

Československá hygiena, epidemiologie, mikrobiologie, imunologie

ROČNÍK III

ČERVEN 1954

ČÍSLO 3

POKUS O IMUNISACI PROTI CHŘIPCE ZA POUŽITÍ LIPOIDNÍCH ADJUVANCÍ

Dr F. PATOČKA, Dr SLONIM

Pokusy o dosažení aktivní imunity proti chřipkovému onemocnění u člověka jsou velmi starého data, takže práce obírající se touto thematikou lze sledovat zpět až do r. 1936.¹⁾ Je tedy pochopitelné, že literatura o tomto thematu je ohromná, a nelze ji zde uvádět ani ve velmi stručném přehledu.

V r. 1939 byl i u nás učiněn pokus vakcinovati několik lidských dobrovolníků kmenem virusu, isolovaným v průběhu tehdejší epidemie a adaptovaným přes fretčí pasáž na bílou myšku.²⁾

Ještě obsažnější je literatura o podstatě imunity u virusové chřipky a konečný názor na ní nezdá se dosud zcela jednotný.

Naše práce nechce přispět k řešení této rozsáhlé a těžké problematiky. Je pouze metodickým příspěvkem, jenž naznačuje novější možnosti potencování virusového antigenu, použitého k přípravě očkovací látky.

Samozřejmě jsme musili i my vyjít před započetím své práce z několika základních předpokladů, jež tuto uvádíme bez hlubšího komentáře.

Je obecně známo, že je možno k dosažení prakticky zhodnotitelného stavu lidské imunity proti chřipce použít několika metod.

Nejideálnější z nich se zdá přímá infekce citlivých buněk respiračního traktu mitigovaným virusem ve sprayi.³⁾ Někteří autoři⁴⁾ nezaznamenali však měřitelný úspěch touto metodou, aniž hlouběji pátrali po příčině. Tím spíše znamená velký pokrok práce Zakstelskajové a Ritové,⁵⁾ jež ukázaly, že velmi pravděpodobnou příčinou špatné imunisační schopnosti virusů k tomuto cíli používaných (alantoid. tekutiny, pasážované tkáňové kultury) je, kromě snížené patogenity, hlavně ztráta jejich afinity k lidské tkáni. Autorky udržovaly schopnost přizpůsobení chřipkového virusu na lidskou tkáň pasážemi ve tkáňových kulturách z lidských embráonálních plíc. Virus z těchto kultur byl rovněž nepatogenní, množil se však v lidském nosohltanu, a co je hlavní, zřetelně imunisoval.

Tento způsob vakcinace vede nejenom ke zvětšení specifické odolnosti buněk respiračního traktu, nýbrž i ke zvýšení hladiny virus neutralisujících protilátek.

Druhou cestu ukázal Smorodincev,⁶⁾ jenž ve svých pracích vytyčil převládající úlohu humorálních protilátek při imunitě proti chřipce obecně. Tuto zkušenosť potvrzuje řada jiných autorů, z nichž zejména Francis⁷⁾ a Solověj⁸⁾ našli, že vysoká hladina protilátek v seru je doprovázena jejich objevením se v nosohltanovém, resp. bronchiálním sekretu, takže nesporně spolupůsobí i jako ochranná bariéra. Vyvolat tuto vysokou a pro imunitu nutnou hladinu protilátek je samozřejmě možno také parenterálním vstřikováním mrtvého a živého chřipkového virusu nativního nebo koncentrovaného a po případě ještě potencovaného adsorpci na nejrůznější substráty, jako je Al-hydroxyd nebo Ca-fosfát.

Prvý princip vakcinace nesporně daleko přesněji odpovídá přirozeným imunologickým poměrům u člověka; jeho základním předpokladem je však nepatogenní a přitom

pro člověka invasivní virus. Získat však tyto virusové varianty se — kromě citovaných sovětských autorů — podle vkeho zatím nikomu dalšímu nezdařilo.

Proto je až dosud nejvíce rozšířena metoda druhá, odpovídající nynějšímu stavu pracovní metodiky většiny produkčních laboratoří i zvyklostem při praktickém podávání vakciny. O tom, že druhá skupina očkovacích metod není stále ještě dokonalá a nedává plně uspokojující výsledky, svědčí stále nové návrhy na složení vakciny, její přípravu, dávkování, způsob aplikace a zvláště snaha o zvýšení její antigenicity.

Jen zcela mimočodem upozorňujeme na třetí možnost, naznačenou Smorodincem, Gul'novem a Čalkinou,⁹⁾ kteří dokázali zredukovat přibližně 10krát morbitidu při přirozené infekci chřipkou rozprášením imunního sera do lidských dýchadel. Takto dosažená pasivní imunita se zdá podle uvedených čísel vydatná, ale je jistě jen velmi krátkodobá a mohla by vést k přecitlivělosti proti použitým zvířecím serům.

Jednou z nejvíce diskutovaných otázek v komplexu problémů, spojených se snahou o dokonalou preventivní imunisaci, je proměnlivost antigenicity chřipkových virusů, jež nesporně zčásti souvisí s přirozeným proimunisováním lidstva v průběhu prakticky každročních, ať těžších nebo lehčích chřipkových epidemí.

Tato proměnlivost je tak veliká a nečekaná, že vedla u některých autorů i k částečnému skepticismu, co se týče možnosti vůbec připravit takovou vakcinu, jež by byla schopna zvládnout celou šíři této variability.

V Československu bylo za použití moderních pracovních metod zavedeno prvé systematické a masové proočkování exponovaných a pracovně důležitých celků obyvatelstva Blaškovičem. Týž po velmi důkladných přípravných studiích¹⁰⁾ ukázal veliký a nepříznivý vliv chřipkových epidemí na celkový zdravotní stav a pracovní schopnost obyvatelstva a propracoval theoreticky i prakticky cesty k jejich tlumení.

O tom, jak je epidemická chřipka i u nás problémem trvalým a zvláště důležitým, jasně mluví práce Rašky a kolektivu, z něhož Tůmová-Papírníková, kromě úspěšných isolací variant chřipkového virusu, měla též účast při pokusné produkci prvních vakcin.

Blaškovič ve své vakcině použil principu uvedeného Salkem, t. j. viru z alantoidní tekutiny, adsorbovaného na Ca-fosfát in statu nascendi.

Nás zaujal jiný princip, jehož úspěšnost byla prověřena jednak ředou laboratorních experimentů, jednak dosti obsáhlou terénní praxí s virusem obrny veprů.¹¹⁾ V našem pracovním postupu jde o zvýšení antigenních schopností chřipkového virusu přidáním lipoidních adjuvancí podle Freundova principu.¹²⁾ Toto bylo už před námi s úspěchem použito v řadě prací, z nichž jen namátkou uvádíme imunisaci zvířat proti nejrůznějším antigenům bakteriálním, toxinům, rickettsiím, proti malarickým parazitům i proti některým chorobám virusovým. Zejména prý se osvědčila lipoidní adjuvancia ve spojení se živým virusem veprové chřipky k imunisaci proti této chorobě. Je popsána vysoce úspěšná imunisace proti rabies,¹³⁾ a dokonce i proti některým virusovým encefalitidám.

Výklad účinku Freundova způsobu imunisace nebyl dosud jasně podán. Je jisté, že parafinový olej vyvolává ve tkáni celulární reakci, záležející v nahromadění mononukleárů, lymfocytů, polymorfonukleárních leukocytů i formaci obrovských buněk. Je pravděpodobno, že se činností těchto elementů zvyšuje tvorba protilátek a pohotovost k aktivní imunitě vůbec. Původní Freundova metoda používá jako lipoidů lanolinu nebo analogické, ale mnohem čistší Falby, stejným dílem s čistým a lehkým parafinovým olejem, které se homogenisují s antigenem suspendovaným ve fysiolog. roztoku v poměru 1:3. Podmínkou úspěchu je, aby byl antigen suspendován v parafinovém oleji a nikoli obráceně. Látkou, která s největší pravděpodobností násobí antigenní účin, je parafinový olej, kdežto lanolin (Falba) má úlohu protekčního stabilisátoru. Nověji se parafinový olej nahrazuje ještě čistším preparátem Bayolem a emulsifikačním činidlem je sorbit monooleát nebo manit monooleát. V nejstarší Freundově modifikaci se přidávala ještě usmrcená těla mykobakterií, což opět zesiluje a prodlužuje imunitní reakci. Ježto však přidání acidoresistentních tyčinek sensibilisuje současně až k isoalergickým reakcím, nověji se v terénní praxi obvykle vynechává.

Zajímavé je zjištění, doložené již samým Freundem¹⁴⁾ v pokusech o zvýšení antigenicity suspense tyfových bacilů, že lehký parafinový olej nemůže ve svém optimálním účinku být nahrazen žádným ze zkoušených rostlinných olejů, jako olivový olej, olej z podzemnice olejnaté, z nichž poslední sice rovněž zvyšuje titr a prodlužuje formaci protilátek, ale podstatně méně než minerální olej.

Důležitá se zdá posologie vakciny s lipoidními adjuvanciemi. V prvních pracích se vesměs navrhují injekce podkožní, které však vyvolávají zhusta nežádoucí místní reakce, záležející buď v tvorbě těžko resorbovatelných uzlíků (někdy druhotnou infekcí hnisajících) nebo vzácněji vedoucí až k nekrosám.

Naše pokusy s virusem obrny vepřů, započaté v r. 1949 na menším počtu zvířat v laboratoři a přenesené již v r. 1950 do terénní praxe, byly inspirovány Morganovou,¹⁵⁾ která ukázala, že aktivní imunisace virusem poliomyelitidy je úspěšnější, použije-li se intramuskulárních injekcí živé nebo inaktivované virusové suspense. Proto jsme hned z počátku zavedli zásadně u vepřového bravu intramuskulární vstřikování suspense virusu v parafinovém oleji s lanolinem, aby se dosáhlo rychlé imunity. V žádném z našich několika tisíců případů nedošlo k těžším lokálním komplikacím, a ačkoliv se používalo vesměs vysoce účinného virusu, byla postvakcinační onemocnění relativně vzácná. Neškodnost této vakciny s aktivním virusem jsme si vykládali tak, že lipoidní adjuvancia nejenom potencují antigenitu virusu, nýbrž i velmi zpomalují a prodlužují jeho resorpci. Je tedy organismus zaplavován pouze sub infekčními kvanty virusu, při čemž má současně dostatek času, aby odpověděl pozvolně se stupňující imunitou.

Dodatečně jsme zjistili, že se ve všech novějších pokusech o vakcinaci s lipoidními adjuvanciemi (zvláště virusovými — viz zejména Freund a Salk) používá od r. 1951 rovněž intramuskulárního způsobu injekce jako nejideálnějšího.

Před započetím orientačních experimentů na zvířatech jsme musili ještě rozhodnout otázkou, zda použijeme chřipkového virusu tak koncentrovaného, jak jej připravují (obvykle ultracentrifugací) v některých komerčních vakcích na západě.

Některé naše neúspěšně skončivší předběžné pokusy, zejména však Salkova¹⁶⁾ zevrubná srovnávací studie o imunisačním účinku virusu, vysoce, po případě slabě koncentrovaného, nám doložily, že hladina protilátek u imunisovaného objektu nestoupá paralelně se vzrůstající koncentrací virusu v použité vakcině. Používání vakcín se zvláště velkým obsahem virusu nejenom nevede k adekvátně vysokému stoupení protilátek, nýbrž je dokonce nežádoucí proto, že vyvolávají nepříjemné lokální i celkové reakce. Zjištěno na př. Salkem, že 200násobné zvýšení kvanta virusového proteinu ve vakcině vede pouze k 5násobnému zvýšení titru inhibičně hemaglutinačních protilátek, porovnáno s obsahem virusu a imunologickou odezvou u kontrolní, nekoncentrované vakciny. Naproti tomu v též pokuse stoupil počet nežádoucích reakcí z původních 15% na 80%.

Bylo nám rovněž jasno, že pro svoji vakcigu, jež v konečném provedení byla určena pro člověka, nemůžeme použít původní Freundovy metodiky, jak se nám osvědčila v pokusech na zvířatech. Měli jsme sice k disposici hodnotný lehký parafinový olej, ale jeho absolutní čistota nemohla být bezpečně stanovena (kancerogeny). Tím méně nám byla poskytnuta záruka za čistotu lanolinu. Proti použití parafinového oleje u člověka nám byly uváděny námítky se strany patologů, zatím více jen theoretické, neboť jejich závažnost ještě nemohla být v té době pokusně ověřena. Proto jsme se rozhodli prozatím zkoušit použití rostlinného oleje (arašidového) a jako stabilisátoru Al-stearátu, tedy látek, kterých se naší Biogenou (závod Roztoky) používá jako ingredience k výrobě depotního penicilinu.*)

*). Obě substance nám lask. poskytl Ing. Dr Herold, za jehož ochotu zde vzdáváme dík.

Výhodou námi použitých substancí je snadná sterilisovatelnost a pak to, že neškodnost pro člověka byla ověřena rozsáhlými zkušenostmi s depotním penicilinem.

Z výše uvedených důvodů a též proto, aby se jasně projevil potencující účinek našich adjuvancí, odhodlali jsme se k použití málo koncentrovaného, ale živého chřipkového virusu, o němž je známo, že, vstříknut v malých kvantech parenterálně, nepůsobí toxické reakce a není schopen vyvolat specifickou infekci. Jeho neškodnost byla tím spíše zaručena, že i zde, jako u zvířecích experimentů, lipoidní vehikulum nutně zpomalovalo resorpci virusu. Naproti tomu (i když máme zajištěno, že formol v užívaných dávkách nejlépe ze všech inaktivujících prostředků šetří antigenicity chřipkového virusu, vše, jak se zdá, prokazuje, že živý virus má přece jen daleko nejlepší imunogenní vlastnosti.

Jako antigenu jsme použili pouze 3 kmenů chřipkového virusu, a to PR8 (typ A), Rhodes (zástupce A₁) a Lee (typ B), adaptovaných na alantoidní vakuřecího embrya a koncentrovaných pouze adsorpčí na erytrocyty s následnou elucí do desetiny objemu fysiolog. roztoku (s fosfát. nárazníkem pH 7,4). Virusové eluáty přezkoušeny na sterilitu prolongovanou kultivací za podmínek aerobních i anaerobních. Kvůli zvýšení bezpečnosti byla však přes jejich samozřejmou sterilitu přidána antibiotika v běžně užívaných kvantech.

IMUNISAČNÍ POKUSY NA ZVÍŘATECH.

Získané eluáty měly HA titry (vyjádřené původním ředěním — před přidáním krvinek): PR8 5120, Lee 2560, Rh 5120; byly smíšeny v poměru 3:6:4 (v procentech zhružba 23% : 46% : 31%). Kmene Lee jsme přidali dvojnásobné množství vzhledem k jeho titru o polovinu nižšímu než u PR8.

Vakcina obsahovala 5120 HA jednotek v 0,5 ccm, t. j. zhružba pro PR8 1770 HA j., pro Lee 1770 HA j., a pro RH 1590 HA j. U některých pokusů jsme užili též monovalentní vakciny, připravené pouze z kmene PR8, která obsahovala 5120 HA j. v 0,5 ccm. Kontrolou obou vakcin v adjuvanciu byl týž eluát bez přidání adjuvancí.

Příprava adjuvancia:

Al-stearát, v předem odváženém množství, se tře v třecí misce za přidávání arašidového oleje po kapkách, až vznikne velmi jemná kaše; doplní se za neustálého tření arašidovým olejem tak, že Al-stearát v něm tvoří 4% suspensi. Adjuvans sterilisujeme v lahvičkách s gumovým patentním závěrem (po vyssátí vzduchu), v páře při 15 atm. po 20 minut, 2krát, v intervalu 24 hod. K odjuvanciu (teplota 25—30° C) přidáváme po kapkách (!) chřipkový eluát, neustále třepeme, aby vznikla jemná emulze — tvořená stejnými díly adjuvancia a eluátu. Takto připravená vakcina se dá při pokojových teplotách dobře nassát do inj. stříkačky silnější jehlou a je dobré aplikovatelná běžnými intramuskulárními jehlami. Lepší emulgace antigenu v adjuvanciu (vhodné zejména pro výrobu velkých dávek) dosáhneme ovšem v turmixu.

Metodika vyšetřování ser:

Serologické vyšetřování metodou inhibice hemaglutinace (IHA) prováděli jsme modifikací ustálenou v naší laboratoři.¹⁷⁾ Výsledky shrnuté v tabulkách, sloužící ke srovnání imunisační kapacity vakcin, byly získány vždy v jednom sezení za jednotných pokusných podmínek.

Rozdíly imunisačního efektu ve 2 skupinách vždy po 3 králících ukazuje tabulka 1. Králíci skupiny ADJ dostali 1,0 ccm vakciny s adjuvanciem i. m., králíci skupiny EL dostali stejné množství antigenu (= 0,5 ccm) subkutánně, tedy cestou, kterou se vakcina běžně aplikuje lidem. Čísla znamenají titry IHA

protilátek prokázaných v seru králíků, přibližně stejné váhy a věku, 27 dní po očkování. Nehledě k individuálním rozdílům v imunitní odpovědi, je rozdíl v imunisačním efektu vakciny s adjuvanciem a samé vakciny zjevný.

Tabulka 1

Číslo zvířete	EL			ADJ			
	PR 8	Lee	Rh	Číslo zvířete	PR 8	Lee	Rh
31	64	128	32	35	4096	4096	2048
32	64	128	64	36	4096	2048	512
33	32	128	64	37	1024	256	64

Tabulka 2 ukazuje stejně pozitivní vliv adjuvancia po aplikaci vakciny opicím. Šlo o opice, které před očkováním neměly ani stopy IHA protilátek. Ačkoli jsme tu dali samého eluovaného virusu dvojnásobné množství než vakciny s adjuvanciemi, nedosáhly hladiny protilátek po čistém virusovém eluátu zdaleka té výše jako u látky s adjuvanciemi.

Tabulka 2

Číslo zvířete	Před vakcinací			21 dní po vakcinaci			
	PR 8	Lee	Rh	Číslo zvířete	PR 8	Lee	Rh
EL 1.	<4	<4	<4	1.	32	32	16
ADJ 2.	<4	<4	<4	2.	256	128	256

Tabulka 3 shrnuje výsledky imunisace dvou skupin králíků po 4 zvířatech. Zde bylo užito monovalentní vakciny, tvořené eluátem PR8. Nepotencovaný eluát (EL) byl aplikován subkutánně, avšak v dvojnásobném množství (1,0 ccm antigenu), než ho bylo podáno s adjuvanciem (0,5 ccm antigenu). Krev byla odebrána 27 dní po očkování a v seru zjištován titr IHA protilátek proti PR8. Rozdíly imunisačního výsledku tu mluví opět ve prospěch adjuvancia.

Tabulka 3

Antigen	ADJ				EL						
	Čísla zvířat	40	41	42	43	Antigen	Čísla zvířat	45	46	47	48
PR 8	2048	2048	2048	2048		PR 8	256	512	1024	128	

Tabulka 4 sleduje ve 3 časových intervalech (27, 52, 77 dní) hladiny IHA protilátek u králíků, očkovaných monovalentní vakcinou (PR8) s adjuvanciemi a bez nich. Opět tu bylo dosaženo vakcinou s adjuvanciemi vysokého titru, který určitou dobu persistoval, na rozdíl od nejednotných a rychle klesajících hladin protilátek po eluátu samém, byť i aplikovaném v dvojnásobném kvantu.

Tabulka 5 konečně prokazuje, že námi užité adjuvans nemá škodlivý vliv na virusový antigen po dobu 160 dní při teplotě + 5° C. I zde jsme užili vakciny monovalentní (PR8) a v udaných časových intervalech jsme ji vstřikovali i. m. po 1,0 cm (= 0,5 ccm antigenu) vždy 2 králíkům, v jejichž serech, získaných 28 dní po očkování, jsme stanovili IHA protilátky.

Tabulka 4

ADJ

EL

Doba po očkování	Číslo zvířete	Antigen PR 8	Antigen PR 8	Číslo zvířete
27 dní	40	2048	1024	47
	41	2048	128	48
52 dní	40	4096	256	47
	41	2048	64	48
77 dní	40	1024	64	47
	41	512	32	48

Tabulka 5

Antigen	Doba uložení vakciny při +5 °C			
	21 dní	75 dní	100 dní	160 dní
PR 8	2048	1024	2048	1024
	2048	1024	2048	1024

APLIKACE VAKCINY ČLOVĚKU

K vakcinaci lidské vzata stejná šarže očkovací látky (PR8, Lee, Rhodes), jíž bylo použito ve výše uvedených pokusech se zvířaty (s adjuvanciemi). Vakcina vstříknutá — po předběžném průkazu neškodnosti u 3 laboratorních pracovníků — v množství po 1,0 ccm (0,5 ccm antigenu) i. m. do levého deltoideu celkem 20 lidem. Vlastní aplikace je zcela nebolestivá. Výjimečně byla udávána nepatrná citlivost, spíše však jen pocit mírného tlaku v místě injekce při zvednutí ruky po dobu několika hodin. Zánětlivých příznaků místních ani celkové reakce nebylo, po vakcinaci se každý vrátil bezprostředně ke své práci.

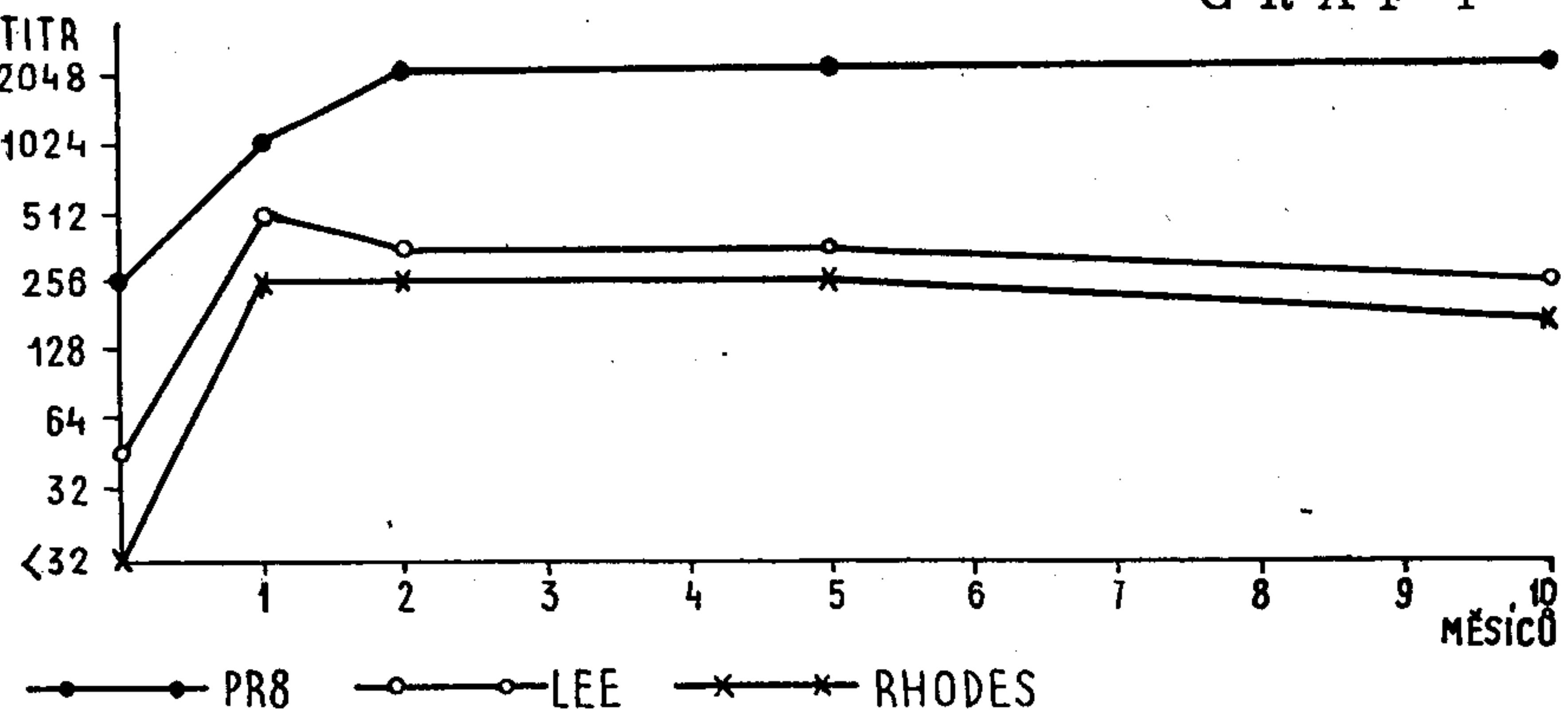
Kontrolou byl pouze jediný spolupracovník, jemuž vstříknut 1 ccm téhož eluátu subkutánně, bez adjuvancií. Místní reakce tohoto očkovaného byla nápadně veliká (zánětlivý edém a otok), bolestivá a trvala spolu se znatelnou celkovou odpovědí přibližně 4 dny.

Změny hladiny protilátek jsme kontrolovali u 8 očkovaných lidí po dobu 10 měsíců. Sera z jednotlivých krví jsme ukládali při -15° C a teprve po získání všech vzorků jsme je vyšetřili metodou IHA v jednom sezení. Nalezené hodnoty titrů protilátek byly revidovány 2krát, někde 3krát opakovanou seroreakcí.

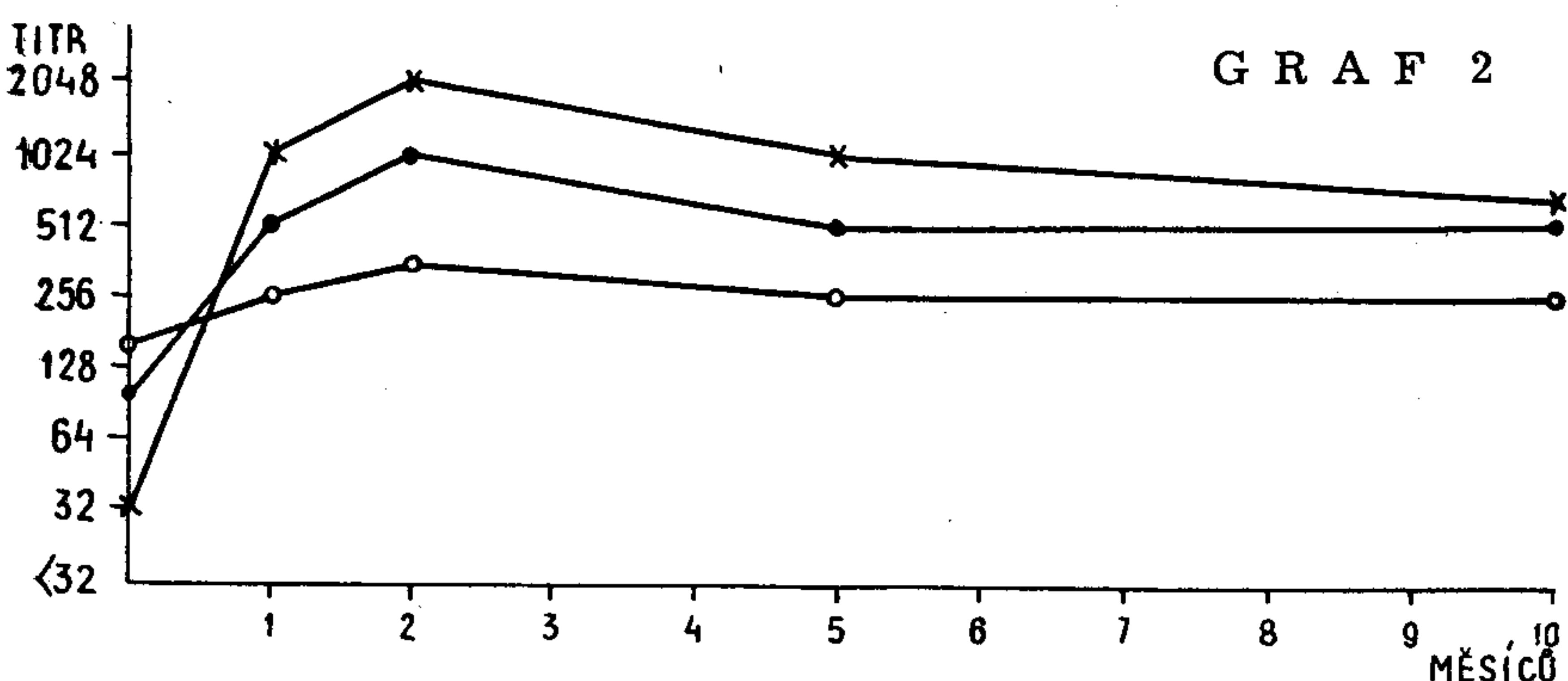
Očkovaní byli většinou studující mediciny ve věku 21—23 let. Po sledovanou dobu 10 měsíců neonemocněl žádný z nich (ani nikdo z ostatních, serologicky nesledovaných) chorobou, která by klinicky odpovídala chřipce, ačkoli v zimě r. 1952—1953 u nás proběhla epidemie chřipky.

Pět uvedených grafů ukazuje změny hladiny protilátek po vakcinaci a odpovídá 4 namátkou vybraným případům očkovaných s adjuvanciemi a shora popsané kontrole.

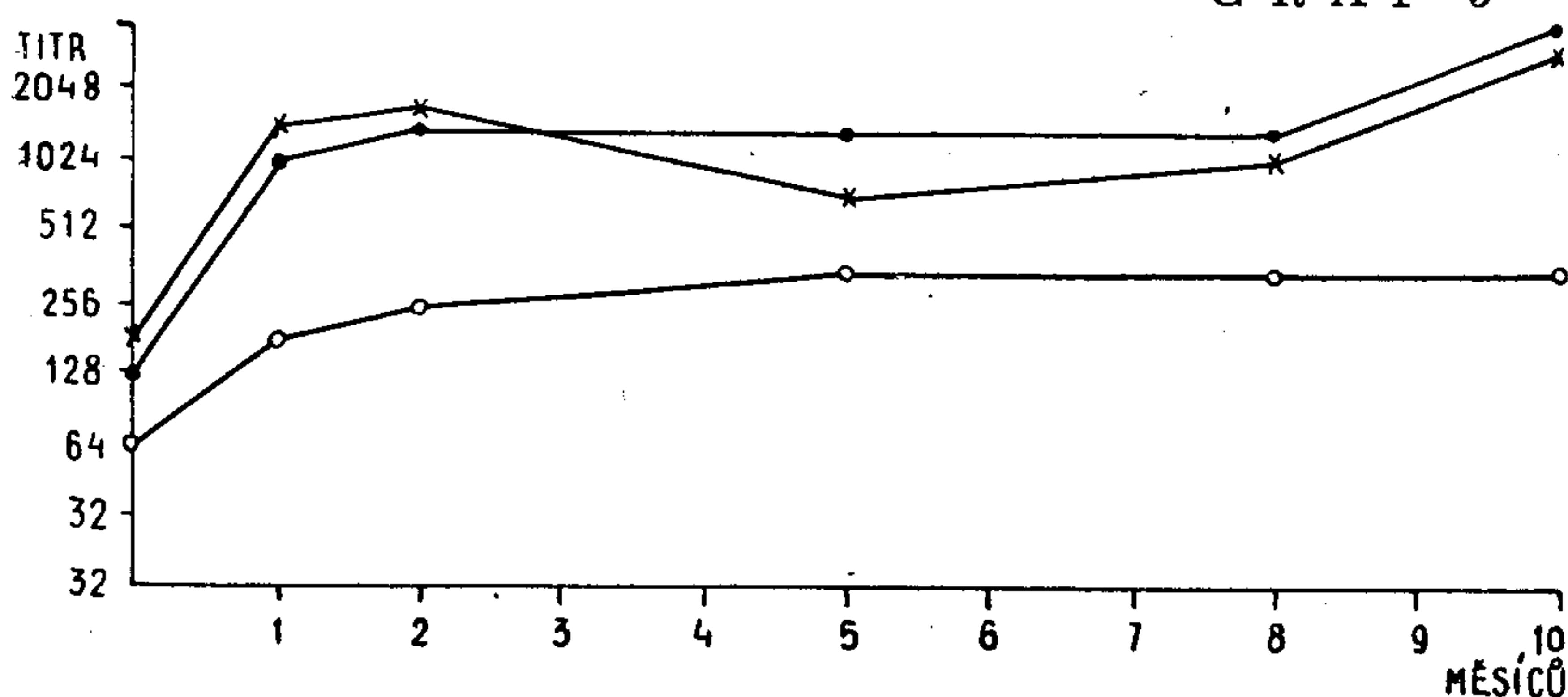
GRAF 1



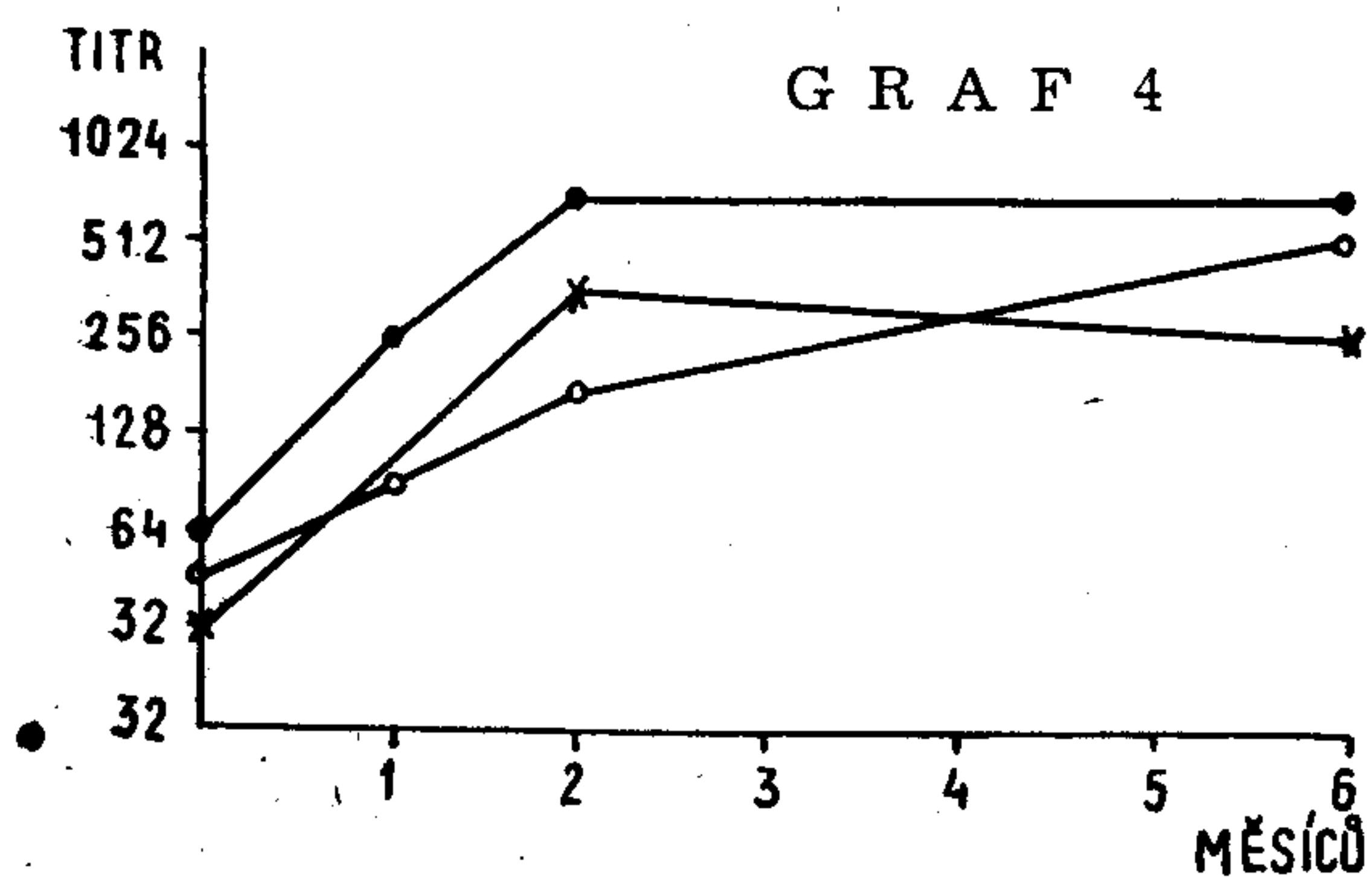
GRAF 2



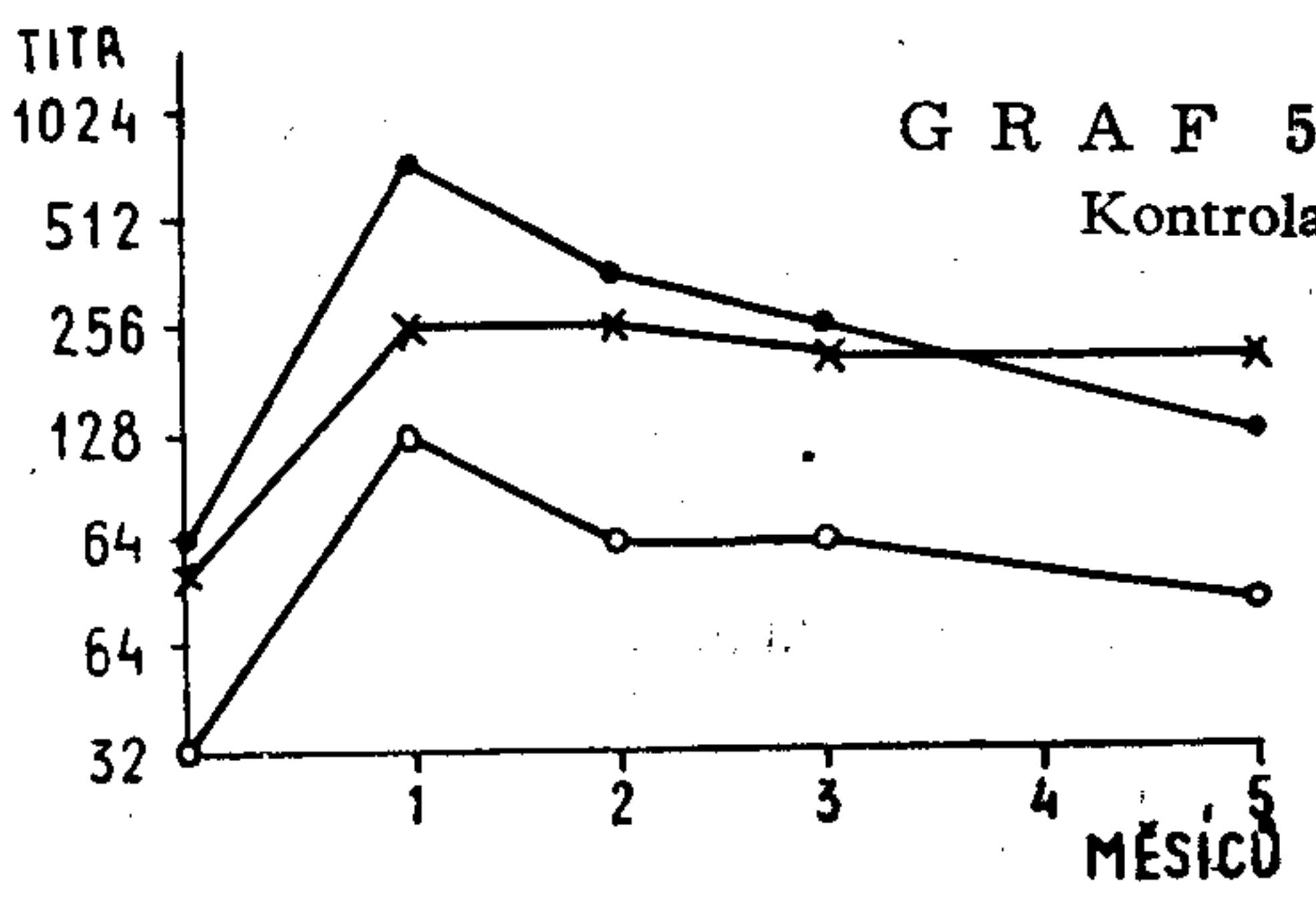
GRAF 3



GRAF 4



GRAF 5



DISKUSE

I malý počet námi sledovaných očkovaných lidí ukazuje značnou individuální rozdílnost v imunitní odpovědi, a to jak kvantitativní, tak i kvalitativní, na jednotlivé antigeny vakciny. Je tomu přibližně stejně jako u lidí, kteří přestáli přirozenou chřipkovou infekci. Nicméně však lze zřetelně vidět, že adjuvans má značný vliv na výšku hladiny IHA protilátek a jejich dlouhodobé přetravávání nad hodnotami kritickými pro imunní lidský organismus, jak je známe ze sledování protilátek u populace po proběhlé chřipkové vlně.

Vysoký titr IHA protilátek proti PR8 přetravává po dobu 10 měsíců jasně u 4 ze sledovaných případů, u zbývajících klesá nepatrně — v rámci metodické chyby reakce. Protilátky proti kmennu Rhodes persistují na dosaženém maximu po 10 měsíců jasně u jednoho případu, u ostatních klesají, rovněž však ještě v rámci možných metodických nesprávností. Nejdou ovšem průměrně do té výše jako protilátky anti PR8. Protilátky anti Lee se vytvářely v nejnižších titrech, avšak i tyto nízké hodnoty zůstávají stabilní dlouho po očkování. Kvantitativní rozdíly ve výšce titrů protilátek vzhledem ke kvalitativním rozdílům jednotlivých antigenů (zastoupených ve vakcině v přibližně stejném množství) potvrzují naši už dřívější zkušenosť, že kmen PR8 je nejlepší, Lee nejhorší antigen z užitých kmennů.

Našemu hodnocení imunního stavu po očkování by se dalo vytknout, že jako jeho indikátoru užíváme pouze jediné serologické zkoušky, a to IHA. Právě v tom si však počínáme shodně s většinou pracovníků na obdobném thematu, kteří rovněž používají testu IHA jako běžného a relativně přesného prostředku, hodnotícího dosažený stav imunity. Z domácích prací poukazujeme zejména na publikaci Blaškoviče a Libíkové, kteří celoročním sledováním hladiny protilátek u očkovaných dobrovolníků nemohli určit rozdílnost protilátek měřených 2 různými zkouškami, t. j. inhibicí hemaglutinace a seroneutralisací.¹⁸⁾

Hlavním smyslem naší práce je zjištění 2 významných fakt: 1. Použili jsme principu, kterým (ač v podstatě není nový) jsme dokázali, že je možno za pomocí u nás snadno a v jakémkoli kvantu dosažitelných lipoidních adjuvancí vyrobit protichřipkovou vakcinvu, která u 20 lidí, jimž prozatím vstříknuta, nevyvolala nejmenších nepříznivých nebo obtížných symptomů. Uznáváme, že je počet očkovaných příliš nepatrný, abychom se mohli odvážit v tomto bodě definitivního závěru. V každém případě jsou však dosavadní výsledky do té míry povzbuzující, že podle našeho názoru stojí za prověření v širším měřítku. 2. Přidání lipoidních adjuvancí k málo koncentrovanému chřipkovému virusu z alantoidní tekutiny vedlo v našich pokusech k dlouhodobému a kvantitativně tak vysokému zvýšení titru IHA protilátek, že (posuzováno podle lidských případů) byly vesměs nad hladinou kritickou pro imunitní stav.

Jasný nedostatek naší práce je v tom, že bylo možno z technických důvodů použít pouze jediného lidského případu jako kontroly, t. j. člověka imunisovaného bez lipoidních adjuvancí. Pokusy na zvířatech však naprosto zřetelně a jednoznačně ukazují imunogení převahu virusu, podaného dokonce jen v poloviční dávce, ale s lipoidními adjuvancemi.

Jsme si samozřejmě vědomi toho, že náš pracovní postup nebyl optimální již proto, že námi použitá lipoidní adjuvancia, jak vytčeno v úvodu, mohou dávat pouze středně dobré výsledky. Přiznáváme, že jsme byli sami překvapeni dosaženými imunitními hodnotami, zejména u pokusů na zvířatech. Zdá se, že by námi užitý princip adjuvancí s rostlinným olejem naznačoval cestu, která by měla být znova a bedlivěji prozkoumána, po případě revidována do použitelnosti v širší lidské očkovací praxi. Soudíme totiž, že by rostlinné oleje byly

člověkem mnohem lépe snášeny nežli minerální, a kromě toho by mimo jiné odpadla i ta námitka, jíž se obírají Salk a j., ukazujíce na možnost nebezpečí z eventuálního parenterálního vpravování kancerogenních látek do lidského těla. Jedním z paralelních cílů našich orientačních experimentů je zásadně upozornit na to, že se použití metod s lipoidními adjuvanciemi k aktivní imunisaci nabízí ve stále stoupajícím měřítku nejen pro laboratorní a veterinární, nýbrž i humánní praxi.

Z literatury je známo, že po Wardově a Freundově¹⁹⁾ průkazu o možnosti potencování antigenicity poliomyelitického virusu bylo tohoto principu ve velkém použito Salkem nejenom na opicích,²⁰⁾ nýbrž u člověka pro formalinisovaný virus polio ze tkáňových kultur.²¹⁾

Poslední autor byl také patrně první, který po Friedewaldových²²⁾ a vlastních pokusech na zvířatech provedl rozsáhlou očkovací kampaň proti chřipce u lidí vakcinou s adjuvanciemi. Jak jsme si dodatečně ověřili ze Salkovy práce, jež nám byla v době našich prvních pokusů neznáma, dospěl tento autor k stejné zkušenosti jako my, že se totiž intramuskulární vstřikování vakciny s adjuvanciem nejlépe snáší a je imunologicky nejhodnotnější. Salkovy výsledky pochopitelně ještě daleko předčí naše vlastní, zčásti nesporně pro mnohem vyšší účinnost minerálních lipoidních adjuvancií. Ohromný materiál, který Salk uvádí ve své poslední práci²³⁾ (výsledky očkování u 20 000 lidí s kontrolou hladiny IHA protilátek až po dobu 2 let), ukazuje jasně na veliké a nečekané možnosti, které se otvírají do budoucna takto uzpůsobeným metodám aktivní imunisace.

SOUHRN

Autoři uvádějí v přehledu možnosti aktivní imunisace proti chřipce a hodnotí jejich praktickou použitelnost i výsledky u člověka.

V práci podrobně propracován princip aktivní imunisace s lipoidními adjuvanciemi, a to zhruba podle metody Freundovy, modifikovaný autory tak, že je místo parafinovaného oleje užito oleje arašídového a jako emulsifikačního prostředku aluminiumstearátu.

Chřipková vakcina tohoto složení byla vyzkoušena v řadě pokusů na králících a 2 opicích na neškodnost a antigenní účinnost; vstřikována byla intramuskulárně. Za kontrolu sloužila zvířata současně očkovaná podkožně touž vakcinou bez lipoidních adjuvancií, ale v dvojnásobné koncentraci.

Vakcina byla snášena bez reakcí. Její imunogenní účinek hodnocen IHA reakcí. Pokusy na králících vesměs prokázaly velikou superioritu vakciny s adjuvanciemi jak do výše titrů protilátek (proti kontrole až 30násobně vyšší titry), tak zejména do délky trvání jejich hladiny (u kontrol za 77 dní poklesla až k nespecifickým titrům [32, 64], vlastní pokus v téže době ještě IHA titry 512 a 1024).

Na zvířatech vyzkoušená vakcina byla vstříknuta také 20 dobrovolníkům intramuskulárně do deltoideu v dávce 1,0 ccm (0,5 ccm virusové směsi). Vybráni většinou mladí lidé mezi 21—23 lety, pouze několik starších, 48 až přes 50 let. Kontrolou byl jediný laboratorní pracovník, jenž obdržel 1,0 ccm virusové směsi bez lipoidů podkožně.

Očkovaný pouhou virusovou suspensí měl značnou, asi 4 dny trvající reakci, všichni ostatní — očkovaní s adjuvanciemi — neudávali nejmenší, ať subjektivní, ať objektivní obtíže.

Imuní stav 8 očkovaných sledován rovněž IHA reakcí po dobu až 10 měsíců. Kontrola vykazovala poměrně rychlý spád titru protilátek přibližně do 3 měsíců. Očkovaní s adjuvanciemi, ač individuálně velmi různě, zachovávali

vesměs titry protilátek po celou dobu pokusů nad hladinu kritickou pro stav imunní pohotovosti.

Autoři nechťejí činit ze své práce žádné definitivní uzávěry platné pro člověka, neboť uznávají, že počet očkovaných byl příliš malý. Pokusy na zvířatech mluví jasně ve prospěch adjuvancií. Bezvadná tolerance u lidí a jejich protilátková odezva toto zjištění prozatím potvrzuje.

Složení vakciny není optimální (minerální olej z důvodů, jež vytyčeny v práci, nahrazen rostlinným), přesto však výsledky po jejím použití jsou do té míry povzbuzující, že vybízejí k úvaze o prohloubeném prostudování a použití této i podobných metod.

ВЫВОДЫ

Авторы приводят обзор возможностей активной иммунизации против гриппа и оценивают их практическую применимость и результаты у человека

Подробно разработан принцип активной иммунизации при применении липоидных вспомогательных веществ, в общих чертах по методу Фрейнда, модифицированном авторами так, что вместо парафинового масла применено арахидное, а в качестве эмульсирующего вещества — стеарат алюминия.

Гриппозная вакцина такого состава исследовалась в ряде опытов на кроликах и 2 обезьянах на безвредность и антигенную действенность; вакция впрыскивалась в мышцу. В качестве контроля были взяты животные, которым одновременно была сделана подкожная прививка той же вакцины без липоидных вспомогательных средств, но в удвоенной концентрации.

Применение вакцины не вызывало реакций. Ее иммуногенное действие оценивалось реакцией торможения гемагглютинации. Опыты на кроликах доказали большое преимущество вакцины со вспомогательными средствами, как в отношении высоты титра антител (по сравнению с контрольными титры были даже в 30 раз выше), так особенно в отношении долговременности их уровня (у контрольных животных через 77 дней уровень понизился на высоту неспецифических титров (32, 64), сам же опыт в то же время показывал еще титры торможения гемагглютинации (512 и 1024).

Исследованная на животных вакцина была впрыснута также 20 добровольцам в дельтовидную мышцу в дозе 1,0 мл (0,5 мл вирусной смеси). Для этой цели были избраны в большинстве молодые люди от 21 до 23 лет, только несколько было пожилых, в возрасте 48 и выше 50 лет. В качестве контроля был один только лабораторный работник, получивший под кожу 1,0 мл вирусной смеси без липоидов.

У лица, которому была сделана прививка одной только вирусной взвеси, была значительная, продолжающаяся около 4 дней, реакция; все же остальные лица, которым была сделана прививка со вспомогательными средствами, не имели наишеньших, как субъективных, так и объективных жалоб.

Состояние иммунитета 8 лиц исследовалось также при помощи реакции торможения гемагглютинации в течение даже 10 месяцев. В контролльном случае было установлено сравнительно быстрое падение титра антител приблизительно в течение 3 месяцев. У лиц, которым была сделана прививка со вспомогательными средствами — хотя индивидуально весьма различно — сохранились титры антител в течение всего времени опыта выше уровня, критического для состояния иммунной готовности.

Авторы не считают возможным на основании своей работы сделать какое-либо окончательное заключение, имеющее силу для человека, т. к. признают, что количество лиц, которым была сделана прививка, было слишком малое. Опыты на животных ясно указывают на выгоду вспомогательных средств. Хорошая выносливость у людей и их реакция со стороны антител пока подтверждают это утверждение.

Состав вакцины не является оптимальным (минеральное масло, по причинам приведенным в работе, заменено растительным), но, несмотря на это, результаты ее применения являются так поощряющими, что вызывают к более глубокому изучению и применению предлагаемого и подобных методов.

Мп.

SUMMARY

The possibilities are reviewed of active immunisation against influenza and its practical use and results in man are evaluated.

The principle of active immunisation with lipoid adjuvants has been worked out in detail, roughly along the lines of Freund's method, modified by the authors in that instead of paraffin oil peanut oil is used and aluminiumstearate as an emulsifying agent.

The influenzal vaccine of this composition, administered intramuscularly, was tested in a series of experiments on rabbits and two monkeys for its harmlessness and antigenic efficacy. The control group was made up of animals, simultaneously inoculated subcutaneously with the same vaccine without lipoid adjuvants but in double concentration.

The vaccine was tolerated without reactions. Its immunogenic effect was evaluated by the IHA reaction. All the experiments on the rabbits proved the superiority of the vaccine with the adjuvants, both with regard to the antibody titres (up to 30 times higher than in the controls) and especially to the duration of their level (in the controls after 77 days it declined down to non-specific titres (32, 64), whilst at the same time the experiment proper still IHA titres 512 and 1024).

After being tested on animals the vaccine was also injected intramuscularly into the deltoid of 20 volunteers in a dose of 1,0 ccm (0,5 ccm of virus mixture). Mostly young persons between the ages of 21—23 years were selected, there were only few older ones from 48 to over 50 years. The only control was a laboratory worker who was given 1,0 ccm of virus mixture without lipoids subcutaneously.

The one inoculated with the virus mixture had a considerable reaction, lasting approximately 4 days, whilst all the others inoculated with the adjuvants did not complain of the least difficulty nor were there any untoward signs.

The state of immunity in the 8 inoculated subjects was also followed by the IHA reaction over a period of up to 10 months. The control showed a comparatively rapid fall in antibody titre within approximately 3 months. Those inoculated with the adjuvants, though widely varying individually, retained invariably all along titres above the critical level of immune alertness.

The authors do not propose to draw any definitive conclusions, valid for man, for they realise that the number of inoculated subjects in this work is too small. The experiments on the animals speak clearly in favour of the adjuvants. This finding is, for the time being, confirmed by the perfect tolerance in human beings and their antibody responses.

The composition of the vaccine is not optimal (the mineral oil was for reasons given in the paper, substituted by vegetable oil), nevertheless the results following its use are so much encouraging that they call for a thorough exploration and utilisation of this and similar methods.

LITERATURA

1. Shope, R. E., J. Exp. M., 64, 47, 1936. — Francis, T. Jr., Magill T. P., P. S. E. B. M., 33, 604, 1936. — 2. Patočka, F., Člč, 80, 813, 1941. — 3. Čalkina, O. M., Arch. Sci. Biol., 52, 126, 1938. — 4. Burnet, F. M., Foley M., Med. J. Austral., 2, 655, 1940, Burnet, F.M., Lush D., Brit. J. Exp. Path., 19, 17, 1938, Francis, T. Jr., P. S. E. B. M. 43, 337, 1940. — 5. Zakstelskaja, Ritova, ŽMEI, 8, 56, 1953. — 6. Smorodincev, A. A., Šiškina, O. I., Arch. ges. Virusf., II., 156, 1941, Smorodincev, A. A., Šiškina, O. I., Arch. ges. Virusf., II., 176, 1941. — 7. Francis, T. Jr. a spol., Am. J. Hyg., 37, 294, 1943. — 8. Solověv a Šubladzová, Gajdamovičová: Prakt. virologie, Moskva, 1951, 20. — 9. Smorodincev, Gulmov, Čalkina, Ztschr. f. klin. Med., 138, 755, 1940. — 10. Blaškovič, D., Salk, J. E., P. S. E. B. M., 65, 352, 1947. — 11. Patočka, Kubelka, Boháč, HEM, II, 22, 1953. — 12. Freund, Bonanto, J. Immunol., 48, 325, 1943. — 13. Freund, Lipton, Pisani, P. S. E. B. M., 68, 609, 1948. — 14. Freund, Ann. Review of Microbiol., 304, 1947. — 15. Morgan, I. Intern. Polio Conf., New York, 1949, 263. — 16. Salk, J. Immunol., 58, 369, 1948. — 17. Slonim, Doubek, HEM, II, 73, 1953. — 18. Blaškovič, Libíková, Čs. biol., 1, 148, 1952. — 19. Ward, Freund, a spol., P. S. E. B. M., 47, 536, 1950. — 20. Salk a spol., Am. J. Hyg., 54, 216, 1951. — 21. Salk a spol., J. A. M. A., 151, 1081, 1953. — 22. Friedewald, J. Exp. M., 80, 477, 1944. — 23. Salk a spol., Am. J. publ. Hlth., 41, 669, 1951, Salk a spol., Am. J. Hyg., 55, 439, 1952, Salk a spol., J. A. M. A., 1953.