

**Československá  
hygiena, epidemiologie, mikrobiologie**

**ROČNÍK II.**

**ÚNOR 1953**

**Číslo 1**

# PŮVODNÍ PRÁCE

Z laboratoře pro studium inf. obrny veprů při Ústavu pro lék. mikrobiologii a imunologii K. U. v Praze.

## PŘÍSPĚVEK K IMUNOLOGII NAKAŽLIVÉ OBRNY VEPŘŮ (ENCEPHALOMYELITIS ENZOOTICA SUIS)

Dr FRANTIŠEK PATOČKA — Dr VLADIMÍR KUBELKA —  
MUDr JIŘÍ BOHÁČ

Práce vykonána za podpory ministerstva zemědělství v Praze. Přednesena na schůzi Mikrobiologické sekce společnosti J. E. Purkyně v lednu 1952.

Imunita a možnosti aktivní imunisace byly a jsou pochopitelně nejvíce studovanou kapitolou odborných znalostí o Těšínské či Kloboukově chorobě veprů. Důvodem jsou těžké národochospodářské ztráty, jež působí tato (lidské polio zčásti podobná), Trefným klinicky a Kloboukem pathologicky, virologicky a v základních rysech imunologicky po prvé zpracovaná nemoc vepřového bravu.

Prvá zjištění o imunitě jsou nesporné dílem československých autorů (Klobouk<sup>1</sup>) Doubrava,<sup>2</sup>) Hruška<sup>3</sup>) a prokázala celkem jasně imunogenní vlastnosti živého viru, vstříknutého subkutánně. Hruška a Košťanský 1939 propracovali methodu simultánní imunisace, jež byla experimentálně ověřena, ale praxí nemohla být dostatečně zhodnocena. Následuje řada prací československých i cizích, udávajících methodu přípravy vakcín s inaktivovaným virem, zachyceným buď v terénu nebo z laboratorních pasáží. Zdrojem viru byla převážně směs suspense míšní i mozkové, inaktivaci činidly byl buď fenol (Klobouk), nebo formaldehyd (Fortner,<sup>4</sup>) Traub<sup>5</sup>) a většina ostatních), či glycerin buď opět s fenolem nebo formaldehydem (Elek a Kertay).<sup>6</sup>) Nověji potencován účinek vakciny adsorpcí inaktivované suspense na aluminium-hydroxyd (Traub, Hruška,<sup>7</sup>) či Yellonu (Harnach).

Neškodnost a účinnost všech těchto vakcín — jejichž způsob zhodovení je udán v citované literatuře — zkoušena zčásti laboratorním pokusem, zčásti terénní zkušeností. Obojí je udáváno různě. Protekce zkoušena intracerebrální i intranasální infekcí (většinou neudáno, kolika smrtelnými dávkami) a je odhadována při různých metodách číslu, kolísajícími mezi 30—65% imunisovaných zvířat, u malého počtu zvířat v pokuse i většími ciframi. Statistické údaje o výsledcích v terénu se zčásti vůbec vymykají přesnému posouzení a to nejen pro různost metodiky při výrobě vakciny, ale hlavně pro diametrální rozdíly v epidemiologické a hygienické situaci očkovacích zvířat.

I neškodnost očkovacích látek je velmi různě hodnocena — někteří přímo uvádějí, jiní alespoň naznačují domněnku — že mohou obsahovat stopy aktivního viru (Klobouk, Harnach, Hruška, snad i Traub). Zcela

rozdílné či neurčité jsou údaje o délce trvání dostatečně vysokého stupně imunity po vakcinaci.

Vcelku lze shrnouti, že dosavadní pokusy i zkušenosti prokázaly, že imunita může být jak důsledkem přirozené infekce (třeba inaparentní), tak ji lze v různě vysokém stupni docílit aktivní imunisaci. V seru imunních zvířat prokázány zásadně protilátky (Klobouk, Hruška, Koštanský, Lépine,<sup>8</sup>) Fortner), jež nemají prakticky léčebného vlivu na průběh choroby zvířete, byly-li vstříknuty po objevení se prvních symptomů.

Jako fakt, vzácně harmonující se zkušenostmi u lidské polio ověřeno, že imunitní stav CNS nemusí zabránit eliminaci viru stolicí, tedy pravděpodobně infekci, probíhající v mimonervovém systému zvířete (Klobouk — ústní sdělení).

Souborné hodnocení všech v přehledu uvedených prací a zkušenosti není soudněm této publikace. Zevrubnější údaje toho druhu přinášeji monografie Andrejevova,<sup>9</sup>) souborná práce Kaplanova a Meranzova,<sup>10</sup>) článek Hruškův, Heckeho<sup>11</sup>) a zejména Piletův a Kodrnjův referát z XX. sezení komitétu Office International des épizooties.<sup>12</sup>)

Nás zaujal zkraje jiný díl, nežli celkem empirické vypracování nějaké nové modifikace očkovací látky proti obrně veprů — takových pokusů a jistě korunovaných alespoň částečným úspěchem bylo i u nás učiněno dosti. Částečně vyzbrojeni prohloubenými znalostmi biologických vlastností viru obrny (Patočka, Kubelka, Slavík)<sup>13</sup>) a opírajíce se o analogie s lidskou polio (Patočka et al., Sven Gard,<sup>14</sup>) Lépine), jež jsou v lecčems dosti hluboké a podstatného rázu, umínili jsme si řešit imunologické problémy Těšínské nemoci více theoreticky a pokusit se o doplnění mezer světových znalostí tohoto viru tam, kde je to možné a nutné.

Přitom se, celkem nečekaně, ukázalo, že naše laboratorní metoda, zaměřená původně jen k rychlému získání hyperimunních kusů pro studium zkřížené imunity a produkci sera ke kvantitativním studiím seroneutralisačních protilátek, je výbornou aktivní imunisací vůbec a pochopitelně přezkoušen i její terénní aspekt.

Prvé, s čím jsme nemohli do všech důsledků souhlasit, byl snad až přílišný optimismus, jejž projevovali některí autoři vakciny proti obrně, kteří zřejmě věřili, že se relativně standardně opakoványmi metodami podaří snadno vyhodit vepróvou obrnu z tak promořeného terénu, jakým je střední Evropa.

Shora jsme již uvedli, že zásadně nepochybujeme o možnosti úspěchu. Při hlubším aspektu se však zdá, že celý problém je patrně téměř stejně nesnadný, jako aktivní imunisace u lidské polio, kde nutno přiznat, že přes 20 let intensivní bádání nepřineslo až do poslední doby hmatatelného praktického užitku, pomohlo však objasnit celou biologii polioviru a otevřelo zcela nové obzory.

Dnes je u polio natolik jasno, že lze i periferním očkováním vyvolati u opic či bavlníkových krys (u typu Lansing) imunitu tak vysokého stupně, že chrání nesporně i proti intracerebrální infekci mnoha desítkami až stovkami paralytických dávek polio homologního typu. Ovšem není to snadné. Starší práce většinou diskutují o hodnotě vákciny s aktivním virem (př. Aycock-Kagan),<sup>15</sup>) nebo inaktivovaným formolem či ultrafialovými paprsky za případné adsorpce na Al(OH)<sub>3</sub> (Brodie,<sup>16</sup>) Melzer et al.,<sup>17</sup>) Kramer et al.).<sup>18</sup>) Ačkoliv pokusy jsou staršího data a neužívají k hodnocení účinku přísně kvantitativních metod, je již z nich jasně patrná imunogenní superiorita živého viru.

Novější práce (Loring, Schwerdt et al.)<sup>19</sup>) správně ukazují dosud málo povšimnutou, ale zásadně důležitou problematiku inaktivace viru

formaldehydem v husté (ve veterinárním lékařství často dokonce necentrifugované) suspensi míšní. Je jasno, že pro takto husté suspense z CNS nelze prakticky vůbec určit dávku formaldehydu, nutnou právě jen k inaktivaci viru. Bud' se ho dává málo a pak nelze mluvit o inaktivní vakcině (viz správnou skepsi našich autorů shora zmíněnou), nebo příliš mnoho, čímž se jednak již při inaktivacním procesu, ale hlavně i při skladování snižuje progresivně její imunogenní hodnota (Hruška).<sup>7</sup>) Doporučují proto částečnou purifikaci a koncentraci viru (diferenciální ultracentrifugací), který v koncentrovaném stavu i po inaktivaci vyvolává solidní imunitu, ovšem i tak pouze po 3 injekcích, oddělených 8denním intervalom. Morganova<sup>20</sup>) přímo titrací ohodnotila stupeň imunity, jejž vyvolají u opic 4 intramuskulární injekce živého viru a nalezla, že přibližně téže hladiny lze při použití viru, šetrně inaktivovaného, dosáhnouti až asi 10 injekcemi stejných dávek. Konečně Schwerdt, Dick et al.<sup>21), 22)</sup> titrovali přesně antigenní hodnotu formaldehydem nebo ultrafialovými paprsky inaktivované a aktivní vakciny z polio typu Lansing imunisací bavlníkových krys. Ukázalo se, že živá vakcina je 125 až 5000krát účinnější nežli inaktivní tak pečlivě připravená, že v ní byl formaldehyd po určité době působení dokonce neutralisován, aby neničil dále její antigenní hodnotu.

Celkem nespadá methodicky do rámce této práce, ale je velmi zajímavé si uvědomit, že lze u lidské polio vyvolat takový stupeň imunity, jenž zabrání paralytické infekci i perorálním podáním živého viru a to jak u šimpanzů (Howe, Bodian, Morganová),<sup>23)</sup> tak dokonce i u člověka, kde samozřejmě použít kmen o zvláště malé virulenci (Koprowski, Jervis, Norton).<sup>24)</sup> Konečně nutno uvážit pokrokové směrnice sovětských autorů vůbec, kteří, kde to jen možno, užívají k docílení optimálních stupňů imunity živých bakterií, rickettsií, a hlavně virů o snížené virulenci (Chalkina).<sup>25)</sup>

Pochopitelně si uvědomujeme, že řada autorů (Hammon a jiní<sup>26</sup>),<sup>27)</sup> předkládá k velmi vážné úvaze, zda je vůbec možno, vhodno a do jaké míry má smysl — při nesmírném rozšíření polio na světě — pokusit se v široké míře o likvidaci tohoto onemocnění aktivní imunisací. Mnoho důvodů, zejména epidemiologických, jež se v této souvislosti uvádějí, platí jistě i pro vepřovou obrnu. Zde ovšem je naše vědění ještě příliš kusé, než abychom mohli dělat přímé srovnání. Tolik však již nyní pokládáme za jisté, že to nebude a nesmí být jen aktivní imunisace, jež jednou pomůže vyhodit tuto chorobu, nesporně po světě mnohem rozšírenější, než se myslilo.

## I. AKTIVNÍ IMUNISACE S LIPIODNÍMI ADJUVANCIAMI.

Jak dříve naznačeno, stáli jsme při svých pokusech o rychlou hyperimunisaci před problémem použíti živého či inaktivovaného viru. Naše volba byla snadná a jasná tím spíše, že při laboratorních pokusech jsme mohli riskovat event. onemocnění některého zvířete. Naše dřívější práce (Patočka-Kubelka-Slavík-Boháč) prokázala jasně, že obsah viru v CNS je de norma malý [ $PD_{50}^*$ ) =  $10^{-3.1}$ )] a to platí více méně jen pro míchu — mozek a mozeček jsou dle téže práce ještě zřetelně chudší. Naše zjištění potvrdil ostatně i Sven Gard a nálezy

\*)  $PD_{50}$  = dávka viru vyvolávající v 50% těžkou paralytickou infekci.

vyšších titrů jsou zcela výjimečné. Uvážíme-li k tomu, že podle všech dosavadních imunologických zkušeností není virus Těšínské choroby právě vynikajícím antigenem (což jsme i přímo později dokázali) a je v CNS dospívajícího vepře zabalen ve zcela mimořádném kvantu lipoidů a lipoproteinů (porovnáno na př. s hlodavčím mozkem), musili jsme voliti živý virus. Zdá se opravdu, že prozatím pouze tento způsob, při němž je dovoleno viru pomnožit se v organismu vepře do imunitně účinných, ale přitom zvířeti neškodících kvant, jest schopen vyvolávat vyšší stupeň imunity. Naše volba byla tím jednoznačnější, že jsme ze starších prací (Klobouk a jiní) znali relativní neškodnost subkutánních a intramuskulárních injekcí viru. Hlavně jsme si však řadou method ověřili, že Kloboukův virus lze sice částečně purifikovati [Patočka-Kubelka-Žáček,<sup>28</sup>] Patočka-Kubelka-Slavík<sup>13</sup>], ale nikoliv koncentrovati. Dle námi přibližně určené velikosti viru by k efektivní koncentraci bylo zapotřebí centrifugy, jejíž odstředivá síla jest nejméně 100.000násobek gravitace a takovou naše pracoviště dosud nemají. Bylo nám ovšem jasno, že ani aktivní virus nemusí mít žádoucí účinek v imunitě bez látek, násobících jeho antigenní účinek a současně zpomalujících resorpci. Jelikož pak většina dosavadních pokusů byla vykonána vakcínami, adsorbovanými na Al(OH)<sub>3</sub>, zkusili jsme cestu jinou, a to v podstatě původní metodiku Freudovu,<sup>29</sup>) jejíž výsledky budou zhodnoceny celou touto prací.

Freund používá ke zvýšení imunisačních schopností jakéhokoliv antigenu t. zv. lipoidních adjuvantů, t. j. suspense antigenu ve fys. roztoku, k němuž se přidává lanolin nebo Falba aa a parafinový olej v dávce asi o  $\frac{1}{4}$  menší nežli antigenu. Homogenisováním těchto látek ve známých turmixových emulgátorech lze docílitи homogenní suspense lehce kašovité konsistence, kterou je možno při temperatuře nad 20° C bez větších nesnáží tlustou jehlou injikovati. Podmínkou úspěchu jest, aby bylo docíleno skutečně emulze vody v parafinovém oleji (nikoliv obráceně — emulze oleje ve vodě), při čemž lanolin nebo ještě lépe preparát Falba hraje úlohu protekčního stabilisátoru. Nověji se čistý parafinový olej nahrazuje preparátem Bayol F a emulsifikačním faktorem je t. zv. Arlacef, t. j. manid monoleát nebo sorbitolmonostearát. V původní Freundově modifikaci se přidávala ještě usmracená těla mycobacterií, což opět zesilovalo a prodlužovalo imunitní reakci. Ježto však přidání acidoresistentních tyčinek sensibilisuje současně až i k isoalergickým encefalitidám či myelitidám (je-li hlavním antigenem CNS), bylo toto v naší vakcině vynecháno. Je jisto, že byla tato metoda s úspěchem použita k imunisaci či hyperimunisaci zvířat proti nejrůznějším antigenům bakteriálním, toxinům, Rickettsiím, proti malarickým parazitům i proti některým chorobám virovým. Zejména prý se osvědčila lipoidní adjuvantia ve spojení s živým virem vepřové chřipky k imunisaci proti této chorobě. Je popsána vysoce úspěšná imunisace proti rabies [Freund, Lipton a Pisani<sup>30</sup>] a dokonce i proti některým virovým encefalitidám [Friedenwald<sup>31</sup>].

Henle dokázal, že 1 injekce víru s lipoidními adjuvantmi dává mnohem vyšší imunitu a stupňuje titr protilátek, než mnohonásobně opakovane injekce téhož antigenu ve fys. roztoku, a co je ještě důležitější, udržuje hladinu imunity na výši mnohonásobně delší dobu. Je rovněž

jisto, že přidáním lipoidních látek — a tím je také některými autory vykládán úspěch lipoidních adjuvantů — je zpomalována resorpce antigenu do té míry, že ložisko působí jako systém sukcesivních antigenních impulsů. Zpomalení resorpce při použití aktivního viru jako v našem případě, bylo velikou výhodou, neboť virus se dostává z depotního ložiska v tak malých kvantech, že patrně vyvolává rychleji imunitu, nežli je schopen způsobit paralytickou infekci. Fakt, že imunita u polio, dokumentovaná neutralizačními protilátkami, se vyvíjí téměř stejně rychle jako klinické onemocnění, byl ostatně prokázán přímo u lidí Hammonem a Robertsem.<sup>32)</sup> Výklad účinku Freundova způsobu imunisace nebyl dosud jasně podán. Jest jist, že parafinový olej vyvolává ve tkáni cellulární reakci, spočívající v nahromadění velkého počtu mononukleárů, lymfocytů, polynukleárních leukocytů i formaci obrovských buněk. Jest pravděpodobno, že činností těchto elementů se zvyšuje tvorba protilátek a potřebnost k aktivní imunitě vůbec.

Všechny naše pokusy, o kterých budeme mluviti v této části práce, byly vykonány s týmž laboratorním pasážovým kmenem viru, jehož vlastnosti byly popsány (Patočka-Kubelka-Slavík)<sup>13)</sup> v Zemědělské akademii 1951.

Intramuskulární vstřikování vakciny bylo zvoleno na základě zkušeností, ku př. Morganové, jež prokázala, aniž by pro to nabyla výkladu, že intramuskulární injekce proti lidské obrně imunisují opice daleko výdatněji nežli subkutánní. Uvažujíce o Jungenthalově koncepci lidské polio i opírajíce se o pokusy Endersovy a j. autorů, jimiž bylo prokázáno, že ve tkáňových kulturách nejen CNS, nýbrž i sval pomnožuje virus obrny, jest nutno uvážiti i možnost mimonervového množení viru Těšínské choroby. Není pak vyloučeno, že sval je jednou z tkání, v nichž se mimonervové množení viru děje zejména při inaparentních infekcích, a v důsledku toho imunisace do svalu, jakožto citlivé tkáně, může mít podstatný vliv na stupeň imunity stejně jako přímo imunisace CNS je daleko nejfektivnější u neurotropních infekcí vůbec.

Druhým jasným důvodem pro intramuskulární injekce jest okolnost, že antigen s minerálním olejem se dobře a úplně vstřebává ze svalu, ale mnohem hůře z podkožní tkáně, kde ani přípravné nekrosy nejsou vyloučeny.

Když jsme se na několika orientačních pokusech přesvědčili, že intramuskulární injekce větších kvant živého viru s lipoidními adjuvantiemi nemá za následek klinické onemocnění, přikročili jsme k prvním pokusům o aktivní imunisaci (v nichž jsme ovšem přimísili jako antigenu do lipoidních adjuvancí Rackerův purifikát, získaný kyselou precipitací) v malých dávkách, ale několikrát za sebou. V tomto pokusu se ukázalo, že vepř. imunisovaný 4 injekcemi 0,6 ccm viru bez adjuvantů v týdenních intervalech, odolal prvé intracerebrální infekci asi 100 PD<sub>50</sub> dávek viru, ale jeho imunita byla krátkodobá. Zvíře imunisované týmž počtem injekcí viru s adjuvantiemi bylo imunní dlouhodobě.

Jiná zvířata, imunisovaná malými dávkami viru s adjuvantiemi, se ukázala z 80% imunní proti masivní intracerebrální infekci.

Když jsme si tímto ověřili, že i malé dávky viru s adjuvantiem i jsou schopny imunisovati, přikročili jsme k imunisačním pokusům o menším počtu injekcí, ale většími dávkami. Kontrolou, kromě nemunisovaných zvířat, nám byla ještě jiná zvířata, imunisovaná adsorbátovou vakcinou, jejíž účinnost měla exspirovat asi do 3 týdnů.

Experiment byl proveden zhruba takto:

Selata byla imunisována kyselým purifikátem s adjuvantem, a to 5 ccm subkutánně a 5 cm intramuskulárně. Další 4 selata dostala 10% míšní suspensi s adjuvanciemi ve stejné dávce a stejnými cestami. Konečně poslední 4 dostala běžně užívanou adsorbátovou vakcnu. Některá z uvedených zvířat, imunisovaných živým virem s adjuvanciemi, dostala kromě toho ještě suspensi intravenosně. Bohužel byl pokus částečně poškozen tím, že u některých zvířat v místě inokulace vznikla stafylokoková infekce, takže musila být vyřazena. Zbývající zvířata byla nakážena přibližně po 3 nedělích intracerebrálně virulentní míchou, zředěnou  $10^{-2}$ . Současně inokulována intracerebrálně toužes suspensi 2 stejně těžká kontrolní selata.

**Výsledek:** Kontrolní zvířata onemocněla těžce po inkubační době 6—13denní. Zbylá 3 selata, imunisovaná adsorbátovou vakcnu, onemocněla všechna postupně po inkubaci 9-, 11- a 12denní. Celkem 5 zbylých selat, imunisovaných buď suspensi míšní s adjuvanciemi nebo purifikátem s adjuvanciemi, zůstalo po celý měsíc bez symptomů. Po měsíci byla ještě 1krát challengeována virulentní suspensi  $10^{-1}$  a zůstala opět bez symptomů. Tento pokus tedy ukazuje — i když z něho byla některá zvířata vyřazena předčasně interkurrentní infekcí — že lze dosíci zřetelného stupně imunity i jednou injekcí živého viru nativního neb purifikovaného s lipoidními adjuvanciemi [Patočka-Kubelka-Žáček<sup>28</sup>] . (Mikrobiolog. sjezd 1949.)

Tento a ještě jiné orientační pokusy a zejména ta okolnost, že žádné z našich imunisovaných nebo hyperimunisovaných zvířat metodou s lipoidními adjuvanciemi v laboratoři neonemocnělo, nás přiměly k tomu, že jsme provedli r. 1950 na popud ministerstva zemědělství prvý pokus v terénu, a to ve výkrmně blízko Prahy, v níž ve 3 seriích kotců bylo v době počátku pokusu přibližně kolem 300 kusů krmných vepřů. V jedné místnosti se nacházelo celkem 112 vepřů, rozdelených na stejné poloviny, přičemž jedna strana měla vepře umístěné ve 4 kotcích, druhá strana ve 3 kotcích. Obě serie kotců byly odděleny pouze 1 m širokou uličkou. Zvířata nebyla podestýlána, chlév byl pouze proplachován vodou, která samozřejmě stříkala s jedné strany na druhou i se splachovanými fekáliemi.

Zvířata v počtu 58 na jedné straně byla imunisována intramuskulárně 2krát aktivním virem s adjuvanciemi v měsíčním intervalu. Každá injekce spočívala v 5 ccm vakciny, v níž bylo 2 ccm 10% suspense viru + 1,50 ccm parafinového oleje + 2 ccm lanolinu. Zvířata z druhé poloviny téže místnosti v počtu 54 nebyla imunisována, stejně jako 190 vepřů ve 3 místnostech, oddělené od předcházející pouze pařákovou komorou. Po 1. injekci dostalo 6 imunisovaných kusů mezi 10 a 14 dny po injekci příznaky

Landryho ascendentní paralysy. Z nich 4 byla námi poněkud ukvapeně zabita za účelem histologického rozboru, 2 poslední, která měla stejně těžké příznaky, byla pozorována déle, při čemž shledáno, že během dalších 2 dnů se postavila na nohy a v krátké době se úplně uzdravila. Histologický nález u 2 zabitých veprů svědčil pro obrnu. 10% suspense mých jednoho z nich byla intracerebrálně inokulována 2 dalším zvířatům. K našemu velkému překvapení však tato zvířata neonemocněla a dodatečnou challenge se ukázalo, že ani nebyla imunní. Zdá se tedy, že virus vpravený do organismu vepře s adjuvancemi i v tak velké dávce, jak námi použito, jest schopen sice výjimečně vyvolati paralytické onemocnění u zvířete (zejména, je-li očkováno do blízkosti nervu ischiadicu), ale onemocnění je prakticky dále nepřenosné a stejně pravděpodobně nevede k eliminaci viru.

### Tabulka I.

I. terenní pokus.  
2-rázová imunisace aktivním virem s adjevantem.  
Laboratorní zhodnocení.

Čitatel značí počet onemocněvších, jmenovatel počet očkovaných, resp. podrobených zatěžkávací infekci.

	1. imunisace <sup>1)</sup>	2. imunisace <sup>1)</sup>	Zatěžkávací infekce <sup>2)</sup>
Vakcinování v terenu	6/58	0/54	0/4
Vakcinovaní v laboratoři	0/6	0/6	0/6
Nevakcinovaní v terenu (kontroly ev. kontaktní infekce)	0/244	0/244	4/4
Kontroly virulence			11/11

\*) Ze 6 onemocnělých na obrnu v důsledku vakcinace 2 během 2 dní se uzdravila, 4 zvířata byla předčasně zabita.

O této druhé skutečnosti svědčí zejména také to, že během 3 měsíců pozorování celého chovu, ani v protilehlých kotcích, ani v druhé místnosti nevznikl jediný případ obrny mezi více než 200 vepři, kteří byli vesměs chováni za velmi nedokonalých hygienických podmínek. Druhou injekci snesla všechna očkovaná zvířata bez nejmenších příznaků choroby.

Měsíc po druhé injekci odvezena 4 zvířata imunisovaná a 4 zvířata ze sousedního kotce bez imunisace a infikována intracerebrálně téměř 100 PD<sub>50</sub> laboratorního viru. Kontrolní zvířata podlehla v době mezi 9 a 15 dnů. Všechna imunisovaná zvířata, zatěžkána velkými dávkami přímo do mozku, přežila, což jasně svědčí o jejich vysokém stupni imunity.

Současně naočkováno do mozku celkem 11 jiných, neimunisovaných vepřů z moravského chovu a 6 zvířat dalších, imunisovaných v laboratoři stejnou metodou paralelně s terénním pokusem.

Druhý terénní pokus byl vykonán na jaře 1951 za komisionální účasti zástupců ministerstva zemědělství a úředních veterinářů z kraje, okresu i místa ve velké vesnici na Moravě, při čemž proimunisován prakticky všechn vepřový brav s výjimkou několika nedávno narozených selat

a pak ojedinělých prasnic, jež byly zcela krátkou dobu před slehnutím. Očkováno bylo opět živou vakcinou s lipoidními adjuvanciemi dle dříve popsané methody, a to v dávkách, které kolisaly podle váhy a stáří kusů, vcelku však byly podstatně nižší, nežli u prvého pokusu. Experiment byl přesně registrován a sledován.

Laboratorní kontroly pokusu byly provedeny dvěma seriemi zkoušek, a to intracerebrální challengei za použití 15—20 PD<sub>50</sub> vysoce aktivního viru. První challenge byla provedena téměř 2 měsíce po 1. injekci vakciny, druhá přibližně 2 měsíce po 2. injekci vakciny.

K první challengei byli použiti 4 imunisovaní vepři, namátkou v terénu vybraní z proimunisovaných zvířat v obci, kde pokus konán. Ke kontrole vzati 3 neimunisovaní vepři v prvním a 4 ve druhém případě.

Veškerá kontrolní zvířata v obou případech uhynula za typických příznaků obrny po inkubační době 7—11denní. Ze 4 zvířat, imunisovaných jednou injekcí, 2 vůbec neonemocněla během 40denní pozorovací doby. Jedno 15. den onemocnělo těžce, takže bylo v paralysách zabito a čtvrté onemocnělo 11. den po očkování za příznaků ataxie a slabých pares, které však rychle pominuly, takže do týdne bylo zvíře úplně zdravé.

Ze zvířat, imunisovaných 2 injekcemi, dvě zůstala zcela bez příznaků, dvě onemocněla obrnou tak těžce, že musila být utracena a poslední 2 onemocněla po inkubační době 11denní za příznaků lehké obrny. Infekce však byla opět přechodného rázu a zvířata ji přežila.

Je tedy vcelku výsledek terénní imunisace, hodnocen pokusnou intracerebrální infekcí, mnohem méně příznivý než u imunisace, prováděné v laboratoři; dlužno uvážiti mimo jiné, že část zvířat, dodaných k challengem, měla málo přes 20 kg, takže musila být v terénu imunisována ještě v době, kdy byla velmi mladými selaty. Tím se patrně stalo, že jejich pohotovost k imunitě byla sama o sobě nízká a kromě toho u nich použité kvantum očkovací látky bylo z věkových důvodů nepatrné. Je také pochopiteльно, že laboratorní zatížení intracerebrální inokulací co do vážnosti mnohonásobně předčí i nejseriosnější infekci, vzniklou přirozenou cestou v terénu.

Pokud se výsledku v terénu samotném týče, jest prozatím předčasné jej vcelku interpretovati, tím spíše, že ve vakcinaci v téže obci se systematicky i nadále pokračuje. Všechna nově koupená zvířata a odstavovaná selata se očkují, staré chovné kusy se revakcijní.

Zmíněný terénní zákrok podchytil více než 600 kusů dobytčat najednou. Z toho po prvé injekci přibližně 3% zvířat onemocnělo za příznaků obrny, ale několik z nich se opět uzdravilo. Druhá injekce nevyvolala žádných symptomů onemocnění. V současné době dosáhl počet očkovaných zvířat v místě přes 2000 kusů a jak nedávno znova ověřeno v této obci, kde byl vykonán první masový zákrok a nadále se proočkovává, obrna prakticky neexistuje, ač okolní vesnice jsou stále vysoce nemocí promořeny.

Třetí terénní pokus byl vykonán v září 1951 na Slovensku. Zpráva tamního úředního veterináře udává, že prvnou injekcí naočkováno 158 kusů vepřového bravu, druhou celkem 194. Dostala tedy část zvířat pouze 1 injekci viru. Bezprostředně po očkování onemocnělo 6 kusů, z toho 4 kusy po prvním a 2 kusy po druhém očkování. Výsledek nebyl zhodno-

cen přesně laboratorně (kromě 1 vepře v terénu naočkovaného, jenž přežil intracerebrální challengei, provedenou v Mikrobiologickém ústavu Vysoké školy veterinářské v Košicích), pouze sledováním dalšího osudu očkovaných zvířat. Ač údajně v okolních obcích řádila prudká obrna, neonemocnělo z vakcinovaných 2 injekcemi po  $\frac{1}{2}$  roce žádné a z těch, jež dostala pouze 1 injekci, po 4 měsících dvě. Z toho usuzuje veterinář, kontrolující pokusy, že 1 injekce dává imunitu trvající déle než 4 měsíce, 2 dávky mnohem delší.

Vzhledem k tomu, že jsme zásadně nemohli popříti možnost eliminace viru u očkovaných zvířat, učinili jsme jen několik namátkových, ale zato velmi důkladně založených pokusů na průkaz, zda očkovaná zvířata virus stolicí skutečně vylučují. Použito k tomu methodiky, jež popsána v práci Patočka-Kubelka-Slavík.<sup>13)</sup> U žádného z očkovaných zvířat jsme dosud ve stolicích, odebraných různou dobu po vakcinaci, virus nezjistili.

Přesto, že naše laboratorní pokusy a do jisté míry nesporně i naše dosavadní terénní zkušenosti nás jistě opravňují k tomu, abychom považovali naši očkovací methodu za relativně úspěšnou, jsme co do otázky možnosti vyhladiti zcela obrnu aktivní imunisací, dosti skeptickými. Naše skepse pramení také z toho, že si při srovnání jasné uvědomujeme, jak těžce proveditelným zákrokem by na př. byla masově prováděná aktivní imunisace proti lidské obrně, a to z důvodů, jejichž rozbor se vymyká z rámce této práce.

Aktivní imunisace nesporně dokáže vyzvednout imunitu na stupeň, který je schopen po určitou dobu zabrániti nervové obrně. Jak dlouho však trvá tento vysoký stupeň imunity, není známo. Protilátky proti Lansingu lze prokázati u očkovaných opic ještě za rok (Morganová). Je-li však něco, co přece jenom mluví pro vydatné použití aktivní imunisace, je to krátkodobost života jatečného vepře. Snad dobrá očkovací metoda pomůže zabrániti ztrátám jatečných zvířat a při revakcinacích i chovných kusů. Dle našeho soudu jest však bezpodmínečně nutno nadále prohloubeně studovati i cesty infekce, epidemiologii a příčiny vzniku paralytických forem obrny vepřů. Teprve ucelené zvládnutí všech těchto problémů obrny a z toho odvozené komplexní zásahy mohou mít dokonalý úspěch.

## II. STUDIUM ANTIGENNÍCH TYPŮ.

Lidská polio má dnes 3 přesně stanovené a antigenně distinktní typy: I (Brunhilda), II (Lansing), III (Leon). Lze těžko říci, zda je toto rozdelení konečným — prozatím se zdá, že ano. Řadou prací jasné prokázáno, že imunita docílená vakcinací i po přirozeném lidském onemocnění, jest absolutně homotypní. Přesvědčivé nálezy Bodianovy<sup>33)</sup> a Paulovy<sup>34)</sup> ukazují, že druhé paralytické ataky lidské polio — ostatně vzácné — jsou vyvolány jiným typem, nežli prvé onemocnění. Jak dlouho trvá hluboká homotypní imunita lidská, není možno zatím s určitostí říci. Zdá se, soudě dle přítomnosti protilátek, jež ji doprovázejí a prokazují — že trvá více nežli 20 let a snad i celý život. Všichni světoví autoři se shodují v tom, že jakýkoliv seriosní zákrok aktivně imunisační u člověka,

má naději na úspěch teprve nejnověji, neboť účinná vakcína musí obsahovat všechny známé antigeny polio viru.

Pokládáme proto za zásadní nedostatek dosavadního studia obrny veprů, že se nikdo vážněji nepokusil si ověřit rozsáhlejším experimentem, zda Těšínská choroba i u nás přichází v jednom či více antigenních typech nebo alespoň variantách. Jakkoliv důmyslná methoda aktivně imunisační postrádá smyslu, pokud toto není rozhodnuto. Uznáváme, že dosavadní imunisační praxe se zdá svědčit pro jedený typ. Podle našeho soudu však tyto empirické zkušenosti naprosto nestačí a je nutno je ověřiti skutečně vědecky.

Zásadně se ke stanovení antigenních rozdílů v rámci téhož viru nabízejí 3 možnosti. Prvou jest rozhodnutí seroreakční in vitro — na př. deviací komplementu. Tato možnost u veprové obrny dosud zcela chybí a zřejmě nebude dána dříve, dokud nebudeme mít k disposici kmen viru o tak vysokém infekčním titru (alespoň  $10^{-5}$ ), aby se z něho mohl vyráběti hodnotný antigen [podobně jako u polio — viz Casals-Olitsky,<sup>35)</sup> Lahelle<sup>36)</sup>]. Ale i tak budou tyto reakce brzděny zvláštními vlastnostmi veprového sera.

Druhou možností jest kvantitativně hodnocená seroneutralisace známým hyperimunním serum o určeném neutralisačním titru. Takové serum jsme již produkovali a ačkoliv — jak z další části naší práce patrno, má ku podivu relativně nízký titr, jest možno ho použíti k antigennímu hodnocení virů, porůznu isolovaných. I když jest pracovní methodika drahá, musí býti jednou tento průzkum zásadně započat — jinak jest veškeré sebeobsáhlé terénní očkování stavbou na písku. Pro začátek jest naše serum s popsáním pracovní metodiky k disposici.

Třetí možností jest infekce zvířat hyperimunisovaných proti jednomu kmeni viru jinými kmeny, jež se isolují z terénu. Tato methoda jest nejdražší a nejzdlouhavější. Lze ji však provést i tam, kde není k disposici standardní serum k neutralisaci. Této cesty jsme použili i my ve svých prvních pokusech. Tímto způsobem jsme porovnali 4 terénní viry s naším kmenem laboratorním — týkají se tedy naše prozatímní závěry celkem 5, na různých místech isolovaných, kmenů obrnového viru.

Zvířata hyperimunisovaná naším laboratorním kmenem podle metody, jak byla shora udána, byla zatěžkána infekcí nejdříve asi  $100 \text{ PD}_{50}$  téhož viru intracerebrálně, aby byla bezpečně ověřena jejich imunita. Když příznaky infekce homologním kmenem se po 32 dní klinicky neprojevily, byla zvířata použita toutéž cestou k zatěžkávací infekci (ale do druhé hemisféry) kmenem heterologním. Jeden takový kmen pocházel z fudroyantní epidemie ve výkrmně veprů v blízkosti Prahy, druhý kmen viru byl nám dodán lask. dr. Hruškou z Ivanovic. Další dva byly jednak jatečný virus, dodaný nám lask. dr. Nižnanským z Bratislav, jednak jatečný kmen z jižních Čech. Dávka viru, kterou jsme podrobili zatěžkávací infekci, byla nezvykle veliká, a to proto, že veprí během imunisač-

ního procesu značně vyrostou. Bylo použito 2—2,5 ccm 10% suspense míšní, t. j. asi 250 PD<sub>50</sub> heterologního viru intracerebrálně, předpokládaje, že má přibližně stejný infekční titr, jako náš laboratorní kmen. Zvířata kontrolní v počtu 2 na 1 pokus, dostala pouze 0,5 ccm téže heterologní míšní suspense, tedy dávku 4- až 5krát menší, protože byla vždy menších rozměrů. Při všech pokusech kontrolní zvířata uhynula během 9—14 dnů, zvířata hyperimunní jsou dodnes plně zdráva a bez jakýchkoliv příznaků.

I když tento pokus na hyperimunním zvířeti jen stěží může vystihnouti jemné antigenní rozdíly viru, opravňuje nás k tvrzení, že námi dosud zkoušené viry, a to 2 z Čech, 1 z Moravy a 1 ze Slovenska jsou pro imunologickou praxi přibližně stejné antigenní struktury jako náš pasážový laboratorní kmen viru.

Tabulka II.

Zjištování antigenních rozdílů virů o. v. infekcí vepřů hyperimunisovaných laboratorním kmenem viry o. v. různého původu.

Čitatel značí počet onemocněvších, jmenovatel počet inokulovaných i. c.

Původ challenge-viru	Vepři hyperim. laboratorním kmenem	Kontroly
Kmen „Letov“	0/2	2/2
Kmen „Ivanovice“	0/2	2/2
„Bratislava“	0/2	2/2
„Č. Budějovice“	0/2	2/2

### III. SERONEUTRALISACE.

K prvemu úspěšnému experimentu bylo použito hyperimunního sera, získaného kardiální punkcí zvířete, imunisovaného živým virem s adjuvanciemi, jehož imunita byla vyzkoušena intracerebrální zatěžkávací infekcí mnoha smrtelných dávek viru.

Serum tohoto zvířete jsme užili jednak koncentrovaného, jednak zředěného 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 100. 0,5 ccm 10% suspense viru (jehož infekční titr v té době námi nebyl přesně určen) bylo smícháno aa se serem a po 2 hod. vazbě při pokojové teplotě směsi sera a viru stříkány 5 zvířatům intracerebrálně. 6. zvíře bylo kontrolou, jež mělo tutéž dávku viru s normálním vepřovým serum. Sele kontrolní i selata s vyššími ředěnými sera postupně onemocněla po 9—18—24 dnech. Sele se serum koncentrovaným zůstalo dále zdrávo. Tím byla pro nás zásadně prokázána přítomnost seroneutralisačních protilátek, byť i jenom u sera koncentrovaného. Podobně ostatně si počíval i Lépine při své zkoušce o antigenní identitě madagaskarského a našeho viru obrny.

Ukázalo se však i v dalších pokusech, že výroba homologního sera o vyšším seroneutralisační titru u vepřové obrny je nesnadným

problémem. Zčásti je jistě vinna slabá antigenicita a malé kvantum obrnového viru v míšních suspensích. Porovnáme-li však výsledky u vepřové obrny s podobnými resultáty u lidské polio, nemůžeme se ubrániti dojmu, že tato relativní neschopnost tvořiti protilátky proti obrně je do jisté míry druhovou vlastností vepřového bravu.

V dalším posupu své práce jsme zásadně hyperimunisovali zvířata řadou intramuskulárních injekcí s adjuvanciemi, při čemž některá z nich byla 1krát, některá 2krát zkoušena intracerebrální injekcí na stupeň získané imunity. Jako příklad našich seroneutralisačních pokusů může sloužiti zvíře č. 121, které dostalo celkem 8 intramuskulárních injekcí. Intramuskulární injekce byly odděleny 2—3nedělními intervaly. Seroneutralisační test byl prováděn jako v předchozím pokuse, pouze doba kontaktu byla o něco kratší. Kontrolou bylo jednak normální vepřové serum, jednak byla zařazena kontrola účinnosti viru. Každé zředění sera smícháno s konstantní dávkou viru, tentokráté přesně stanovenou a od-

Tabulka III.  
Test seroneutralisace.

Výsledek 3 seroneutralisačních pokusů s 3 různými sery.

V čitateli počet onemocněvších, v jmenovateli počet inokulovaných i. c.

	conc	Ředění ser s virem $10^{-2}$						Ředění viru $10^{-2}$
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:256	
Hyperium serum proti o. v.	0/2	0/4	0/4	3/6	2/4	3/4	2/2	
Normální vepřové serum	1/2	4/4	—	—	—	—	—	
kontrola viru								7/8

povídající  $15 \text{ PD}_{50}$ . Výsledek je patrný z přehledné tabulky č. III. Toto je dosud nejúčinnější serum, ale v imunisaci jiných zvířat daleko větším počtem dávek se pokračuje, takže není vyloučeno, že bude vyroběno serum hodnotnější. Je tedy zředění sera  $1:32$  nejpravděpodobněji konečným titrem, který v neutralisované směsi s  $15 \text{ PD}_{50}$  viru zachraňuje 50% zvířat inokulovaných intracerebrálně.

Jiné zvíře bylo imunisováno méně úspěšně, takže titr neutralisující  $15 \text{ PD}_{50}$  je někde mezi zředěním  $1:4$  a  $1:16$ . Tohoto sera, dále sera normálního vepře a konečně sera vepře imunisovaného jednak intramuskulárně (s adjuvanciemi), jednak intracerebrálně živým kmenem polio typu Lansing, bylo použito ke zjištění, zda snad mezi hlodavčím kmenem lidské polio a Těšínskou chorobou není antigenní příbuznost. Titrace se v tomto případě dělala dvojím způsobem: 1. Uvedená sera smíšena s virem vepřové obrny a titrována na vepřích. Výsledek je patrný z tabulky č. IV.

Je z ní viděti, že homologní serum neutralisuje virus obrny do titru vyššího než  $1:4$ , naproti tomu serum proti polio typu Lansing nemá vůbec žádných neutralisačních schopností proti viru vepřové obrny.

2. pokus o průkaz event. antigení příbuznosti proveden s polio Lansing na myškách a je patrný z tabulky č. V. Zde se zdá, že hyperimunní serum proti obrně vepřu redukuje počet paralytickejch myšek na polovinu až do zředění 1 : 4. Lze tu však ztěží považovat za spec. reakci, neboť i serum vepře, imunisovaného proti polio L, zabraňuje paralysám pouze koncentrované. Je-li tedy vůbec mezi polio typu Lansing a vepřovou obrnou nějaká antigení příbuznost, musí být pouze velmi lehkého rázu a lze ji těžko považovat za specifickou.

Tabulka IV.

Zjištování antigení příbuznosti mezi vitem Polio—Lansing a virem o. v.  
Titrace na vepřích směsí ser. a viru o. v.

	Ředění ser					Ředění viru $10^{-2}$
	conc	1:4	1:16	1:64	1:256	
Anti—Lansing serum z vepře	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
Hyperim serum proti o. v. z vepře	0/2	0/2	1/2	2/2	2/2	
Normální serum z vepře	1/2	2/2	—	—	—	
kontrola viru						3/3

#### IV. GAMA-GLOBULIN.

Jest obecně známo, že mnozí odborníci počínají vůbec od koncepce aktivní imunisace proti polio ustupovati, ale doporučují znovu profylaktickou pasivní imunisaci lidským gama-globulinem.

Hammon již dříve upozorňoval na nesnáze, spojené se systematickým očkováním dětí proti obrně a jako jeden z prvních propagoval masové užití lidského gama-globulinu profylakticky v průběhu epidemie. Bodian<sup>37)</sup><sup>38)</sup> a jiní prokázali pokusně na opicích, že protilátky z lidského gama-globulinu opravdu stačí k zábraně paralytické infekce, navozené ze střevního traktu. Ještě důležitějším jest pokusné zjištění téhož autora (rovněž potvrzující Hammonův<sup>39)</sup>) názor v tomto bodu zvláště důležitý), že prevence gama-globulinem nepřekáží dodatečné aktivní imunisaci buď umělé, nebo přirozené terénní (inaparentním onemocněním). Aktivně imunisační proces jest pouze zdržen a později vrcholí. Konečně zjištěno i u dětí, že vstříknutí poměrně malých dávek gama-globulinu zvyšuje pasivně hladinu jejich protilátek po dobu nejméně 2 týdnů na hranici, jež jest pravděpodobně schopna zabrániti paralysám z infekce lehčího rázu.

Jest pochopitelnlo, že jsme i my uvažovali o možnosti prevence takto koncentrovanou protilátkou. Jedním z bezprostředních popudů nám byla na př. zkušenost, spojená s pozorováním v několika větších

výkrmnách veprů, kde vybuchla epidemie s takovou silou, že během velmi krátké doby zlikvidovala prakticky všechna zvířata. V takových případech je většinou pozdě na profylaktické očkování, jest však patrně možno ještě ochrániti zvířata pasivně velikým kvantem spec. protilátek.

Tabulka V.

Zjištování antigenní příbuznosti mezi virem Polio—Lansing a virem o. v.  
Titrace na myškách směsí sér a viru Polio—Lansing.

	conc	Ředění sér							Ře- dění virus $10^{-2}$
		1:4	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
Hyperim serum proti o. v.	2/4	2/4	4/4	3/4	4/4	2/4	4/4	3/4	
Anti— Lansing serum z vepré	0/4	3/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	
kontr. virus									4/4

Tabulka VI.

Neutralisace víru o. v. hyperimmunním gamma-globulinem  
ve 4-násobné koncentraci než odpovídá jeho obsahu v seru při stejných objemech.

	Ředění gamma-globulinu				Ředění víru $10^{-2}$
	1:16	1:32	1:64	1:128	
gamma-globulin podle Hořejšího	*)1/1	0/2	0/2	1/2	
gamma-globulin získaný precipitací $(NH_4)_2(SO_4)_{12}$	1/2	1/2	2/2	1/2	
kontr. víru					2/2

\*) Intercurrentní onemocnění broncho-pneumonií.

Gama-globulin byl z imunního sera připraven dvojím způsobem: Jednak originální rivanolovou methodou podle Hořejšího,<sup>40)</sup> jednak z téhož sera byl získán precipitací amoniumsulfátem. Výchozím serem bylo jedno z těch, jejichž účinek jest zhodnocen v tabulce III.

Oba gama-globuliny byly ověřeny elektroforeticky a zjištěno, že jde v obou případech o velmi čistý gama-globulin. Preparáty byly dosti dobře rozpustné. Ježkož po rozpuštění byly získány v roztoku asi 4krát koncentrovanějším proti výchozímu seru, byla jejich titrace provedena přímo

neutralisací viru, jako u výchozího sera. Výsledek je patrný z tabulky VI. Jak je vidět, gama-globulin vyrobený rivanolovou methodou má z důvodů, jež nám nejsou zcela jasné, lepší imunitní schopnosti a jeho titr skutečně odpovídá zhruba jeho koncentraci proti výchozímu seru.

Oba preparáty byly v dalších pokusech vyzkoušeny na protekční účinnost, což bude předmětem pozdějšího sdělení. I kdyby se protekce explosivní epidemie gama-globulinem zřetelně neosvědčila, zbývá dle našeho názoru jedna důležitá možnost použití koncentrované protilátky. Jak uvedeno, nebrání gama-globulinu vzniku aktivní imunity, ale určitě by dovedl zabrániti případným postvakcinačním paralytickým komplikacím. Bylo by jej nutno vstřikovati ihned po vpichu vakciny, ale na oddělené místo těla (za zvláště výhodnou se u vepřového bravu považuje subkutánní inokulace do šíjové krajiny). Není možno přímo místiti virus s protilátkou, neboť neutralisovaná směs vůbec neimunisuje. Pochopitelně by se omezilo vstřikování gama-globulinu a vakciny vždy jen na prvu injekci antigenu, neboť při druhé jsme nepozorovali prakticky nikdy komplikací.

## V. PŘENOS IMUNITY NA MLÁDÁTA.

Řada prací se obírá problematikou pasivního přenosu imunity proti neurotropním infekcím z matek na mládáta. Zkoušeno to bylo s kladným výsledkem zejména pro Theilerův virus [Herdís von Magnus<sup>41</sup>], méně určitě pro polio Lansing a důkladně pro viry skupiny Coxsackie, kde pasivní přenos imunity byl vypracován dokonce na jeden z testů, jímž lze určiti antigenní skladbu virového kmene.

Pokusy tohoto rázu u obrny vepřů jsou velmi nákladné a zdlouhavé, mohou však mít praktický význam, neboť kladný nález by potvrdil celkem běžně tradovaný názor, že ssající podsvinčata jsou resistentní proti infekci. Samozřejmě v tomtéž případě by bylo velmi žádoucí imunisovati březí prasnice alespoň v ranném stadiu gravidity.

Provedli jsme celkem 3 serie pokusů, ale nepovažujeme problém za vyjasněný.

1. Hyperimunisovaná prasnice, 3krát intracerebrálně podrobena zatěžkávací infekci a ověřeně resistentní proti 200—300 PD<sub>50</sub> prvnového viru intracerebrálně. Prodána do terénu a její první mládáta (vrhla asi 9 měsíců po poslední zatěžkávací infekci) vykoupena 10. den po zrození a intracerebrálně infikována asi 10 PD<sub>50</sub> viru. Současně infikována přibližně stejně stará selátko od neimunní prasnice. Oboje mládáta zašla na typickou obrnu po krátké inkubační době.

2. Prasnice hyperimunisovaná před březností a prakticky po celou dobu gravidity. Vrhla velmi degenerovaná mládáta, jež spontánně zašla až na dvě. Tato dvě selata infikována intracerebrálně 3. den po vrhu asi 10 PD<sub>50</sub> viru. Jedno zašlo krátce nato interkurentní infekcí, druhé asi 7. den za příznaků ataxie a pares.

3. Podobně jako v druhém případě očkována březí prasnice i v graviditě. Porod byl zřejmě trochu předčasný, většina podsvinčat brzy zašla a naočkována byla opět pouze dvě. Jedno z nich zašlo 5. den za nejas-

ných příznaků, druhé o 3 dny později onemocnělo ataxií a paresami. Zašlo v noci, dříve nežli mohlo být vykrváčeno, a proto byla histologie CNS nemožná.

Dle všech tří výsledků, z nichž prvý lze hodnotiti jen opatrně pro dlouhý časový interval od imunisace, druhý a třetí pro malý počet zvířat, považujeme za pravděpodobné, že pasivní přenos imunity na mláďata u obrny vepřů jest asi nedokonalý a chabý.

## VI. MÍSTNÍ PRŮKAZ IMUNITY DLE SVEN GARDA.

Stejně marná byla dosud naše snaha prokázati sesilní protilátky v CNS imunních zvířat. Jak známo, Sved Gard předpokládal, že v CNS zvířat, prodělavších paralytickou zvířecí či lidskou polio, se nachází faktor, který je schopen virus neutralisovati in vivo. Tento faktor, jehož sídlištěm jsou asi kdysi infikované buňky CNS, má být jedním z hlavních zdrojů imunity proti paralytickému onemocnění a podle všeho není identický s imunním globulinem a nedá se z CNS extra-hovati. Sved Gard soudil, že sesilní imunní faktor je snad totožný s t. zv. neúplným virem, jenž — sám bez pathogenních schopností — blokuje buňku pro totéž agens virulentní.

Jako zdroj imunní míchy v prvním pokuse použito zvíře, které bylo částečně imunní a po masivní zatěžkávací infekci lehce onemocnělo. Po 8 dnech se uzdravilo a za dobu dalších 4 neděl utraceno a jeho mícha použita k pokusu. V I. serii byla naočkována 2 zvířata intracerebrální směsí aa imunní a virulentní míchy. Obě zašla za 8 dní. V II. serii naočkováno 1 zvíře opět směsí obou mích, při čemž však mícha imunní byla v dvojnásobné kvantitatitivní převaze. I toto zvíře za 8 dní onemocnělo a 9. den bylo zabito. Kontrolou byly jednak suspense imunní míchy, naočkováné intracerebrálně, které nevyvolaly žádných příznaků a směs virulentní míchy s míchou normálního zvířete, jež vyvolala typické onemocnění.

Novější pokus byl proveden velmi přibližně za podmínek, jaká udává Sven Gard. Jedno zvíře imunisované v terénu prodělalo po zatěžkávací infekci paralytickou obrnu, která postihla nejdříve zadní končetiny a po zdánlivé remisi ještě přední. Přes toto markantní klinické onemocnění se zvíře uzdravilo a za 3 neděle od počátku paralys, kdy již bylo zdrávo a mobilní, bylo zabito. Z jeho míchy zhotovena suspense v různých ředěních, která míchána s obvyklými  $15\text{ PD}_{50}$  našeho viru, ponechána 2 hod. v kontaktu a intracerebrálně vstříknuta několika zvířatům. Kontrolou nám byla mícha infekční a dále ze zvířete, jež bylo označeno jako klinicky zdravé. Samozřejmě připojena kontrola účinnosti viru. Dnes je již pokus ukončen, a to s podobným výsledkem jako pokus prvý, t. j. negativním.

Sesilní protilátky v CNS, v něž jsme tím spíše věřili, že jsme zhodnotili nepatrny titr protilátek u vysoce imunních zvířat, se nám nepodařilo tímto způsobem prokázat. Není vyloučeno, že naše metodika není přesně stejná jako ta, již užíval Sven Gard a dále, že nelze pro rozdílnost ve složení hlodavčího a vepřového CNS podat vůbec podobný důkaz tímto způsobem.

## DISKUSE.

Smyslem práce byla snaha doplnit mezery ve znalostech imunologie viru Těšínské choroby. Použito methody, která u viru obrny vepřů do této doby patrně praktikována nebyla a shledáno, že jí lze docílit nejen dobrých výsledků v laboratoři, nýbrž i v terénu. Očkování v terénu živým virem s lipoidními adjuvanciemi vykazuje sice určité procento paralytických komplikací, ale je naděje, že se tyto modifikacemi, z nichž jedna je v práci rovněž navržena, dají zredukovati na bezvýznamné minimum. Ostatně nověji — jak autoři dodatečně zjistili — je používáno ke stejným laboratorním cílům analogického způsobu hyperimunisace živým virem a to přímo u lidské polio.(Salk, Lewis et al.,<sup>42</sup>) Bodian.<sup>43</sup>) Zdá se tedy nesporné, že tato metoda je jednou z nejlepších. Problémy imunologických záhad byly ovšem autory vyřešeny pouze z malé části. Solidní imunita i proti těžké cerebrální infekci vede jen k nepatrnému stoupení seroneutralisačních protilátek. Nesporně mají pravdu ti, kdož tvrdí, že virová imunita není přímo závislá na kvantu cirkulujících protilátek, kteroužto thesi (stále častěji uznávanou) hájí a dokazuje zejména Zilber.<sup>44</sup>)

Prozatím se zdá, že mezi domácími viry obrny vepřů, běžně vyvolávajícími paralytická onemocnění, není zvláště markantních antigenních rozdílů, ale tato kapitola není ještě daleko uzavřena a nutno v ní bádat dále. Pro začátek dávají poměrně snadný návod autoři této práce.

Dlužno uvažovat o případné praktické ceně gama-globulinu, jehož výroba by u nás nečinila nejmenších nesnází. Není vyloučeno, že zisk (v profylaxi i simultánní vakcinaci) by mohl být stejně kladný, jaký se rýsuje při použití lidského gama-globulinu u polio.

Prozatím je jasno, že virus Těšínské choroby je i imunologicky samostatnou jednotkou a má řadu vlastností, jimiž se nepodobá žádnému viru, jinak biologicky blízkému, jako je na př. lidská polio.

## ZÁVĚR.

1. Autoři propracovali metodiku aktivní imunisace vepřů živým virem s lipoidními adjuvanciemi a to zhruba podle původního Freundova předpisu: 2 díly lanolinum anhydricum byly zhomogenizovány s 2 díly 10% suspense infekční míchy a s 1,5 dílem oleum paraffini. Směs byla připravena tak, aby vodní suspense antigenu byla emulgována v oleji (emulze H<sub>2</sub>O v oleji) za stabilizačního účinku lanolinu. Účelem bylo docílit co nejrychlejší hyperimunisace zvířat, jednak pro pokusy křížové imunity s kmeny z různých částí republiky, jednak pro získání hyperimmunních ser. Pro intramuskulární aplikaci živého viru s adjuvanciemi se autoři rozhodli vzhledem k nízkému infekčnímu titru ( $10^{-3}$  PD<sub>50</sub>) viru (viz předchozí

publikace) a relativní neškodnosti subkutánních neb intramuskulárních injekcí živého viru s lipoidními adjuvanciemi.

Po skončení předběžných laboratorních pokusů přizpůsobena tato metoda terénním potřebám k účelům aktivní imunisace. Imunisační schema sestává ze 2 intramuskulárních injekcí v měsíčním intervalu o dávce suspense od 0,5 do 3,0 ccm podle velikosti vepřů. Účinnost metody byla vyzkoušena ve 3 terénních pokusech celkem na více než 3000 kusech zvířat, s nimiž bylo započato v létě 1949. Po imunisaci došlo v malém procentu k onemocnění obrnou a to pouze po 1. injekci. Část těchto komplikací, většinou přechodných, lze připsat na vrub promořenosti terénu obrnovým virem. U několika, živým virem imunisovaných zvířat (bez komplikací i s paralytickými komplikacemi) pátráno po případném vylučování viru stolicí. Ačkoliv užito kombinované schema cerebrální, intranasální a intraperitoneální inokulace, v žádném případě eliminace viru nezjištěna.

2. Případná antigenní rozdílnost 4 terénních kmenů z různých částí státu byla zkoušena testem křížové imunity na vepřích, hyperimunisovaných laboratorním kmenem. Prozatím nebylo námi zjištěno antigenních rozdílů mezi 5 kmeny různého původu.

3. Byla prokázána přítomnost malých kvant seroneutralizačních protilátek u hyperimunisovaných kusů. Použito metody seriového ředění sera a konstantní dávku viru ( $15 \text{ PD}_{50}$ ). Titr seroneutralizačních protilátek ser vepřů hyperimunišovaných až 9 intramuskulárními injekcemi živého viru s lipoidními adjuvanciemi byl zjištěn v hodnotách kolem 1 : 16, maximálně 1 : 32 ředění sera, ačkoliv hyperimunišovaná zvířata byla imunní proti intracerebrální infekci  $15-150 \text{ PD}_{50}$  viru. Zdá se, že tento nízký seroneutralizační titr souvisí jednak se slabou antigenicitou viru vepřové obrny, jednak se špatnou reaktivitou vepřového brávu proti tomuto viru.

4. Pomocí seroneuralisačních protilátek zjištěována antigenní přibuznost viru vepřové obrny s virem polio typu Lansing. V podstatě nebyla nalezena hlubší antigenní podobnost.

Hyperimunní serum o zjištěném seroneutralizačním titru je konzervováno a současně je udána námi užívaná methodika seroneutralizačního testu. Sera jsou k disposici pro výzkum případných jemných antigenních rozdílů různých kmenů viru vepřové obrny u nás i v cizině.

5. Z hyperimunních ser vyroben imunní gama-globulin a) ethanologovou metodou, b) ammoniumsulfátovou precipitací a c) rivanolovou metodou, podle Hořejšího. Preparát, který byl proti seru 4krát zkonzentrován, má zhruha čtyřnásobnou neutralisační schopnost.

Gama-globulin bude zkoušen na profylaktickou účinnost v preventivním tlumení průběhu, rozsahem omezených, ale foudroyantně

probíhajících epizoojičích. Je uvažováno i o jiném jeho použití a to jako profylaxe případných paralytických komplikací terénní vakcína živým virem. Aplikace (podle analogií u lidského polio) gama-globulinu a živé vakciny s adjuvanciemi by byla časově soudobá, ale oddělená místem vstříknutí (gama-globulin subkutánně do nuchální krajiny, vakcina — jako obvykle — intramuskulárně do hýžďových svalů). Tato kombinovaná metoda by se prováděla pouze při 1. injekci vakciny.

6. Imunita novorozených selat z hyperimmunních matek nemohla být prozatím námi prokázána v orientačních pokusech, ani proti přibližně  $10 \text{ PD}_{50}$  viru, inokulovaných intracerebrálně.

7. Dosavadní pokusy, v kterých bude rovněž pokračováno, neprokázaly, že by mícha imunních zvířat byla schopna inhibovat účinek míchy, obsahující virus ve smyslu Sven Gardových pokusů.

## РЕЗЮМЕ

1. Авторы разработали методику активной иммунизации свиней живым вирусом и липоидными вспомогательными средствами, а именно, в общих чертах на основании предписания Фрейнда: Две части безводного ланолина гомогенизировались с двумя частями 10%-ой суспензии инфекционного спинного мозга и с 1,5 части жидкого парафина. Смесь была приготовлена так, чтобы водная суспензия антигена была эмульгирована в масле (эмulsionия  $\text{H}_2\text{O}$  в масле) при стабилизационном действии ланолина. Целью было достигнуть как можно скорую гипериммунизацию животных, как для опытов перекрестного иммунитета со штаммами из различных областей республики, так и для получения гипериммунных сывороток. К внутримышечному применению живого вируса с вспомогательными веществами авторы решились ввиду низкого инфекционного титра ( $10^3 \text{ DP}_{50}$ ) вируса (см. предыдущие сообщения и относительной безвредности подкожных или внутримышечных инъекций живого вируса с липоидными вспомогательными веществами).

После окончания предварительных лабораторных опытов этот метод был приспособлен практическим требованиям для целей активной иммунизации. Схема иммунизации состоит из 2 внутримышечных инъекций, применяемых с месячным интервалом, с дозой суспензии от 0,5 до 3 мл в зависимости от величины свиней. Эффективность метода исследовалась в трёх сериях опытов на более чем 3000 животных; опыты были начаты летом 1949 г. После иммунизации небольшой процент животных заболел параличом, но только после первого впрыскивания. Часть этих осложнений, в большинстве временных, можно приписать распространённости вируса паралича. У нескольких животных, иммунизованных живым вирусом (без осложнений и с паралитическими осложнениями), было произведено исследование подозреваемого выделения вируса в стуле. Хотя была применена комбинированная схема мозговой, внутриносовой и внутрибрюшинной инокуляции, но ни в одном случае выделение вируса не было установлено.

2. Предполагаемое антигенное различие 4 штаммов из различных областей республики исследовалось при помощи теста перекрестного иммунитета на свиньях, гипериммунизованных лабораторным штаммом. До сих пор мы пока не установили антигенных различий между 5-ю штаммами различного происхождения.

3. Было доказано присутствие малых количеств нейтрализующих сыворотку антител у гипериммунизированных животных. Был применен метод серийного разжижения сыворотки и константные дозы вируса ( $15 \text{ DP}^{50}$ ). Величины титра нейтрализующих сыворотку антител из сыворотки свиней гипериммунизированных даже 9 внутримышечными инъекциями живого вируса и липоидными вспомогательными веществами были установлены в отношении около 1:16, максимум 1:32 разбавления сыворотки, хотя гипериммунизированные животные были иммунными против интрацеребральной инфекции  $15-150 \text{ DP}^{50}$  вируса. Кажется, что этого низкий серонейтрализующий титр находится в связи как со слабой антигеничностью вируса паралича свиней так и с плохой реактильностью свиней против этого вируса.

4. При помощи нейтрализующих сыворотку антител устанавливалось антигенное родство вируса паралича свиней с вирусом полио типа Лансинг. В основном не была найдена более глубокая антигенная схожесть.

Гипериммунная сыворотка с установленным серонейтрализующим титром была консервирована и вместе с тем сообщена применяемая нами методика серонейтрализующего теста. Сыворотки находятся в нашем распоряжении для исследования возможных тонких антигенных различий между разными штаммами вируса паралича свиней у нас и заграницей.

5. Из гипериммунных сывороток изготовлен иммунный гамма-глобулин: а) этаноловым методом, б) осаждением сернокислым аммонием и в) риваноловым методом по Горжеши. Препарат, который по сравнению с сывороткой был 4 раза концентрирован, обладает в общем 4-кратной нейтрализующей способностью.

Профилактическое действие гамма-глобулина в превентивном торможении течения этизоотий ограниченных размеров, но ужасающего характера, будет исследоваться далее. Авторы полагают, что возможно и иное его применение, а именно для профилактики возможных паралитических осложнений вакцинации живым вирусом. Гамма-глобулин и живую вакцину с вспомогательными веществами было бы можно применять (по аналогии с полио у людей) одновременно, но впрыскивания производить на разных местах (гамма-глобулин под кожу в затылочной области, вакцину — как обыкновенно — в ягодичную мышцу). Этот комбинированный метод можно было бы применять только при 1-ой инъекции вакцины.

6. Иммунитет новорожденных поросят от гипериммунных маток не мог быть при ориентировочных опытах пока нами доказан даже против приблизительно  $10 \text{ DP}^{50}$  вируса, инакулированного в мозг.

7. На основании опытов, произведенных до сих пор, которые также будут продолжаться, не было доказано, чтобы спинной мозг иммунных животных был способен тормозить действие спинного мозга содержащего вирус в смысле опытов Свен Гарда.

## SUMMARY

1. The authors have worked out the methodics of active immunisation of pigs by active virus with lipoid adjuvants and that, on the whole, according to the original Freund prescription: 2 parts of lanolin were homogenized with 2 parts of 10% infectious cord suspension, and 1,5 part of paraffin oil. The mixture was prepared so that the water suspension of the antigen was incorporated in oil (water-in-oil emulsion) under the stabilizing influence of lanolin. The aim was to achieve the quickest possible hyperimmunisation of animals for the purpose of cross immunity tests with strains from different parts of the country on the one hand, and of obtaining hyperimmunesera on the other. The authors

have decided in favor of the intramuscular administration of active virus with adjuvants with respect to the low infective titer ( $10^{-3.1} \text{PD}_{50}$ ) of the virus (see previous publication) and the relative innocuity of subcutaneous or intramuscular injections of living virus with lipoid adjuvants.

On the conclusion of preliminary laboratory experiments, this method has been adapted to the field requirements for the purpose of active immunisation. The immunisation scheme consists of 2 intramuscular injections administered at one month's interval and one 0,5 to 3,0 ccm dose of the suspension-depending on the size of the pigs. The efficacy of the method has been tested in 3 field experiments carried out since the summer of 1950 on more than 3000 animals. The immunisation resulted in paralytic disease in a small number of animals and that only after the first injection. Part of these complications partly of transitory character may be ascribed to local morbidity of the districts in question. Several animals immunized by active virus (with as well as without paralytic complications) have been subjected to investigation as to possible excretion of virus by feces. Though a combined cerebral, intranasal and intraperitoneal inoculation scheme was applied, excretion of virus could not be found in any of these cases.

2. Antigenic difference, if any, of 4 field strains from different parts of the state has been examined by the cross immunity test in pigs hyperimmunized by the laboratory strain. So far no antigenic difference between 5 strains of different origin could be demonstrated.

3. The presence of small quantities of neutralizing antibodies has been proved in hyperimmunized animals. The serial dilution of serum and constant virus dose ( $15 \text{ PD}_{50}$ ) was used. The titer of neutralizing antibodies of sera from pigs hyperimmunized by as much as 9 intramuscular injections of active virus with lipoid adjuvants, has been found to amount to 1 : 16 at the most to 1 : 32 of serum dilution though the hyperimmunized animals were solidly immune against intracerebral infection of massive doses of virus. This low neutralizing titer is likely to be connected on the one hand with the poor reactivity of swine to this virus, on the other hand with the weak antigenicity of the hog paralysis virus.

4. Antigenic relationship of the hog paralysis virus and the polio virus of the Lansing type was examined by means of neutralizing antibodies. In the main no profounder antigenic similarity could be found.

A hyperimmune serum of known neutralizing titer has been preserved. The methodics of the neutralizing test used by the authors is given. Sera are available for the investigations of possible slight antigenic differences in this country and abroad in diverse strains of hog paralysis virus.

5. Immune gamma globulin has been produced from hyperimmune sera by methods using a) ethanol, b) ammonium sulphate precipitation and c) Hořejší's Rivanol method. The preparation was four times concentrated as compared with the serum and possessed about a fourfold neutralizing capacity.

Gamma-globulin is to be examined for prophylactic efficacy in preventive checking the course of epizootics limited as to the extend but of explosive character. Another application of gamma-globulin is being considered as a prophylactic in case of accidental complications in active virus field vaccination. The administration (analogous as in human polio) of gamma-globulin and living vaccine with adjuvants should be syn-

chronous, yet separated as to place of injection) gamma-globulin subcutaneously in the nuchal region, the vaccine — as usual — intramuscularly in gluteal muscles. This combined method should be applied only with first injection of the vaccine.

6. Immunity of new-born suckling pigs born of hyperimmune sows could not be proved by the authors so far in orientation experiments not even against about 10 PD<sub>50</sub> of virus inoculated intracerebrally.

7. Experiments which have been carried out so far and are to be continued could not prove the ability of the spinal cord from immune animals of inhibiting in the sense of Sven Gard's experiments, the pathogenic action of spinal cord containing virus.

## LITERATURA

1. Klobouk: Zvěrolékařské rozpravy, 1935, r. 9, str. 73, 85, 217. —
2. Doubrava-Kraus: Zvěrolékařský obzor 1935, 93. — 3. Hruška: Zvěrolékařské rozpravy 1938, 37. — 4. Fortner: Zeitschr. f. Infektionskrankh. der Haustiere, 1942, LIX, 81. — 5. Traub: Arch. f. Tierheilkunde 1941, 77, 52—66. — 6. Elek-Kertay: Acta veterinaria acad. scient. Hung. 1951, I. 367. — 7. Hruška: Časopis čs. veterinářů, 1950, 13, 289. — 8. Lépine-Atanasiu: Ann. Inst. Pasteur, 1950, 113. — 9. P. N. Andrejev: Infekcionnyje bolezni svinej, Selchozgiz, Moskva 1948. — 10. Kaplan-Meranze: Veterinary Medicine, 1948, 43, 330. — 11. Hecke: W. tierärztliche Wochenschr. 1951, 147. — 12. Pilet: Bull. off. internat. Epizoot. 1952, 38, 61. — 13. Patočka-Kubelka-Slavík: Věst. zeměděl. akad. 1951, 25, 461. — 14. Sven Gard: Arch. f. ges. Virusforschung, 1951, 249. — 15. Aycock-Kagan: Immun. 1927, 14, 85. — 16. Brodie: J. Immun. 1935, 28, 1. — 17. Melzer et al., J. Immun. 1945, 50, 331. — 18. Kramer et al., J. Immun. 1936, 31, 199. — 19. Loring-Schwerdt et al., Science, 1947, 106, 104. — 20. Poliomyelitis. Intern. Polio-Congress, Philadelphia 1949. — 21. Schwerdt-Dick et al.: Am. J. Hyg. 1951, 53, 12. — 22. Dick-Schwert et al.: Am. J. Hyg. 1951, 53, 131. — 23. Howe-Bodian-Morgan: Am. J. Hyg. 1950, 51, 85. — 24. Koprowski-Jervis-Norton: Am. Hyg. 1952, 55, 108. — 25. Chalkina: Arch. Sci. Biol. 1938, 52, 126. — 26. Hammon: Pediatrics, 1950, 6, 696. — 27. Hammon: Pediatrics, 1951, 8, 741. — 28. Patočka-Kubelka-Žáček: Biol. listy, 1950, 31, 45. — 29. Freund: Ann. Rev. of Microb. 1947, 291. — 30. Freund, Lipton, Pissani: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1948, 68, 609. — 31. Friedewald: J. exp. Med. 1946, 80, 477. — 32. Hammon-Roberts: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1948, 69, 256. — 33. Bodian: Am. J. Hyg. 1951, 54, 174. — 34. Paul-Riordan: Am. J. Hyg. 1950, 52, 202. — 35. Casals-Olitski-Anslow: J. exp. Med. 1951, 94, 123. — 36. Lahelle: Am. J. Hyg. 1951, 54, 391. — 37. Bodian: Am. J. Hyg. 1952, 78, 56. — 38. Bodian: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1952, 80, 522. — 39. Hammon: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1952, 80, 150. — 40. Hořejší: ČLČ. 1952, 24/25, 704. — 41. Herdis v. Magnus: Acta path. scand. 1951, XXIX. — 42. Salk, Lewis et al.: Am. J. Hyg. 1951, 54, 157. — 43. Bodian: Am. J. Hyg. 1951, 54, 132. — 44. Zilber: Osnovy immuniteta, Medgiz, Moskva, 1948.