать в том же материале перед пурификацией. Протаминовый пурификат вирусов Тешинской болезни можно и еще больше вычислить натравлением папаином, при чем он сохраняет относительно большую активность вирусов.

Мы проработали новым методом пурификацию вируса *Encephalitis enzootica suum*, а именно прямым натравлением спинно-мозговой суспензии папаином при pH 5.5, после которой следует делипидация и кислая преципитация вирусов. Законченный препарат является практически очищенным от всех свободных липоидов ЦНС и содержит приблизительно в 200 раз меньше протеина нежели суспензия, из которой был приготовлен. Таким образом приготовленный вирусный пурификат является почти в 10 раз менее активным чем исходная суспензия.

После рассмотрения всех вышеупомянутых свойств вируса свиного паралича кажется, что этот вирус имеет гораздо большее сходство с вирусом человеческого полиомиэлита, нежели с энцефалитами перенесенными антроподами.

About Some biological Properties of the Hog Paralysis Virus*)

We have tried to bring some new facts that, in our opinion, enrich the knowledge of the biological properties of the infectious hog paralysis virus. We have been working particularly on the determination of virological factors which are already known in viruses similar to pig paralysis, have, however, not yet been studied in detail by anybody in this virus.

So far it has been the histology of the CNS that has been best elaborated in course of experimental or natural infection of swine. Klobouk, Klobouk-Koštanský, Doubrava, later on Fortner, Riedmüller, Lépine, Sven Gard, further Horstmann-Manuelidis-Sprinz, have, above all, ascertained a complex of changes in the spinal cord, strikingly resembling the changes in poliomyelitis. Besides this, they describe also extensive changes in the cerebellum, brain stem, and medulla oblongata (in the thalamic region), in the bulbus olfactorius, and diffuse lesions in the cortex. The complex of histological changes is both analogous to those ascertained in the rodent encephalomyelitides (MM virus, GD VII), and approaches (particularly by the destruction of the Purkinje cells in the cerebellum), according to Horstmann-Manuelidis-Sprinz, Japanese B encephalomyelitis. Haškovec, who has carried out a histological examination of part of our experimental material, finds also changes similar in character to those in poliomyelitis, in distinction to it, however, he proves them also in the central and posterior horns of the spinal cord. Like the above authors, he confirms that, as distinguished from poliomyelitis, the disease is not limited to the spinal cord only with a relatively small affection of the brain, but that it, in addition, attacks largely also the brain stem and the hemispheres.

The group of the last-mentioned authors is, on the basis of histological studies of the experimental infection of pigs, most inclined to the opinion that the Těšín disease may be related to Japanese B encephalitis//.

Sven Gard, on the other hand, maintains that only a detailed study of the virus itself may bring a decision. According to his own study, particularly in regard to the determination of the resistance of the virus to ether and to its capability of being excreted by feces, he places it in the group of the polio viruses or, perhaps, of the group of the Coxsackie viruses.

Our work had, in fact, a double aim: firstly, we believed that by a detailed study of the virus we should contribute to the solution of the problems of its taxonomy and, secondly, we were trying to obtain from the CNS the purest possible virus that would be suitable to electronoptical or biochemical studies and might serve, at the same time, as a specific and effective virus antigen.

In the very first attempts at experimental transmission, we have ascertained that the only one absolutely dependable route of infection is intracerebral inoculation with the cord suspension obtained from an animal in the initial stages of disease, preserved on dry ice. The other most successful route of infection is intranasal instillation of virus, whereas feeding virus and intraperitoneal injections lead to positive results only with less regularity. Intramuscular infection, like subcutaneous and intralingual infection, entail clinical affection only rarely, intravenous, in our experiments, never. If we consider that arthropod-borne encephalitides and C viruses are easily transmitted even by peripheral inoculation, this very experience argues the resemblance of the hog paralysis virus to the poliomyelitis virus.

It has been found out by exact experiments that larger amounts of virus are present only in the CNS, irregularly also in the intestinal contents, of experimentally infected animals. Of the whole CNS, the spinal cord, particularly its cervical and lumbar levels, is by far the richest in virus. It may be demonstrated that the cerebellum, brain stem, or bulbus olfactorius, contain smaller amounts of virus than the spinal cord, even at a time when clinical symptoms argue with certainty their being affected (ataxy, convulsions).

The infective titer of virus in the spinal cord is low even at the time when most of it is present, i. e. at the beginning of the disease. The mean PD₅₀ value calculated by us (according to Reed and Muench) is equal to 10—3,1, which is approximately the same as ascertained by Sven Gard.

*) Published in extenso: Věstník Československé akademie zemědělské, October 1951.

The amount of virus that may be demonstrated in the cord suspension may be increased by freezing and thawing repeated at least six times; not even in this way, however, is it possible to attain infective titers characteristic of viruses of arthropod-borne encephalitides.

The virus in the spinal cord of a paralyzed but surviving animal decreases rapidly; it cannot be proved in it on the 5th to 7th day since the beginning of the disease.

All the facts presented, particularly the distribution of the virus in the organs and low infective titer suggest its similarity to the virus of poliomyelitis. It seems, however—according to the experience we have had so far that excretion of the Těšín disease virus by feces is less regular, at least in experimental infection by the intracerebral route.

We succeeded in determining the approximate size of the Těšín disease virus from the CNS, by ultrafiltration through collodion membranes, at $25\mu\mu$ (in the range of $20-28\mu\mu$) assuming its having a spherical shape. This size definitely approaches the size of the poliomyelitis virus obtained by some authors using the same method. (The C viruses and Japanese B encephalitis virus seem to be of a rather smaller size than the virus of hog encephalitis.)

The possibilities of experimental transmission of the poliomyelitis virus is—as is known—very limited, as only the strains of the so-called Lansing type can be transmitted besides to the monkeys also to rodents. The Těšín disease virus seems to be—according to the experience and experiments we have made so far—still more specific in this respect. So far, it has been impossible to transmit the virus to any domestic or laboratory animal except the hog (*Sus scrofa domestica*) and its wild species (*Sus scrofa*) which proved in our experiment approximately equal susceptibility. This very limited transmissibility is, in our opinion, one of the most typical characteristics of the poliomyelitis virus. The still greater specificity of the Těšín disease virus is probably caused by the hog (*Sus scrofa*) having practically no near zoologic relations.

The poliomyelitis virus has not yet been grown by any of the known methods in developing chicken embryo, by which it is sharply distinguished from the viruses of encephalitides (including Japanese B) which multiply relatively easily, up to high titers, and frequently kill the embryos displaying typical symptoms (cf. Western and Eastern equine encephalitides). With the exception of a few sporadic experiments (Harnach), most other authors have failed so far in growing the Těšín disease virus in this way; for the present, they have not been able to grow it even apparently. This last-mentioned fact has been proved by one of our series of experiments carried out, naturally, only on our passaged laboratory virus.

The resistance of the virus to heat (a 10% cord suspension is inactivated by heating to 65°C for 20 minutes) and particularly the activity of the virus at a wide pH range (it remains active at pH 2.5 to 13 when acted upon for two hours) are very near to the resistance of the poliomyelitis virus. Our experiments have, likewise, fully confirmed Sven Gard's ascertainment of the insensitivity of the Fěšín disease virus to ether, which is so great that delipidation of cord suspension by ether may be used as an auxiliary method for partial purification of the virus. Even this property suggests an analogous behavior of the poliomyelitis and the pig encephalomyelitis viruses.

In distinction to viruses of infectious (particularly rodent) encephalomyelitides, the hog paralysis virus may be partially purified, namely by acid or methanol or aceton precipitations, but each of these methods, at the same time, weakens considerably the activity of the Těšín disease virus.

The precipitation of cord suspension by clupeinsulphate has proved the intermediary position of the Těšín disease virus, among the viruses that remain in the clear supernatant and those that are precipitated into the sediment.

The papain-digestion of the cord suspension (combined with a purification procedure consisting of delipidation with ether and of acid precipitation) which has been elaborated by us, may be considered as the hitherto most successful and, at the same time, absolutely simple method. In this way, a virus may be obtained whose activity in the best preparate is only about ten times weaker than the cord suspension it has been prepared from, the amount of proteins (calculated by N determined by Kjeldahl's method) being reduced about 200 times.

The purificate obtained by this method or the purificate obtained by papain-digestion of the suspension clarified by protaminesulphate (which we likewise succeeded in working out), is very likely to prove a suitable original material for the concentration of virus by the ultracentrifuge with a view to further investigation (electronoptics, biochemistry of the virus, concentrated virus antigen).

On the whole, it may be considered as proved by the above facts that the Těšín disease virus bears, as to its biological properties, more resemblance to the poliomyelitis virus than to the viruses of arthropod-borne encephalitides. Our further communication will show that the same virus as an antigen for the complement deviation even in active immunization has properties stressing still more its resemblance to the poliomyelitis virus (in spite of the different antigens).

S u m m a r y. The result of a series of experiments bearing on a detailed study of the biological properties of the virus of Encephalitis enzootica suis, are the following facts, partly newly ascertained, partly older, newly proved by us:

The Těšín disease virus is regularly transmissible in series by the route of intracerebral inoculation, if we use the passaged spinal cord of an animal killed in the atactic phase of the disease, preserved on dry ice. The incubation period for animals weighing 10 to 25 kg, inoculated intra-

cerebrally with $\frac{1}{2}$ —1 ml of centrifuged 10⁻¹ to 10⁻² cord suspension, varies from 6 to 12 days.

Experimental infection by the intranasal or intraperitoneal route succeeds with less regularity. Very rarely may the virus be transmitted intramuscularly, never intravenously (not even if we apply enormous amounts of virus with simultaneous injection of hyaluronidase).

At the time of the first symptoms of the disease, the largest amount of the virus is present in the CNS of the diseased animal. Of this, the spinal cord contains by far the largest amount of the virus, a much smaller amount is found in the cerebellum and brain stem with the bulbus olfactorius. In the further course of the disease, the amount of virus in the spinal cord decreases rapidly so that on the 5th to 7th day since the beginning of the paralytic phase it cannot, experimentally, be proved at all.

In animals infected intracerebrally, we could not prove excretion of virus by feces, not even when using a combined intracerebral and intranasal inoculation scheme.

The amount of virus in the spinal cord is relatively small even at the beginning of the disease, so that the 50 p. c. paralytic dose of our laboratory virus strain has been calculated according to Reed and Muench as being PD₅₀ = 10^{-3.12}, according to Kärber as PD₅₀ = 10^{-2.06}.

The amount of virus in the cord suspension before centrifugation can be increased by disruption of the cells of the central nervous system by an at least six times repeated freezing and thawing. Not even then, however, does the infective titer of the virus attain values characteristic of the arthropod-borne encephalitides.

We have determined the approximate size of the Těšín disease virus by ultrafiltration through collodion membranes as being about 25 $\mu\mu$ (in the range of 20—28 $\mu\mu$), on the assumption of its having a more or less spherical shape.

With certainty we succeeded to transmit the Těšín disease virus besides the pig only to the wild boar which possesses approximately the same susceptibility to intracerebral infection (up to a 10³ dilution). Landry's paralysis in a kitten that broke out, after a more than four weeks' incubation period, subsequent to intracerebral inoculation with the Těšín disease virus, remains a mystery. Likewise, the paralytic disease of two young Syrian hamsters infected intracerebrally on the 8th day after birth, remains unexplained.

We have failed in trying to grow our laboratory Těšín disease virus strain in chicken embryos, though we were using all current methods.

The virus is inactivated in a 10 p. c. cord suspension at a temperature of 60° C after 20 minutes. On partial purification by protaminesulphate, it is destroyed even at a temperature of 50° C after the same period. The same purified virus is inactivated by 0.5 p. c. chloramine in 5 minutes. The same concentration of this antiseptic destroys the virus in a 10 p. c. cord suspension only after 15 to 30 minutes.

The Těšín disease virus is active at a very wide pH range, namely from pH 2.5 up to pH 13, when acted upon for two hours previous to inoculation. It seems, judging by the length of the incubation period, that alkaline pH (from pH 8 to 11) rather increases the activity of the virus.

The hog encephalomyelitis virus is practically insensitive to ether so that a cord suspension delipidated with 30 p. c. by volume of ether retains full activity up to 10⁻², the dilution 10⁻² gives less regularly severe paralysis in comparison with a dilution 10⁻³ of a non-delipidated suspension.

The virus from cord suspension can be partly purified either by acid precipitation, or methanol, or aceton, at a temperature below 0° C; the purificates, however, are less active than the original virus suspension.

In an attempt at purifying the virus by clupeinsulphate, we have found that approximately equal amounts of the virus both remain in the clear supernatant and pass into the sediment. Since clupeinsulphate considerably reduces the pH of the suspension and, consequently, causes besides adsorption or, perhaps, chemical bond, also acid precipitation of the virus, we have modified the method of the American authors in the following way: on adding clupeinsulphate, pH was immediately raised to 7.2 and only then the sediment was centrifuged. Even then, however, the virus remained divided into the clear supernatant and the sediment.

In further comparative experiments it has been found that the protamine purification of the hog paralysis virus is in fact partly analogous to purification by acid precipitation. The protamine method, however, is more economic and advantageous, since, as it seems, it releases from the suspension larger amounts of virus (which, of course, divides into supernatant and sediment) than can be proved in the same material before purification. The protamine purificate of the Těšín disease virus may be further purified by papain-digestion, on which procedure it retains a relatively considerable virus activity.

We have elaborated a new method of purification of the encephalitis enzootica suum virus which consists in direct digestion of the cord suspension with papain at pH 5.5, followed by delipidation and acid precipitation of the virus. The final preparate is practically stripped of all free lipoids of the CNS and contains approximately 200 times less proteins than the suspension it has been prepared from. The virus purificate prepared in this way is only about 10 times less active than the original suspension.

According to the complex of all the properties of the hog paralysis virus listed here, it seems that it bears much more resemblance to the poliomyelitis virus than to the viruses of arthropod-borne encephalitides.