

STUDIE O Q RICKETTSIOSE I.

PROF. DR FRANTIŠEK PATOČKA a DR VLADIMÍR KUBELKA (za
spolupráce ZDENKY MANDLÍKOVÉ)

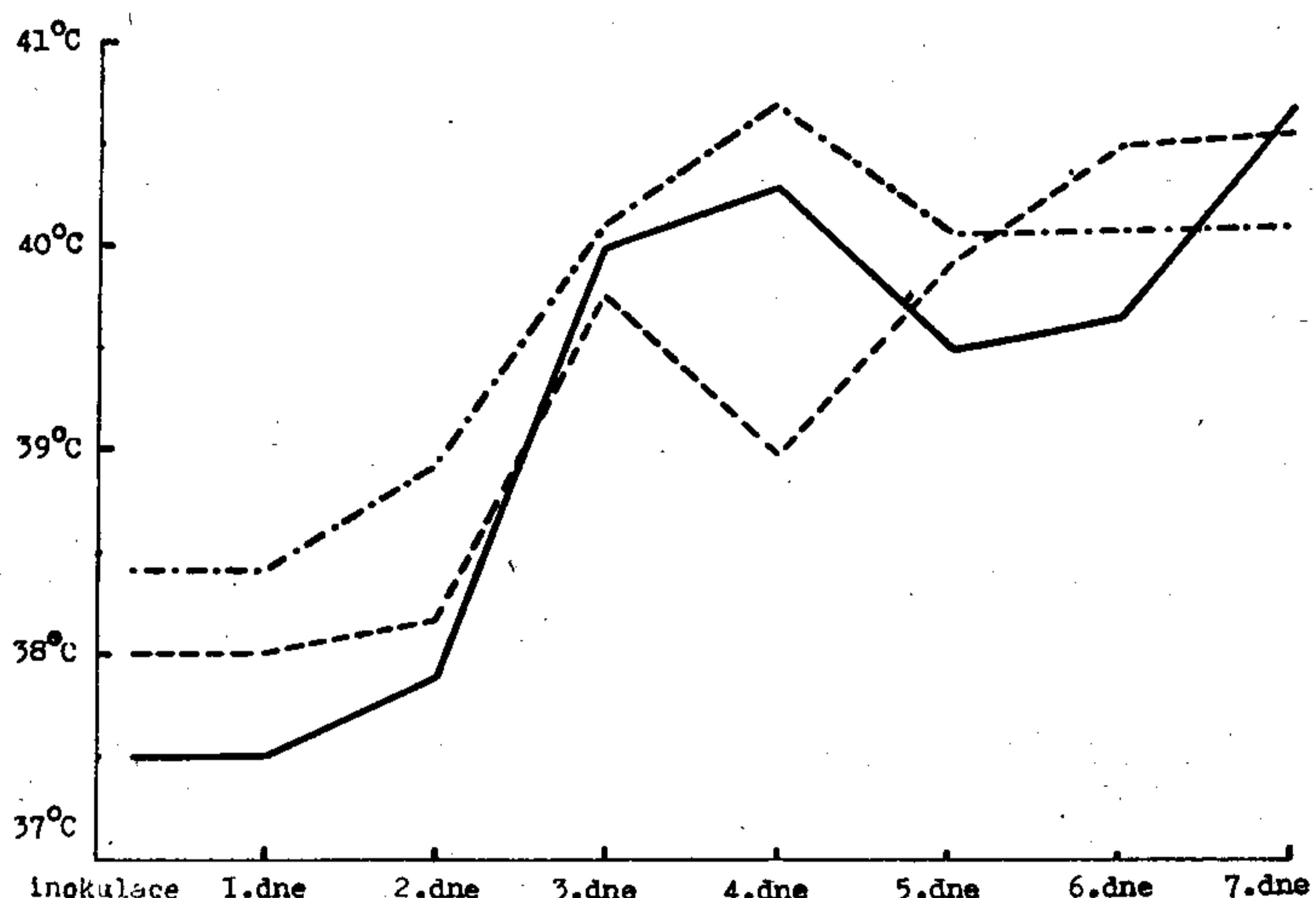
Tak zvaná Q rickettsiosa je nesporně jedním z nejaktuálnějších a nejzpracovávanějších problémů moderní mikrobiologie a epidemiologie. Podle všeho se zdá, že je nejrozšířenější rickettsiosou na světě, která nepochybí nejen v žádném světadílu, nýbrž i v žádné zemi kromě neprostudovaných pásem tropických a za polárním kruhem. Jakožto etiologická jednotka byla, jak obecně je známo, objevena Burnetem a Freemanem r. 1937 v Australii, o rok později a nezávisle na prvních autorech Dawisem a Coxem v západní části Spojených států. Dyer 1939 zjistil totožnost etiologické agens, nalezeného v Australii a Americe.

Za druhé světové války se nejenom ukázalo, že se tato choroba vyskytuje v evropském Středomoří, zejména v Itálii, nýbrž objasnila se i její schopnost vyvolávat rozsáhlé a explosivní epidemie. V r. 1946 zásluhou Caminopetrossovou zjištěna identita již dříve známé balkánské chřipky s Q rickettsiosou a od té chvíle je choroba objevována postupně ve všech evropských státech, v Číně, v Japonsku, ve Střední a Jižní Americe, prostě všude tam, kde jsou intensivně chována užitková domácí zvířata, zejména ovce, kozy a hovězí dobytek.

Brzy po objevení choroby vzniklo odůvodněné podezření, že jde o onemocnění zoonotické, i když epidemiologický cyklus zůstal ještě poměrně dlouho záhadou. Postupně objevovány nové a nové reservoáry rickettsie v přírodě a stejnou měrou rostl počet hmyzích vektorů přenášejících nemoc. Jak u zoonos bývá pravidlem, prvé zjištěné případy atypických pneumonií, objasněné později jako Q horečka, byly profesionálního původu, a to u dělníků na jatkách. Americké zkušenosti krátce nato ukázaly, že se postižení týká hlavně jedné části zaměstnanců, a to

těch, kteří skládají a zabíjejí dobytčata nebo stahují kůžu. Bylo zřejmo, že muselo jít o aerogenní infekci vdechnutím zvířeného prachu z tělesného povrchu zvířete. Dodatečně se ukázalo, že jsou i zemědělští pracovníci postiženi, zejména ošetřovatelé velkých stád hovězího dobytka nebo ovcí, po případě honci nebo pastevci. Konečně pozorováno profesionální onemocnění u zaměstnanců mlékáren, z čehož bylo zřejmo, že i mléko, infikované buď z tělesného povrchu kontaminovaného zvířete, nebo obsahující rickettsie vylučované z nemocného zvířete přímo mléčnou žlázou, je dalším zdrojem infekce.

Toto zjištění vedlo k pátrání po mléčných epidemiích mezi populací, které rovněž prověřeny s tím důležitým zjištěním, že špatně prováděná



a nízkostupňová pasteurisace mléka není schopna usmrtit tuto zvláště resistentní rickettsii.

Do jisté míry epidemiologicky záhadné zůstávají explosivní epidemie v armádách.

Dnes je množství zvířat, která byla buď s jistotou zjištěna jako přirozený reservoár rickettsie, nebo v nichž bylo dosaženo pomnožení a persistence téhož organismu uměle, takže je nelze jako přirozené zdroje vyloučit, opravdu úctyhodné: vzpomeňme na řadu divoce žijících hlodavců, na př. vodní hraboše, zajíce, krysy, hovězí dobytek, kozy, ovce, velbloudy, koně, osly, psy abychom uvedli jen nejdůležitější. Nověji prokázány kočky jako nesporně důležitý faktor při šíření Q rickettsiosy a konečně ověřena citlivost kachen a zejména holubů, u nichž zjištěna přirozená infekce Q horečkou v místě, kde těsně předtím nalezeny případy lidské.

Je mimo rámec této práce vypočítávat všechny hmyzí vektory, rozpoznané jako přenašeče rickettsie. Pro nás je důležité, že i naše klíště může v sobě rickettsii množit a přenášet. Zajímavý je experimentální průkaz množení téhož organismu ve všech a blechách, a dokonce v larvách moučných červů. Exkrementy klíšťat jsou skutečně asi také jedním z hlavních pramenů lidské infekce, k níž nesporně nejčastěji dochází tak, že jsou vdechnuta s kožním prachem zvířecím. O infekciositě stolice klíšťat svědčí jasné to, že i zředění 10^{-8} vyvolává po dlouhé inkubační době u morčete příznaky experimentální nemoci. Svací akt hmyzu je pochopitelně rovněž schopen vyvolat infekci a stává se vzácněji pramenem lidské nákazy, jak pozorováno, (byť i ojediněle), u lesních dělníků.

Přirozené infekce u divoce žijících hlodavců, hlavně však u velkých domestikovaných zvířat (zcela jistě i část lidských případů) probíhají buď subklinicky, nebo dokonce inaparentně. Tak řečeno je relativně těžko vyvolat klinicky manifestní experimentální onemocnění ovcí i relativně velkými dávkami rickettsie, vstříknutými intravenosně. U většiny velkých zvířat a u hlodavců se rickettsie vylučuje močí (snad i exkrementy) a tato je hlavním pramenem dalších kontaktních nákaz.

Jakousi podobnost rickettsie s brucellami lze zjistit při infekci gravidních zvířat. Mikroorganismus má nespornou afinitu k placentě a plodovým vodám, které se stávají bohatým zdrojem rickettsií.

Zvláštní a ne vždy zcela jasnou kapitolou jsou takové případy lidské Q rickettsiosy, kdy k infekci došlo vdechnutím prachu ze slámy nebo sena použitého k zabalení předmětu, dokonce na vzdáleném kontinentu. V Mnichově zjištěna Q horečka u 6 obyvatel téhož domu, při čemž jediným možným pramenem infekce byly suché palmové listy z Alžírska, s nimiž jeden z obyvatel pracoval. O mléčných infekcích bylo již referováno, sýry jsou méně nebezpečné, neboť jejich zráním se většina coxiell usmrťí.

Kontaktní infekce mezi lidmi byla z počátku považována za nepravděpodobnou. Také náš případ vážné laboratorní infekce nevyvolal klinicky prokazatelné onemocnění u členů rodiny, ačkoli pacient s ní byl v úzkém kontaktu nejen poslední dny inkubace, nýbrž i prvé tři dny těžkého horečnatého stavu se silným dráždivým kašlem. Přes tyto zkušnosti radíme dnes již ke zvýšené opatrnosti a rádné desinfekci prádla, sputa a nádob na exkrementy, neboť v poslední době bylo popsáno několik varovných případů. Z nich výjimáme zejména případ ošetřovatelky pečující o nemocného s Q horečkou, a zvlášť zajímavý případ pathologa, který onemocněl 19. dne po pitvě zemřelého na rickettsiovou pneumonii. Řada epidemiologických podrobností je uvedena v Raškově epidemiologii, na niž zde odkazujeme.

Biologické vlastnosti vyvolavatele Q rickettsiosy, zvané dnes obecně Coxiella Burneti, byly námi popsány poměrně podrobně ve Speciální mikro-

biologii (Patočka a spolupracovníci, 1950, díl II), tamtéž jsou zhodnoceny základní principy diagnostiky Q horečky a možnosti její terapie a prevence. Již tehdy a opětovaně v diskusních příspěvcích (seminář interních klinik, publikováno v ČLČ 1951) jsme upozorňovali, že výskyt této choroby je v největší míře pravděpodobný i u nás, a to tím spíše, že již v této době bylo referováno o případech v Rumunsku, Švýcarsku, Rakousku a na několika místech v Německu. Prvým cílem našeho studia bylo prokázat, že se *Q rickettsiosa* (nejčastěji ve formě atypických pneumonif) vyskytuje také v Československu. Samozřejmě jsme při své práci ověřili řadu údajů o nejrůznějších vlastnostech *Coxiella burnetii* na základě vlastního pozorování, jsou tedy i tyto předmětem originální části našeho pojednání.

Coxiella burnetii je celkem právem považována za nejmenší dosud známou rickettsii blížící se rozměry svých drobnějších forem k virusům ze skupiny ornithosy. Pro její snadnou filtrabilitu ji dokonce mnozí považují za přechod mezi rickettsiemi a virusy. Běžně prochází porcelánovými a infusoriovými svičkami i Seitzovými filtry. O tom, že má formy zvláště nepatrných rozměrů svědčí fakt, že je schopna průniku gradokolovými membránami s průměrem pórů kolem $400 \text{ m}\mu$. Bývá zdůrazňován její pleomorfismus, t. j. že mimo velmi drobné formy lze pravidelně nalézt tyčinky tak dlouhé, že bývají považovány až za druhotnou bakteriální kontaminaci. Ve svých pokusech jsme použili z počátku dvou kmén *Coxiella* b.; za prvé kmen Combiesco, velmi virulentní a těžko adaptovatelný na žloutkové vaky, a dále kmen Henzerling, který jsme dostali laskavostí Dr Longa. Většina našich pokusů, zejména v pozdějším stadiu, byla provedena s kmenem Henzerling pro jeho prověřeně široké antigenní spektrum a menší nebezpečí vzhledem k laboratorní infekci.

Tinkčně se nám podařilo znázornit rickettsii opětovaně jak v preparátech ze žloutkových vaků, tak také (i když v nevelkém počtu) v infikovaných morčecích varlatech. Byly-li naše kmény v opětovaných pasážích adaptovány na myšky, podařilo se nám (počínaje od třetí nebo čtvrté pasáže) znázornit rickettsie i v nápadně zvětšených myších slezinách. Podotýkáme, že mikroskopické znázornění rickettsií může být z počátku obtížné, a proto doporučujeme, aby začátečník použil Beggovy modifikace Machiavellova barvení: nátěr je fixován teplem, pak přelit na 5 minut čerstvě filtrovaným roztokem, složeným z 9 dílů ($1/2\%$ basic. fuchsina a 1 dílu M/15 fosfátového nárazníku pH 7,6. Smyje se H_2O z důvodu a diferencuje po dobu jedné až několika minut M/50 nárazníkem kyseliny citronové a natriumcitratu pH 3, až je nátěr bledě růžový. Kontrastní dobarvení 1% methylenovou modří půl minuty. Rickettsie jsou svítivě červené na modrému pozadí. Jakost basického fuchsina a délka odbarvování jsou základními podmínkami úspěchu. Přezkoušeli jsme i jiné metody, zejména Castanedovu a pak Giroudovu při použití Giemsova roztoku za tepla. Většina našich preparátů nám standardně ukazovala krátké formy coxiell, z nichž mnohé byly téměř na hranici viditelnosti laboratorním mikroskopem. Další bakteriální formy byly v našich preparátech poměrně vzácné. U zvířat se nacházejí rickettsie velmi často v plasmě histiocytů, obyčejně ve skupinkách, někdy dokonce ve valkuolách. V morčecích slezinách se nám shodně s jinými autory nepodařilo coxielly mikroskopicky spatřit. Ojedinělé je jedno cizí zjištění, podle něhož byly rickettsie mikroskopicky nalezeny ve formě drobounkých, hustých granul, pokrývajících vnitřek makrofagů ve sputu nemocného.

Po adaptaci kmene Henzerling jsme zkusili částečnou purifikaci coxiell diferenciální centrifugací, a když nám tato metoda dala uspokojivé výsledky, pokusili jsme se o elektronoptické znázornění rickettsií jed-

nak v preparátech obyčejných, jednak pochromovaných. Elektronoptické snímky i jejich kopie laskavě provedl akademik prof. MUDr Wolf a Ing. Štěpánek z ústavu pro elektronoptiku, Čs. A. V. (příloha 1—4). Na stínových snímcích lze vidět velmi dobře vnitřní strukturu rickettsií, která, jak se běžně uvádí, je analogická bakteriím. Na obrázku č. 2 se podařilo zachytit celkem výjimečnou dlouhou formu rickettsie. Pochromované snímky jasně ukazují plastické rozměry coxiell a vystihují jejich množení příčným dělením.

Nejhodnějším experimentálním zvířetem pro průkaz *Coxiella bur.* je nesporně podle cizích i našich zkušeností morče. Inokulace lidského patologického produktu, zejména krve — v prvé horečnaté fázi onemocnění — sputa (velmi se nám osvědčilo při zachycení jednoho případu laboratorní infekce) a později i v moči vede u tohoto zvířete ke zvýšení rektální temperatury na 39,8 až 41° počínaje 6. až 12. dnem od okamžiku inokulace. Teplota, která je naznačena na našich grafech (viz příloha 5), bývá velmi často bifasická, trvá několik málo dní, poté klesá a zvíře se stává imunním. Na výši horečky dochází ke generalisované septické infekci rickettsiemi, slezina bývá 5násobně i více zvětšena, tmavá, fragilní a obsahuje stejně jako krev veliká kvanta rickettsií (mikroskopicky ovšem neprokazatelných). Ve sražené morčecí krvi nebo ve slezinách (nutno ověřit na sterilitu) lze konzervovat coxielly při teplotě kolem 0° po řadu týdnů, při teplotách kolem —20° až do —60° po dlouhou řadu měsíců, jak můžeme z osobní zkušenosti potvrdit. Syrský křeček měl pro naše pokusy tu nevýhodu, že mu nebylo možno dobře měřit rektální teplotu. U myší inokulovaných intraperitoneálně vzniká po řadě pasáží subklinická infekce, manifestní pouze nápadně zvětšenou a fragilní slezinou, v níž lze, jak shora uvedeno, prokázat rickettsie. Po inokulaci nadměrně velikého kvanta rickettsií, zejména ze žloutkových vaků, se nám opětovaně stalo, že morčata s horečnatého stadia přešla do stavu kolapsu a zašla.

Pokusnou infekci přeživší morčata jsme schovávali jednak jako zdroj imunního morčecího sera, jednak jako kontroly k rychlému experimentálnímu průkazu Q horečky. Tam, kde nelze čekat na serologické potvrzení Q rickettsiosy, provádí se pokusné zjištění současnou inokulací patologického produktu dvěma morčatům zdravým a nejméně jednomu imunnímu. Jestli reagují horečkou obě nová zvířata a imunní zůstává bez teploty, je diagnosa onemocnění jasná a lze ji vyhlásit do 10, nejdéle do 14 dnů od počátku experimentu.

Pátrali jsme po nových experimentálních možnostech a za tím cílem jsme zkusili inokulaci velmi malého kvanta purifikovaných rickettsií do přední oční komory morčete. Morče reagovalo do 24 hodin s takovou prudkostí, že během tří dnů vznikla akutní panofthalmie. Třetí den oko enukleováno a podrobeno mimo jiné histologickému vyšetření. Histologický nález (I. path. anat. Dr Bednář) zněl: panofthalmie akutní s maximem změn v iridocyklis v rohovce. Menší změny ve skleře. V zánečlivém exsudátu je naprostá převaha mononukleárů většinou velkých, histiocytárního charakteru.

Vzhledem k tomu, že nešlo v našem případě o druhotnou bakteriální kontaminaci, lze změny považovat do jisté míry za specifické. Není vyloučeno, že by propracování tohoto druhu experimentu mohlo vyústit v praktické diagnostické možnosti.

Kvůli úplnosti uvádíme, že lze experimentem na morčeti diagnostikovat i poměrně slabé kontaminace mléka. Za tím účelem se zdravým

zvýšatům vstříknou asi 3 ccm mléka intraperitoneálně a po 30 dnech se kardiální punkcí odebraná krev zkouší na přítomnost protilátek fixací komplementu.

Kmen Henzerling se nám podařilo poměrně snadno po několika slepých pasážích adaptovat na žloutkové vaky kuřecích embryí. Je dobré si uvědomit, že množení coxiell ve žloutkových vácích je prací zvláště nebezpečnou. Pravděpodobně při těchto experimentech (není vyloučena také možnost kontaminace močí infikovaných morčat) došlo na našem pracovišti ke dvěma těžším laboratorním infekcím, které budou předmětem zvláštního sdělení a — jak se ukázalo dodatečně z protilátkové odezvy — k několika dalším sубklinickým. Z počátku jsme užívali pro pasáže 10% suspense žloutkových vaků v nárazníkovém fysiol. roztoku, později 5 a nyní užíváme 1%. Množství inokula je pravidelně 0,25—0,5 ccm. Kvalita vajec je pro množení coxiell velmi důležitá a nejlepších výsledků jsme dosáhli vždy od měsice dubna do července. Lze inokulovat embrya 6 i 7 denní. Naše praxe nám však ukázala, že práci nejpřístupnější a přitom vzdorná proti traumatu a druhotné infekci jsou embrya 8 denní. K inokulu přidáváme malá kvanta penicilinu. Příliš velké dávky tohoto antibiotika se nám zdály nepříznivé pro množení rickettsií, ač se to běžně v literatuře neuvádí.

V nynější fázi práce při použití 1% suspense ztrácejí embryo pravidelně pátého dne pohyblivost, takže je nutno ihned vybrat žloutkové vaky, odkapáváním zbavit přebytku žloutku a uložit do dalšího zpracování při temperatuře kolem -20°C nebo nižší. Důležité je zachytit okamžik před smrtí embryo, neboť po jeho úmíru se během několika hodin coxielly rozpadají a žloutkové vaky jsou již nepoužitelné. Vždy několik žloutkových vaků se smíchá a zkouší jednak barvením na přítomnost rickettsií, jednak rozetřením vystrížených částic na bakteriologickou sterilitu.

Zkoušky sterility provádime pravidelně u každé serie vajec v játrových bouillonech a vždy po několika pasážích také kultivací na tuhých půdách aerobních i anaerobních. Pouze materiál úplně sterilní je podroben dalšímu zpracování, když je ho použito k výrobě antigenu.

Při zkouškách sterility žloutkových vaků na pevných půdách jsme jednou pozorovali zajímavý zjev, na nějž upozorňujeme proto, aby nebyl někým chybně interpretován. Bouillonové kultury ze serie žloutkových vaků, obsahující hojně rickettsií, byly a zůstaly makroskopicky zcela sterilními. Rovněž krevní plotny, chované za mikroaerofilních podmínek, byly prvních pět dní zcela sterilní, od 6. dne se však objevily přesně v očkovacích čarách, a to hlavně tam, kde byla nanesena větší kvanta žloutkového vaku nepatrné kolonie právě na pomezí viditelnosti pouhým okem. Ani po několika dnech růstu nedosáhly většího průměru než zlomku 1 mm. Gramovým roztokem barvené preparáty z kolonií neukázaly vůbec nic. Obtiskové preparáty, zbarvené Giemsovým nebo Machiavellovým roztokem, prokázaly v koloniích kromě nejasné síťovité struktury jemná, načervenalá granulka, zhruba velikosti coxiell. Dalším rozborom kolonií zjištěno, že šlo o náhodnou spontánní kontaminaci kuřecích embryí pleuropneumonickými organismy, jak to bylo jen asi ve dvou případech ve světové literatuře popsáno.

Popsané metody k množení rickettsií jsme použili ke zjištění jejich resistance na antiseptika. Jak známo, považuje se Coxiella Burneti za výjimečně odolnou proti vyschnutí a jiným zevním podmínkám ve srovnání s jinými rickettsiemi. Údaje v literatuře jsou však zčásti kontradiktorní a nepřesné. (Přežití Coxielly burneti v mléce při 63°C po dobu 30 min.). Nám šlo o prakticky zhodnotitelný průzkum citlivosti Coxiella

burneti na antiseptika v našich laboratořích nejčastěji používaná, t. j. chloramín a Ajatin. Za tím účelem jsme smísili částečně purifikovanou suspensii coxiell (v bílkovinném prostředí) jednak s $\frac{1}{2}\%$ roztokem chloraminu S, jednak s $\frac{1}{2}\%$ roztokem Ajatina. Ke kontrolní stejné suspensi jsme přidali fysiologický roztok se stejným pH jako antiseptika. Po 15minutové době kontaktu byly vtřikovány suspense podle běžné metody do žloutkových vaků. Pokus, i když jsme si vědomi všech jeho nedostatků, nám ukázal, že námi použitá antiseptika v uvedených koncentracích a 15minutovém kontaktu ničí vitalitu coxiell do té míry, že se ve žloutkových vacích již nemnoží. Podotýkáme, že se v literatuře běžně uvádí Zefirol (látku analogická našemu Ajatimu), jako antiseptikum bez zvláštního rickettsiocidního účinku. Růst embryí nebyl nijak přerušen malými kvanty antiseptik, která byla s koxillami vstřiknuta.

Serodiagnostika Q rickettsiosy — ač je pro pozdní výskyt specifických titrů většinou retrospektivní — je nesporně nejdůležitější. Je hlavním vodítkem při epidemiologické depistáži lidských případů podle Dierckse a Smadela ani provedení vyliatné kury aureomycinem nezamezí tvorbu protilátek, jen ji zpomalí a sníží snad jejich potenciální hladinu (a u větších domestikovaných zvířat) většinou inaparentní nebo nejvýše subklinický průběh) je dokonce zatím jedinou diagnostickou možností.

Na rozdíl od jiných rickettsios lze u Q horečky použít pouze specifických seroreakcí, což diagnostiku velmi znesnadňuje, ježto výroba antigenu je obtížná a velmi drahá. Dosud se běžně užívá těchto reakcí k diagnostice lidských i zvířecích infekcí Coxiella bur.: aglutinace, fixace komplementu a konglutinace. Rýsuje se použitelnost nálezu zvýšeného titru opsoninů (Victor-Raymond a jiní), jež u ostatních rickettsios dává prý neselhávající a vysoce specifické výsledky.

Propracovali jsme všechny tři uvedené metody. S konglutinací (Wolfe-Kornfeld), u níž se (jako běžně) užívá sera hovězího a koňského jako komplementu, jsme zatím neměli dobrých výsledků. Uznáváme ovšem, že je methodou volby ve veterinární praxi, neboť při pátrání po zdroji coxiell v hovězím dobytku dává prý nepoměrně vyšší titry než běžná vazba komplementu a lze jí použít i tam, kde jsou sera silně antikomplementární.

Aglutinace je snadná a velmi úsporná reakce, kterou doporučujeme jako orientaci při pátrání všude tam, kde je nutno zpracovat veliká monžství epidemiologicky nejasného materiálu. Má dvě nevýhody:

1. Lidská i zvířecí sera po proběhnutí nemoci mají jen relativně nízké titry v seru (1:5 běžně, 1:10 a 1:20 maximálně podle našich zkušeností), takže hranice mezi specifickou a nespecifickou hladinou je úzká.

2. Nepodaří se vždy vyrobit antigen tak homogenní, jaký je nutný pro bezvadné kontroly. K provedení aglutinace doporučujeme metodu Urbachova nebo Giroudova. Sera se ředi ve zkumavkách, potom se na sklíčkách nanese a smichá vždy 1 kapka antigenu a 1 gts. ředění sera. Slíčka se vloží do Petriho misek s vlhkou žuničinou a dají do thermostatu přibližně na 4 hodiny. Po této době se aglutinaty odčítají buď v kapkách na temném pozadí binokulární loupou, nebo se nechají zaschnout a barví podle Giemsy (Giroud).

Bylo již naznačeno, že příprava antigenů ze žloutkových vaků je velmi pracná a neúsporná. Naše zkušenosti potvrzdily běžné údaje v literatuře, že jako zdroje antigenu lze použít skutečně pouze takových

žloutkových vaků, které obsahují veliká kvanta zcela neporušených rickettsií.

Na rozdíl od většiny ostatních rickettsií nemají coxielly rozpustné antigenní komponenty, takže hodnota a specifita je přímo úměrná počtu koxiell, jejich neporušenosti a stupni purifikace.

Snažili jsme se opětovně zlepšit řídké rickettsiální antigeny ultracentrifugací. Ani to však pravidelně nevedlo k úspěchu, neboť obrátky v počtu do 10 000 nejsou schopny purifikované rickettsie kvantitativně koncentrovat a nad 10 000 vytvářejí sediment tak hustý, že je ho nutno homogenisovat do zmenšeného kvanta suspendující tekutiny třepáním se skleněnými perličkami. Tím se však opět poruší protoplasma coxiell a antigen podstatně ztrácí na své síle a specifitě.

Vcelku jsme použili tří metod k výrobě antigenu:

1. Toppingovy-Shepardovy,
2. Urbachovy,
3. naší vlastní modifikace.

Prvé dva způsoby jsou běžně známy a uvedeny v příslušné literatuře (viz přiložený seznam literatury). Naše modifikace se nám zvláště osvědčila tam, kde žeň rickettsií ze žloutkových vaků byla poměrně řidší, a lze jí použít dokonce i v takových případech, kde žloutkové vaky, obsahující jinak hojnou rickettsii, jsou slabě druhotně kombinovány, ježto bakterie, patrně jako specificky o něco těžší, zůstanou ve fázích, které se odstraní.

Postup je asi tento:

1. 10% suspense zmrzlých žloutkových vaků zhotovená v turmixu se nechá zmrznout dva až tři dny při -15°C .
2. Po rozmražení se přidá formol do celkového kvanta 0,2% a lehce centrifuguje k odstranění hrubých partikulí.
3. Ke zbylé suspensi se přidá $1\frac{1}{2}$ objemu čistého etheru, protřepe a nechá rozdělit v lednici při $+7^{\circ}\text{C}$.
4. Druhého dne jsou patrny v rozdělovací nádobce tři fáze, z nichž hoření žlutá vrstva etheru neobsahuje rickettsie a odstraňuje se. Nejspořejší, téměř čirá fáze obsahuje zcela nepatrné kvantum koxiell a lze ji rovněž odstranit. Střední fáze obsahuje velké kvantum koxiell a zpracovává se dále.
5. Střední fáze se převede na pH 5,5 a centrifuguje $\frac{1}{2}$ hod. při 10 000 obrátkách v horizontální centrifuze, čímž se vytvoří opět tři vrstvy;
 - a) zcela nahore se usadí hutný, žlutý lipoidní škraloup, b) pod ním relativně čirý supernant, který má sotva prokazatelné kvantum rickettsií, c) na dně zbyvá hutný, kašovitý sediment, špinavě šedé barvy, obsahující veliká kvanta rickettsií.
6. Lipoidní škraloup i supernatant se oddělí. Kašovitý sediment se vypláchné, zředí (na desetinu původního objemu suspense žloutkových vaků (fysiologickým roztokem s nárazníkem, lehce homogenisuje perličkami a pH se upraví na 7,2).
7. Přidá se znova $1\frac{1}{2}$ objemu etheru a 5—7 minut silně třepe ve třepáčce. Po protřepání se vleje po druhé do rozdělovací nádoby a nechá přes noc při $+7^{\circ}\text{C}$.

8. Za 24 hodin se vytvoří opět tři vrstvy. Nejhořejší nažloutlá vrstva etheru se odleje, málo objemná vrstva se vypustí, odetherisuje a představuje nám malé množství středně silného, ale velmi purifikovaného a homogenního antigenu, který je zvláště vhodný pro aglutinace. Hlavním ziskem je však nápadně voluminosní střední fáze, velmi jemně koloidní, obsahující největší množství coxiell.

9. Voluminosní a jemně koloidní střední fáze se zcentrifuguje na obyčejné centrifuze při 3000 obrátkách. Během 20 minut se vytvoří na povrchu tekutiny hutná huspeninovitá zátka z lipoproteinů, pod níž je kalný tekutý zbytek.

Tabulka 1. Výsledek vyšetřování ser na Q-horečku různého původu.

Původ sera	Počet ser	Positivní	Neurčitý
Laboratorní pracovníci MILFKU	34	4 a)	
Zaměstnanci jatek	32	6	
Odd. prim. Dr Trojana (Krč)	30 b)	1	
Případy podezřelé z Q-horečky z terénu (doc. Raška)	8	7 c)	1
Dětská klinika		1 d)	
Celkem vyšetřených ser	139	19	1
Ovce z ústavního chovu e)	10	3 f)	

a) vesměs z virologické laboratoře,
b) atypická pneumonie-ornithosy?
c) kontrolní sera z počátku nemoci byla vesměs negativní,
d) bronchopneumonie,
e) v bezprostřední blízkosti virologické laboratoře,
f) 2 dospělé ovce, 1 jehně.

10. Huspeninová zátka se prorazí pipetou, zkalený tekutý zbytek se odpipetuje, a zbaven etheru, představuje nám bohatý antigen v koncentrovaném stavu.

K tomuto antigenu, který je někdy pro svou bohatost lehce antikomplementární, se přidá 1% merthiolátu zředěného 1:100. Ředěním (podle obsahu rickettsii obvykle 1:2 i více dostaneme z koncentrovaného antigenu antigen použitelný pro fixace, vysoce hodnotný a specifický, již bez antikomplementárních vlastností.

Námi vyrobené antigeny byly titrovány proti pozitivním a negativním lidským serům i proti seru immunních morčat. Největší zředění antigenu, které reagovalo s největším zředěním pozitivního sera, bylo vzato za antigenní jednotku. Ve vlastní reakci bylo běžně používáno 2 jednotek antigenu. Při ředění ser, antigenu i komplementu jsme běžně používali veronalového nárazníku, komplement přidáván v množství asi

$\frac{1}{2}$ jednotky. Vazba se prováděla buď cestou ledničkovou podle Kolméra, nebo běžnými metodami. Sera ředěna v dvojnásobcích postupně od 1:5. Morčecí sera 4—5 týdnů po horečnaté fázi mívala titry až do zředění 1:320. U lidských ser s naším antigenem jsme prozatím nejistili vyšších titrů než 1:80. Za jasné pozitivní jsme považovali lidská sera, která dávala reakci alespoň na ++ do titru 1:20, za suspektní i 1:10. Pochopitelně platí i pro fixace komplementu u Q horečky tytéž zásady, jaké se postulují pro fixace u virusových chorob obecně. To znamená, že lidská i zvířecí sera mají být až do okamžiku zpracování uchována zmrzlá, a pokud lze, je nutno hodnotit výsledky získané vyšetřením alespoň dvou ser z jednoho pacienta, t. j. z fáze akutní a z fáze rekonvalescentní.

Prozatím získané výsledky jsou patrný z přehledné tabulky. Počet fixací byl ovšem daleko větší, neboť jsme většinu ser vyšetřovali opětovně, za použití různých vzorků našich antigenů.

DISKUSE

Přehledem výsledků seroreakcí uzavíráme prvu část své práce s Coxiella burneti. Hlavním ziskem této části našich studií bylo získání osobních zkušeností v práci s coxiellou a osvojení si pracovní methodiky do nejmenších podrobností. Během pracovního postupu došlo u nás k několika laboratorním infekcím, jejichž klinický rozbor bude podán na jiném místě. Jakýmsi ziskem z těchto nevyhnutelných příhod bylo to, že naši rekonvalescenti zůstali po delší dobu zdrojem imunního sera, jímž jsme mohli prověřit specifitu a kvalitu námi vyrobených antigenů. Novum naší práce je jednak přínos k experimentu s coxiellami a pak naše metoda výroby antigenu, která se zdá sice na první pohled komplikovaná, ve skutečnosti však je snadná a dává velmi dobré výsledky i tam, kde by antigen podle cizích metod nebyl kvalitní.

Naše seroreakce podaly po prvé nesporný důkaz o tom, že Q horečka existuje i v Československu, jak jsme již ostatně dříve předpokládali. Zajímavým vedlejším pozorováním je inaparentní infekce mezi našemi ovciemi, kterou možno označit s největší pravděpodobností také za laboratorní, neboť jsou chovány v poměrné blízkosti našeho virologického pracoviště.

RESUMÉ

1. Autoři popisují svoje laboratorní zkušenosti s Coxiella burneti, a to zčásti za použití rumunského kmene, zachyceného na morčeti, z větší části na kmene Henzerling.

2. Oba kmeny pasážovány nejdříve na morčatech, později, zejména kmene Henzerling, adaptovány na žloutkové vaky kuřecích embryí. Jsou podrobně vyličeny tříkční vlastnosti a mikroskopická charakteristika rickettsie ve spolupráci s Elektronoptickým ústavem Československé akademie věd, zhotoveny elektronoptické snímky coxiell, získané purifikaci kmene Henzerling.

3. Ve shodě s běžnými údaji v literatuře ověřena experimentální patogenita koxiell na morčatech, syrských křečcích a myších. Zvláště úspěšnou se ukázala inokulace rickettsie do přední oční komory morčete. Propracována methodika experimentálního průkazu Q horečky pokusem na morčatech s imunními kontrolami a její cena ověřena u dvou případů laboratorních infekcí. Částečně purifikovaná suspenze coxiell zkoušena na rezistenci proti antiseptikům, při čemž zjištěno, že 0,5% roztok chloraminu S a 0,5% roztok Ajatinu po 15 minutovém působení inaktivuje koxielly pro pomnožení ve žloutkovém vaku.

4. Z kmene Henzerling připraven antigen a podle metody Toppingovy-Shepardovy, b) Urbachovy, c) podle vlastní modifikace autorů za použití nejprve dlouhodobého zmrazení žloutkových vaku a dvojnásobného třepání s etherem. Antigen ověřen jednak serem hyperimmunních morčat, jednak serem rekonvalescentů po Q horečce, získanými při laboratorních pokusech s koxiellou.

5. Za použití reakce fixací komplementu s antigenem a) a zejména e) zjištěna řada lidských případů Q horečky v Československu, a to nejenom v případech laboratorních infekcí, nýbrž i u epidemiologicky nejasných -atypických pneumonií a dále u zaměstnanců pražských jatek. Konečně potvrzen jako Q horečka jeden hromadný výskyt atypických pneumonií na venkově, již epidemiologicky vysoce suspektní.

РЕЗЮМЕ

1. Авторы описывают лабораторный опыт исследования *Coxiella burnetii* а именно, отчасти при применении румынского штамма, культивированного на морской свинке, большей же частью на штамме Генцерлинг.

2. Оба штамма культивировались сначала на морских свинках, главным образом штамм Генцерлинг, адаптированный на желточных мешках куриных эмбрионов. Подробно описаны красильные свойства и микроскопическая характеристика риккетсий; при сотрудничестве с Электроноптическим институтом Чехословацкой Академии Наук были изготовлены электроноптические снимки коксиелл, полученные очищением штамма Генцерлинг.

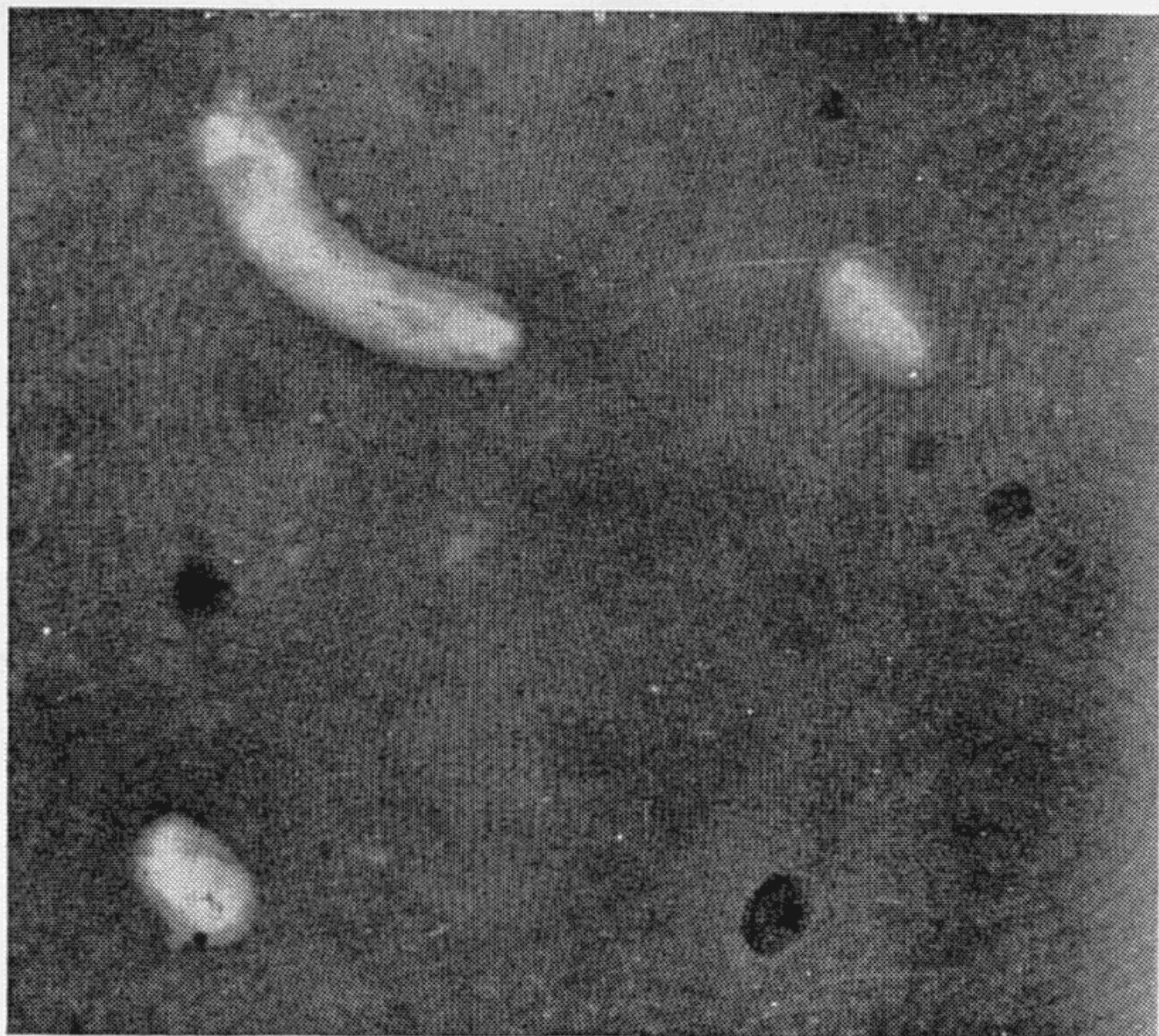
3. Согласно с современными данными литературы была на морских свинках, сирийских хомяках и мышках проверена экспериментальная патогенность коксиелл. Особенно успешной оказалась инокуляция риккетсий в переднюю камеру глаза морской свинки. Разработана методика экспериментального доказательства Q лихорадки при помощи опыта на морских свинках с иммунными контролями и в двух случаях лабораторных инфекций проверено ее значение. Произведено исследование устойчивости частично очищенной взвеси коксиелл против антисептических веществ, причем было установлено, что 0,5%-ный раствор хлорамина S и 0,5%-ный раствор аятина после 15-минутного действия инактивируют коксиеллы для размножения в желточном мешке.

4. Из штамма Генцерлинг был приготовлен антиген: а) по методу Топпинг-Шепарда, б) по методу Урбаха и в) по собственной модификации авторов при применении сначала долговременного замораживания желточных мешков и двойного выделения эфиром. Антиген был проверен как при помощи сыворотки гипериммунных морских свинок, так и сыворотки выздоравливающих после Q лихорадки, полученной при лабораторных опытах с коксиеллой.

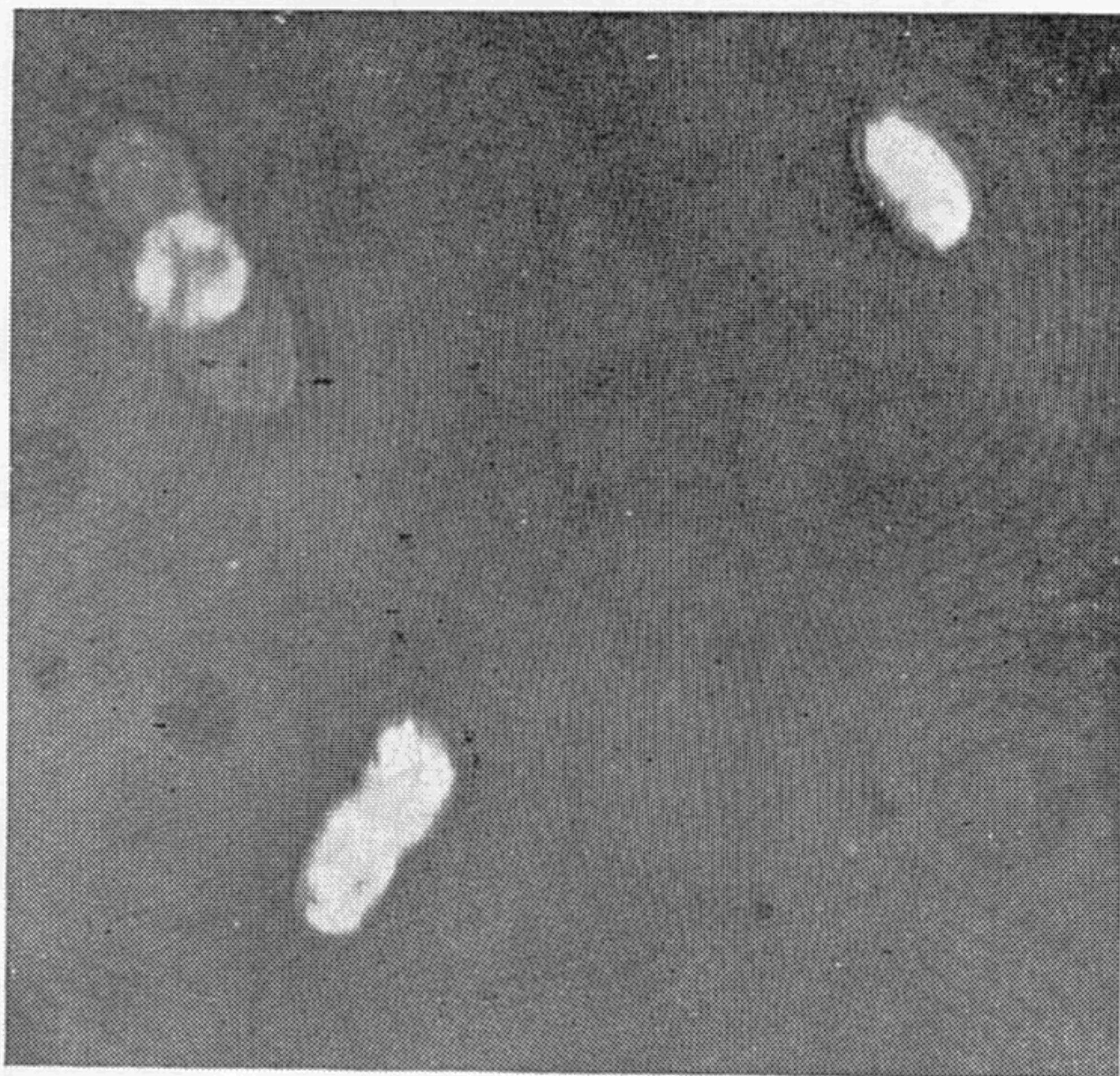
5. Применяя реакцию связывания комплемента с антигеном а) и особенно с в), авторы установили ряд заболеваний лихорадкой Q у жителей Чехословакии и то не только в случаях лабораторных инфекций, но и у эпи-

PROF. DR PATOČKA — DR KUBELKA — Z. MANDLÍKOVÁ

Studie o Q rickettsiose I.



1. 8 500×



2. 8 500×



3. 5 000×



4. 10 200×

Elektronoptické snímky: *Coxiella burnetii* (prof MUDr Wolf, Ing. Štěpánek).

демиологически неясных атипичных пневмоний, далее у служащих пражской бойни. Кроме этого, было подтверждено, как лихорадка Q, массовое появление в провинции атипичных пневмоний, эпидемиологически уже весьма подозрительных.

Мп.

SUMMARY

1. Authors describe their experiments with *Coxiella burnetii*, partly using the roumanian strain preserved in a guinea-pig, mainly using the Henzerling strain.

2. Both strains first underwent several passages on guinea-pigs, later on and especially the Henzerling were adapted on yolk sacs of the chicken embryos. The staining properties and microscopical characteristic of rickettsia are described. In cooperation with the Institute for Electron-optics of the Czechoslovak Academy of Science the electronoptic pictures of coxiella were studied.

3. The pathogenic properties of coxiella for guinea-pigs, syrian hamsters and mice have been found similar as usually described in bibliography. Particularly successful proved to be the rickettsia inoculation in the anterior chamber of the eye of guinea-pig. According to own experiments of authors a 0,5% solution of chloramin S and 0,5% solution of ajatin inactivates coxiella for its growth in yolk sacs after 15 minutes of contact.

4. Three methods of preparing antigens from infected yolk sacs have been developed. The antigen a) Topping-Shepard's method, b) Urbach's, c) authors own modification, employing first long freezing of yolk sacs and twice shaking with ether. The antigen has been titrated first against the serum of hyperimmune guinea-pig, secondly against convalescent's serum after the laboratory infection with coxiella.

5. A lot of Q fever human cases in Czechoslovakia were discovered, by using the reaction of complement fixation with the antigen a) and especially c), including several cases of laboratory infection, some cases of epidemiologically obscure atypical pneumonia or influenza like illnesses of employees of the Prague slaughter-house. Finally a small epidemic of atypical pneumonia in the country, epidemiologically highly suspicious, has been also confirmed as Q fever.

LITERATURA

1. Clark-Lenette: Am. J. Hyg. 1951. — 2. Combiesco: Ann. Inst. Past. V, 76, 1949. — 3. Coombs-Stoker: Lancet p. 15—17, 1951. — 4. Eymer: Meunchner Med. Wschr. p. 779, 1951. — 5. Giroud-Jadin: C. R. Acad. Sci. 1950. — 6. Herzberg-Kremmer-Urbach: Zbl. Bakt. I. Orig. V, 156, p. 14, 1950. — 7. Herzberg-Urbach: Ztschr. f. Immunitätsforschung u. Exp. Therapie, Bd. 109, p. 159, 1952. — 8. Huebner-Bell: J. A. M. A. V, 145, 1951. — 9. Chang-Zia-Lu-Choo: The Chinese Medical Journal V, 69, p. 35, 1951. — 10. Krasilnikov: Oprědělitel Bakterij i Aktinomycetov, Moskva 1949. — 11. Lenette-Clark: Am. J. Hyg. V, 55, p. 246, 1952. — 12. Luot-Huebner: Am. Hyg. V, 55, p. 190, 1952. — 13. Meldolesi: Wien. Klin. Wschr. V, 63, p. 5—9, 1951. — 14. Morrozzi: Bol. Soc. Ital. Biol. V, 27, 1951. — 15. Ormsbee-Lackman-Pickens: J. of Immunologie, p. 257, 1951. — 16. Patočka a kolektiv: Mikrobiologie, speciální část II, Praha 1950. — 17. Philip: J. Parasit. V, 34, 1948. — 18. Ransom-Huebner: Am. J. Hyg., p. 110, 1951. — 19. Raška K.: Epidemiologie, Praha 1952. — 20. Siegert-Simrock-Ströder: Ztschr. f. Tropenmed. Parasit. 1950. — 21. Smadel-Snyder-Robbins: Am. J. Hyg. V, 47, p. 71, 1948. — 22. Steiman: Ann. Inst. Past., p. 105, 1951. — 23. Stoerner: J. Ann. Vet. Ass. 118, 1951. — 24. Stoker-

Marmion: J. of Path. a. Bact. V, 62, p. 134, 1950. — 25. Topping-Shepard:
Public Health Reports V, 20, 1946. — 26. Urbach: Ztschr. f. ärztl. Fort-
bildung V, 46, p. 255, 1952. — 27. Wolfe-Kornfeld: Proceed. Soc. Exp. Biol.
Med. V, 69, p. 251, 1948. — 28. Zdrodovski: Rickettsiosy, Moskva.