MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ

POLIOMYELITIS

Soubor přednášek z celostátní konference o neuroinfekcích v březnu 1954 v Praze

Klinika: PROF. DR JAROSLAV PROCHÁZKA
Mikrobiologie: PROF. DR FR. PATOČKA A DR K. ŽÁČEK
Epidemiologie: DOC. DR K. RAŠKA A ING. J. RADKOVSKÝ

PRAHA 1954

STÁTNÍ ZDRAVOTNICKÉ NAKLADATELSTVÍ

O VIRUSU POLIOMYELITIDY

Prof. MUDr Frant. Patočka

Studium poliomyelitického virusu je jedním z přesvědčivých dokladů o tom, jak dlouhodobá a vytrvalá vědecká práce, nelitující času, námahy a nákladů, dovede v konečném vítězném boji zmoci všechny překážky, které jí příroda staví v cestu a zvládne problém, který se po mnoho let zdál býti téměř neřešitelný. O virusu lidské poliomyelitidy je právem možno říci, je jej příroda obdařila všemi vlastnostmi, které ho dlouho činily nepřístupným vědeckému poznání, a že teprve dlouhodobá a tvrdá lidská práce jej učinila plastickým a zvladatelným. V roce 1908 přenesli po prvé Landsteiner a Popper virus poliomyelitidy s člověka na opici. To sice znamenalo počátek experimentálního řešení problémů lidské obrny, ale pokrok vědy zůstal i poté velmi pomalý a vědecká fakta se hromadila mnohem obtížněji než u jiných lidských virusových chorob. Roku 1939 byl isolován Armstrongem typ poliomyelitidy zvaný Lansing, přenosný též na hlodavce, čímž bylo umožněno, že pokusnictví několika málo privilegovaných laboratoří se stalo — byť i v omezeném měřítku — prakticky doménou všech virologických pracovišť na světě. Pochopitelně již studium Lansingova typu obohatilo nesmírně naše vědění o poliomyelitidě, ale ani ono nemohlo vést k vyřešení všech základních zákonitostí lidského onemocnění. Přibližně od r. 1946 až do r. 1952 byla prostudována do hloubky pathogenesa poliomyelitického onemocnění, seznány podrobněji než dříve zákonitosti eliminace virusu střevem, prokázáno viremické stadium, a konečně propracována až k pomezí rutinní metodiky seriová kultivace poliomyelitického virusu ve tkáni. Zároveň zjištěn jeho cytopathogenní efekt a specifická inhibice tohoto fenomenu homologním antiserem. Tento dramatický vzestup našeho vědění o virusu polio v průběhu několika málo let znamenal takový pokrok ve výzkumnické práci, že přímo cítíme, jak konečné vyřešení celé problematiky lidské poliomyelitidy je blízké.

Lidská poliomyelitida je — zejména v názvosloví starších autorů — označována běžně jako dětská obrna. Tento druhý název, který ukazoval na to, že choroba postihuje raný dětský věk, se stává stále více historickým. Považujeme za prokázané, že poliomyelitida v průběhu té doby, kdy je klinicky soustavněji sledována (t. j. po dobu více než jednoho století), mění ve své paralytické formě potud svůj klinický aspekt, že z onemocnění zachvacujícího téměř absolutně věk raného mládí se stává nemocí,

postihující stále častěji dobu vyspělejšího dětství, až i dospívajícího člověka. Není dodnes rozřešeno, do jaké míry participuje latentní promoření lidstva na tomto měnícím se aspektu choroby, či jak se po případě mění i biologické (zejména pathogenní) vlastnosti samého virusu.

Poliomyelitické onemocnění má do jisté míry sociální charakter. Je pochopitelno, že děti, žijící nahromaděně za špatných sociálních poměrů, jsou více promořeny lehkými, až zcela inaparentními infekty vedoucími k imunitě. Proto se také sociální ráz této nemoci v případech těžké paralysující epidemie projevuje paradoxně tím, že děti žijící odděleněji, a tedy neproimunisované infekcí, častěji podléhají paralytickým komplikacím.

Považujeme za nutné předeslat již zde několik slov o tom, co bude dále podrobněji rozvedeno: proč mluvíme záměrně o *paralytické* poliomyelitidě. Činíme tak proto, že celá dnešní koncepce poliomyelitidy je nakloněna tomu, považovat poliomyelitidu primárně za celkem necharakteristické onemocnění intestinálního traktu, které jen v některých případech vede k nervovým komplikacím, kteréžto symptomy zachvácení ústřední nervové soustavy klinikové (podle staršího pojetí) ještě dnes označují jedině jako poliomyelitis.

Vyvolavatelem poliomyelitidy je filtrovaný virus, jehož úplnou definici virologie prozatím ještě není schopna podat. Virus má však mnoho základních vlastností, jichž souborem se liší od ostatních pro člověka pathogenních virusů, jak dále uvádíme: v principu jde o virusy malých rozměrů, jejichž dimense (podle údajů různých autorů) kolísají mezi 12 až 38 mμ, a pokud lze věřit elektronoptickým snímkům z poslední doby, jsou zhruba okrouhlých, až ovoidních rozměrů. Zvláštní vlastností je jejich téměř absolutní resistence na ether a poměrně malá citlivost na chemická desinficiencia. Polio virusy jsou aktivní ve velmi širokém rozmezí pH, a to zhruba od pH 4—10.

S jejich celkovou resistencí na vlivy zevního prostředí kontrastuje jasně patrná citlivost na vyschnutí a lyofilisační procedury. Žádný z lidských polio virusů nevyvolává hemaglutinaci skopčích erythrocytů.

Infekční titr poliomyelitických virusů v ústřední nervové soustavě u člověka i v míše experimentálně infikovaných zvířat je poměrně nízký a kromě afinity k ústřední nervové soustavě (zejména k míše) mají zcela speciální, nověji zvláště zdůrazňovanou a pro pathogenesu důležitou afinitu k intestinálnímu traktu.

Množení polio virusů v kuřecím embryu je možné pouze za zvláštního experimentálního uspořádání a nemá prozatím praktický význam. Kultivace ve tkáni byla teprve nejnověji propracována na rutinní, a jak se ukazuje, nesmírně důležitou pracovní metodiku, je však možna pouze za použití tkáně lidské nebo opičí. Množení virusu na fibroblastech nebo epitheliálních buňkách je doprovázeno jejich rozpadem, jemuž lze za-

bránit protilátkami. Ačkoliv tento cytolytický fenomen není absolutně specifický pro virusy polio, je přece jen zjevem tak nápadným a prozatím v říši živočišných virusů relativně vzácným, že ho lze užít k rutinní diagnostice polio.

Zdá se, že neexistuje v přírodě jiný zdroj poliomyelitické infekce nežli infikovaný člověk, a různé druhy hmyzu jsou patrně jen více méně mechanickými přenašeči nákazy. Kromě dosud celkem záhadné infekce střevního traktu je absolutně typickým projevem lidské polio maximum změn a nesporně i kvant virusu v předních míšních rozích.

Zůstává částečně otevřenou otázkou, zda lidské poliomyelitické virusy s vlastnostmi, jež jsme ve stručném přehledu uvedli, jsou v říši ssavčích virusů skupinou zcela osamělou, či zda jsou známy jiné virusy jim tak podobné, že je možno zařadit je zároveň s těmito virusy do společné skupiny. Tato otázka souvisí do značné míry s moderní snahou po taxonomii a binominální nomenklatuře u virusů vůbec. Jak známo, vychází nejnověji popud k vědeckému označení virusů a ještě více k jejich skupinovému seřazení (pokud možno na podkladě biologické a antigenní příbuznosti nebo dokonce vývojových vztahů) i od sovětských autorů. Ve svém přehledu uvádíme tedy tři taxonomické návrhy, ze kterých je jasná jednak skupinová samostatnost poliomyelitidy, jednak její příbuzenské vztahy k některým jiným virusům zvířecím a lidským.

1. V. M. Ždanov[1] v ordo Protovirales uvádí důležitou familia Neuromyophilaceae, v níž genus Myelophilus se svými třemi antigenními typy odpovídá lidské poliomyelitidě. Jemu nejblíže stojí genus Cerebrophilus, jenž má dva species, již dostatečně studované, aby sem s jistotou mohly být zařazeny, a to Cerebrophilus muris a Cerebrophilus suis. Naproti tomu C. caviae a C. gallinarum jsou prozatím příliš málo známy, nežli aby jejich taxonomická posice byla naprosto jistá. Vzdálenější genera jsou Cardiophilus (odpovídá virusu EMC) a Myophilus (C virusy).

2. Druhá klasifikace je Jungenblutova,[2] ta však není zcela jasná. Zahrnuje do jedné velké skupiny:

I. Lidské virusy:
   a) vlastní poliomyelitis,
   b) parapolio (virusy EMC),
   c) pseudopolio (C virusy).

II. Myší virusy: Theiler — TO, FA, GD VII.

III. Vepřový virus: Kloboukem objevená encephalomyelitis enzootica suum.

3. Naší koncepci je nejbližší klasifikace Koprowského,[3] která podle našeho názoru velmi správně zužuje skupinu vlastních poliomyelitických virusů na genus zvané *Landsteineriota*, jež má tři species. Species 1.: L. levaditii odpovídající lidským polio virusům se třemi variantami: I.

(Brunhilda), II. (Lansing), III. (Leon). Species 2. je t. zv. L. Theileri (rovněž se třemi variantami), jež shrnuje virusy myší enzootické encephalomyelitidy. Species 3. je L. Klobouki (Těšínská nemoc neboli encephalomyelitis enzootica suum). S příbuzností virusu polio a Kloboukova souhlasí plně také Čumakov.[4]

Bylo jedním z našich úkolů — zevrubně popsaným na jiném místě — prokázat, že virus Kloboukovy nemoci je dnes již natolik prostudován, aby mohl být zařazen do stejné skupiny s lidskou polio. Podle našeho názoru přísluší skutečně poliomyelitickým virusům samostatné postavení v rámci dosti uzavřené skupiny, jak zhruba ji postuluje Koprowski, nebo jak ji naznačuje Ždanov ve svých dvou shora uvedených generech. Je ovšem také jisto, že od této značně specifikované skupiny poliomyelitických virusů vede vývojová linie k virusům stále složitějším, z nichž poliomyelitidě snad nejblíže stojí skupina C virusů. O něco vzdálenější, postihující celý komplex ústřední nervové soustavy a k tomu i jiné orgány (zejména myokard a játra), je skupina virusů t. zv. encefalomyokarditických, mezi nimiž z hlodavců byl isolován virus MM a Columbia SK, z anthropoidních opic vlastní EMC virus, z člověka opětovaně t. zv. F virusy a jednou či dvakráte africký Mengo virus. Tento virus považují mnozí autoři za přechod k africké skupině arthropody přenosných encefalitických i celkových virusových chorob, od nichž přes západonilskou horečku jdou další vývojové vztahy, prokazatelné určitými antigenními frakcemi. Ty směřují jednak ke skupině t. zv. transmisivních encefalitid, rozšířených po evropském a asijském kontinentě, jednak dokonce až k celkovým virusovým chorobám, t. j. ke žluté zimnici a horečce Dengue (Sabin).[5]

Není naším úkolem rozebírat zde klinickou symptomatologii paralytické polio. Zdůrazňujeme pouze (aniž se, byť i jen přibližně pokoušíme odhadnouti jejich počet) častý výskyt inaparentní formy poliomyelitidy, která je dnes většinou autorů ztotožňována se základní, t. j. intestinální formou poliomyelitického onemocnění.

Jsou autoři, kteří poměr inaparentní polio k poliomyelitidě nervové udávají mnohonásobkem první. To skutečně asi platí pro některé typy (zejména snad Lansing) nebo kmeny poliomyelitických virusů v době maxima endemického sezónního výskytu v mírném pásmu. U jiných kmenů nebo v průběhu dramatické epidemie je poměr základní, t. j. inaparentní choroby k chorobě paralytické přibližně vyrovnán nebo dokonce zvýšen frekvencí nervové poliomyelitidy.

Dvojfázovitost průběhu poliomyelitického onemocnění je dostatečně známa a bude vylíčena v klinické části přednášek.

Případy druhého onemocnění paralytickou polio u téhož člověka řádně ověřené jsou poměrně vzácné. Pokud byly Bodianem[6] a Salkem imunologicky prostudovány, šlo po druhé vždy o chorobu vyvolanou jiným typem

poliomyelitického virusu, než byl virus, jenž způsobil první onemocnění.

Zkušenosti sbírané na laboratorně prověřeném materiálu v průběhu druhé světové války a po ní jasně ukazují, že poliomyelitida patří velmi pravděpodobně mezi virusové choroby rozšířené po celém světě, a to přibližně až k polárnímu kruhu. Paralytická onemocnění přicházejí hlavně v mírném pásmu, při čemž z Evropy jsou nejvíce postiženy skandinavské státy, ze západní polokoule U. S. A. a jižní Kanada. Právě ve Skandinavii a U. S. A. lze nejlépe sledovat v průběhu více než jednoho století měnící se aspekt nervové poliomyelitidy, jak bylo uvedeno. Střední Evropa a zejména Československo mělo první velikou celostátní epidemii v roce 1939 a druhou roku 1948. Od té doby je i pro nás paralytická poliomyelitida problémem prvořadé důležitosti. Sovětský svaz zůstal prozatím velkých epidemií ušetřen a jeho situace (alespoň v západních částech státu) je asi přibližně stejná nebo i lepší, než byla u nás před rokem 1939.

Neparalytická poliomyelitida, případně abortivní formy polio jsou nesporně rozšířeny po celém světě. Soudě podle přítomnosti protilátek u malých dětí, persistuje i na tropických ostrovech Tichého oceánu (Guam).

V Egyptě nalezl Paul[7] protilátky u malých dětí proti typu Lansing v mnoha případech již do konce druhého roku života, proti oběma dalším typům do čtyř let. Tento nález byl dodatečně potvrzen Melnickem přímým průkazem virusu ve stolici klinicky zdravého dítěte, starého necelých dvanáct měsíců, a to mimo jakoukoliv epidemii.

Epidemiologické studie prováděné u Eskymáků na Aljašce zdají se potvrzovat, že za polárním kruhem základní forma polio de norma nepřichází. Pokud se zde poliomyelitida vyskytuje, jde vždy o epidemii paralytické poliomyelitidy, která sem byla náhodnými cestujícími zavlečena. Lidé, kteří při těchto epidemiích onemocněli, měli protilátky proti virusu déle než 20 let. Generace narozené po epidemii byly bez jakékoliv imunologické odezvy (Paul).[8]

Inkubační dobu poliomyelitického onemocnění lze z pochopitelných důvodů určit s větší přesností pouze u paralytické formy poliomyelitidy. I tyto údaje jsou však velmi odlišné a nepřesné, proto se udává rozmezí inkubace nápadně široké, a to přibližně od pěti až do třiceti pěti dnů. Hammon pozoroval nejkratší inkubační dobu (u narozeného dítěte infikovaného od ošetřovatelky) čtyři dny. Většina autorů se však shoduje na nejčastějším průměru inkubační doby, jež kolísá mezi osmi až patnácti dny.

Již stanovení velikosti poliomyelitického virusu a ještě více jeho elektronoptické znázornění narážely na obtíže, které se podařilo přemoci teprve v poslední době. Není snad druhý virus, jehož velikost i elektronoptický tvar by byly určovány tak různými hodnotami jako právě virus

poliomyelitidy. Pracovní obtíže mají hlavně dvojí podklad; jednak patří virus polio do kategorie nejmenších virusů, kde obecně lze prozatím stanovit rozměry jen přibližnými hodnotami. Elektronoptika vlastního virusu je velmi nesnadná již proto, že se dá těžko odlišit virus od částeček tkáňové drtě. Druhou nesnází, která nesporně bude v nejbližší době odstraněna, je okolnost, že až přibližně do r. 1951 byla jediným vydatným zdrojem tohoto virusu mícha infikovaných opic nebo některých hlodavců, t. j. materiál jen obtížně purifikovatelný, s velkým kvantem balastního substrátu, a porovnáno na př. s virusy transmisivních encefalitid, přítomným v poměrně nízkém titru. Dnes již patří celkem historii údaje Sven Gardovy o vláknité, několik set milimiker dlouhé formě poliomyelitického virusu ze stoličních purifikátů. Zdá se, že prvé přesnější údaje byly podány Loringem, Martonem a Schwerdtem[9] pro typ Lansing, nálezem ovoidních útvarů, velikosti kolem 25 mμ. Později lze nalézt hodnoty spíše nižší, zjištěné zejména metodou ultrafiltrační. Tak na př. Elford udává rozměry polio virusu mezi 8—12 mμ, Theiler a Gard 10—15 mμ. O něco později, zejména určením sedimentační konstanty, nalézáme limitní hodnoty mezi 12—30 mμ podle Loringa a kolem 20 mμ podle Kausche a Bendera. Nejnověji jsou starší a nízké údaje korigovány, a to jak metodou ultracentrifugační, tak zčásti též elektronoptickým obrazem.

Polson a Selzer[10] purifikovali kmen MEF 1, při čemž zjistili, že jeho částečky, pravděpodobně sférické, mají rozměry až do 25 či 30 mμ. Tíž autoři u typu Leon stanovili podle sedimentační konstanty velmi přesně rozměry kolem 30 mμ. Tento nález velmi krásně potvrzuje správnost práce Reaganovy a spol.,[11] kteří nalezli v purifikátu téhož typu poliomyelitidy virusové partikule, protáhle ovoidní podoby, široké kolem 15 mμ a dlouhé 25—30 mμ. Poslední typ, t. j. Brunhilda, byl zpracován týmiž autory již o něco dříve a zjištěn jako sférický, rozměrů od 20 mμ, dokonce až téměř k 50 mμ. Podle našeho názoru blíží se novější údaje nejvíce pravdě a elektronoptické snímky, na př. u typu Leon, jsou tak jasné, že celkem nepochybujeme o tom, že na nich plasticky znázorněná tělíska odpovídají skutečně partikulím poliomyelitického virusu.

Jak již uvedeno, elektronoptické znázornění virusu předpokládá vyspělou metodiku purifikace. Ve své práci z r. 1950[12] jsme popsali řadu purifikačních metod, z nichž se dodnes s úspěchem užívá kombinace kyselé precipitace virusu a precipitace methanolem při temperatuře pod 0° C. Sami jsme této metodiky použili s relativním úspěchem k purifikaci virusu poliomyelitidy vepřů. Novinkou, znamenitě ulehčující purifikační procedury, je zavedení precipitace protamin-sulfátem (nejvhodnějším preparátem je salmin-sulfát), jenž přidán v určitém kvantu k míšní suspensi, vyprecipituje za současného snížení pH ohromnou většinu balastních lipoproteinů a v lehce opaleskující suspensi zanechá téměř nezmenšená kvanta virusu (Waren, Weil a spol.).[13]

Vyčeřený virusový purifikát lze ještě dále vyčistit natrávením absolutně čistým trypsinem. Jak pochopitelno, ztrácejí již tyto nejčistší virusové preparáty částečně na své účinnosti, je však možno je koncentrovat ultracentrifugou, která i sama o sobě je schopna z obyčejných nebo etherem delipidovaných míšních suspensí oddělit poměrně čistý virus. Potřebná gravitace pro virusy tak malých rozměrů je velmi značná, přibližně 120 000krát. Z nejnovějších metod se nabízí použití materiálu, t. zv. bentonitu (Montmorillionit), jehož některé preparáty se skládají z mikroskopických krystalků, tvořících velmi elastickou mřížku a jsou schopny ze suspensí vypurifikovat vĩrusy podobných rozměrů, jako jsou na př. Coxsackie. Je zajímavé, že přes všechny pokroky v purifikaci obrny nebylo dosud dosaženo preparátu elektroforeticky homogenního, jenž by mohl být rozebrán po stránce chemické skladby.

Metody, sloužící pro průkaz malých kvant virusu ve stolici nebo v odpadových vodách, nelze nazvat purifikací virusu v pravém slova smyslu. Jde o pouhou koncentraci hrubého virusového substrátu. Za tím účelem se používá buď koncentrace ultracentrifugou (zejména nutné pro typ Lansing) nebo precipitace ammonium-sulfátem po přidání malého kvanta nativních proteinů. Získaný precipitát strhuje s sebou virus, který je eluován do 10—50krát menšího množství vody (Sven Gard, Melnick). Jinou zahušťovací metodou je vypařování tekutiny z odpadových vod nalitých do celofánových vaků, s přidáním protekčních bílkovin, za thermického účinku infračervených paprsků. Je pochopitelno, že konečný koncentrát musí být v každém případě zbaven bakteriální kontaminace buď přidáním etheru nebo penicilinu + streptomycinu tak, aby bez nebezpečí mohl být vstříknut pokusným zvířatům po případě i intracerebrálně. Výsledky nejsou vždy povzbuzující, neboť mnoho zvířat hyne toxickou smrtí.

Resistence poliomyelitických virusů na zevní nepříznivé podmínky je relativně značná. Z antiseptik se odedávna považují za nejúčinnější antiseptika oxydační jako na př. kalium permanganát a chlornany, velmi účinné je také chlorové vápno, chloramin a sublimát. Ultrafialové paprsky a formaldehyd v malých dávkách inaktivují virus, aniž hlouběji porušují jeho antigenní strukturu. Přirozeně ve větších dávkách a po příliš dlouhém působení účinkují zhoubně i na ni. Několik minut zahřátí na 55° C ničí virus i v míšní suspensi irreversibilně. V infikované míše vložené do 50% glycerinu a uchované při —4° C vydrží virus i několik měsíců bez zřetelné změny ve své aktivitě. Ještě lépe je virus konservován uložením infikované míchy při temperatuře suchého ledu. Zcela neobyčejná je odolnost virusu vepřové obrny na metabolické produkty střevních bakterií.

O neobyčejné resistenci svědčí také to, jak je virus polio odolný na široké rozmezí pH (Hammon zjišťoval plnou aktivitu v prostředí od pH 4

do pH 10, působící na virus po dobu 24 hod.). Za velmi charakteristickou vlastnost pokládá Sven Gard, spolu s četnými jinými autory, prakticky absolutní necitlivost virusu poliomyelitidy na ether. I když ani tato vlastnost není zcela specifická jen pro virus poliomyelitický, je právě u něho do té míry vystupňována, že se ve starších metodách vesměs užívalo etheru ke zničení mikrobů v suspensi ze stolic.

Zcela zvláštní a nesmírně důležitou kapitolou, zejména po stránce epidemiologické a preventivní, je sledování účinku různých chemikálií na virus poliomyelitický, vylučovaný stolicí. Jak ještě dále bude zdůrazněno, je tato eliminace masivních kvant poliomyelitického virusu základním symptomem poliomyelitického onemocnění a nesporně nejdůležitější příčinou rozšiřování virusu v přírodě. Je jisto, že včasné a účinné potlačení eliminace virusu střevem, nejenom u paralytických případů choroby, ale i u všech suspektních a inaparentních infekcí, by znamenalo potlačení epidemie v zárodku. Proto se intensivně hledaly látky, tímto způsobem vydatně účinkující a přitom netoxické. Skupina autorů (Lo Grippo, Earle, Graef, Ward)[14] v modelovém pokusu s Theilerovým virusem zjistili, že do jisté míry takto účinkuje kalomel, ale ještě mnohem účinnější substancí je organická sloučenina rtuti s patentním označením MC 858, což je merkuro-alfa-mercapto-p-(2-thiazolylsulfamyl) acetanilid mononatriová sůl, zejména při profylaktickém podávání. Později rozšířili autoři pokusy též na člověka a zjistili, že u 50% touto látkou léčených lidských vyměšovačů se postupně snižoval titr virusu ve stolici, až po 7 dnech zmizel úplně. Není prozatím jasno, zda jde o prostý účinek desinfekční či snad o proces analogický chemotherapii, ale tolik je jisto, že tím byl učiněn počátek bádání, jež může mít pro vyřešení problému polio u člověka nejvyšší význam.

S výše rozvedenou a velmi význačnou obecnou resistencí poliomyelitického virusu velmi kontrastuje vlastnost, považovaná Koprowskim za tak význačnou, že přímo druhově ohraničuje skupinu virusů poliomyelitických od jim biologicky nesporně příbuzných a také na ether resistentních, t. j. virusů C: je to jejich citlivost na lyofilisaci. Ukázalo se na př., že polio kmen MEF 1, lyofilisovaný a podrobený delipidaci benzolem a etherem, ztratil úplně svoje pathogenní vlastnosti, kdežto C virusy za stejných okolností pouze snížily svůj infekční titr.

Novodobá virologie — od doby Hirstova objevu hemaglutinace chřipkovým virusem — sleduje bedlivě účinek všech virusů na nejrůznější ssavčí erythrocyty. Tak bylo zjištěno, že skupina encefalomyokarditidy vyvolává vesměs jasnou hemaglutinaci skopčích krvinek. Za použití zvláště jemné pracovní metodiky bylo prokázáno, že i jeden z Theilerových myších virusů (GD VII) aglutinuje lidské krvinky 0 skupiny. Hemaglutinační schopnost však nebyla dosud ani v jediném případě prokázána pro kterýkoliv ze známých kmenů lidské poliomyelitidy. Je tedy nedostatek

pokusných zvířat vůbec, t. j. šimpanzů, které nás přibližuje k prozkoumání skutečné podstaty poliomyelitického onemocnění. Ještě dnes někteří zkušení experimentátoři (Olitsky, Jungenblut) věří tomu, že existují kmeny poliomyelitického virusu, jež jsou tak specifikovány na člověka, že nemohou být přeneseny pokusně ani na opici.

Běžná cesta experimentální inokulace u opice je intracerebrální. Nověji přesně vybráno zvláštní místo na lebce, jehož punkcí se zavede jehla do blízkosti thalamu. Injekce infekčního materiálu do této krajiny vede nejbezpečněji k positivnímu resultátu. Ještě nověji bylo prokázáno, že průkaz nejmenšího kvanta virusu experimentem je možný vstříknutím zkoušeného materiálu současně do obou hemisfér mozkových. Inkubační doba a symptomatologie takto vzniklé experimentální nemoci jsou zhruba stejné jako u lidské paralytické poliomyelitidy. Smrtnost, která pochopitelně záleží také na kvantu a zejména ovšem i na virulenci virusu, je pravidelně větší. Nejběžněji užívanou opicí pro laboratorní práce s poliomyelitidou je Maccacus rhesus.

Záhy se však ukázalo, že jiné druhy jsou daleko citlivější a vnímavější pro infekci jinými cestami než je cesta intracerebrální, která z pochopitelných důvodů neodpovídá lidské přirozené infekci. Z menších opic se ukázal nejcitlivějším Maccacus cynomolgus, první zvíře, u něhož Levaditi dosáhl infekci zažívacím traktem, a to vstříknutím infikované míšní suspense sondou do duodena.

Rovněž injekcí intraperitoneální, intraneurální a vzácněji i intramuskulární lze vyvolat, byť i méně pravidelně, paralytické onemocnění. Velmi úspěšnou inokulační cestou je instilace virusu intranasálně. Nověji prokázal Bodian možnost vyvolání paralytické poliomyelitidy dokonce i vstříknutím virusu do srdce, zejména tehdy, když zvíře bylo intramuskulárně na periferii zatíženo vstříknutím gelatiny nebo cortisonu.

Virulence různých kmenů poliomyelitického virusu pro opice (nesporně platí totéž i pro člověka) je nesmírně různá. Jsou kmeny, které i při intracerebrální inokulaci velkých kvant jen ztěží vyvolávají klinickou infekci i jiné, jež příležitostně vedou k paralysám i po vstříknutí intradermálním. Tato paralysující schopnost různých kmenů poliomyelitických virusů, kterou označujeme jako virulenci, je nezávislá na infekčním titru toho kterého virusu a pravděpodobně má velký význam i v průběhu epidemií lidské choroby.

Porovnáváním infekčního titru různých částí ústřední nervové soustavy bylo zjištěno, že nesporně nejvíce virusu obsahuje krční část míchy zvířete, zabitého v samém začátku paralys. Přežije-li zvíře obrny, klesá množství virusu v míše velmi rychle, takže 5. nebo 6. den od počátku paralytického onemocnění jej prakticky již téměř nelze dokázat. Maximální kvanta virusu, obsažená v ústřední nervové soustavě infikovaného zvířete, jsou, porovnáno s virusy encefalitickými, relativně nízká. Nej-

vyšší titry paralysujících kmenů při intracerebrálním vstřikování opicím (počítáno pro PD_{50} [paralysující dávka], což je maximální zředění virusu, vyvolávající *paralysy* u 50% infikovaných zvířat) jsou u typu Brunhilda až $10^{-4.5}$, u typu Leon 10^{-5}, výjimečně 10^{-6}. Běžné kmeny však mívají titr pouze kolem $PD_{50} = 10^{-3}$ až 10^{-4}. Vzhledem k tomu, že moderní virologie se snaží pokud možno stanovit svoje zákonitosti kvantitativně, jsou pokusy na opicích nesmírně nákladné. Proto byla pochopitelná snaha nalézt jiné, přístupnější laboratorní zvíře, citlivé na poliomyelitický virus.

Po četných nedostatečně ověřených pokusech nalezl krátce před druhou světovou válkou Armstrong při epidemii v osadě Lansing kmen poliomyelitického virusu, který po několika pasážích na opici mohl být přenesen i. c. inokulací na zvláštní druh divoké krysy, žijící na bavlníkových plantážích, t. zv. Sigmodon hispidus. Přibližně po 7 pasážích ústřední nervovou soustavou těchto zvířat mohl být tento kmen přenesen i. c. i na bílou myš, u níž vyvolává příznaky chabých parés až paralys, odlišujících se od enzootického Theilerova virusu predilekčním postižením předních končetin. Dodatečně se podařilo převést tento kmen, jenž byl nazván Lansing a jenž se ukázal být antigenně odlišný od jiných kmenů polio, také na syrského křečka.

Běžný titr původního Lansinga v době, kdy prodělal 4 pasáže opicí, 7 bavlníkovou krysou a 194 myší, byl pro myš $PD_{50}=10^{-2}$, bavlníkovou krysu 10^{-3} a pro opici stále ještě $10^{-4.6}$. Od doby původního Armstrongova objevu bylo isolováno na nejrůznějších místech světa mnoho kmenů téhož typu, z nichž známé jsou zejména Y — SK a nejpathogennější pro myš MEF_1 ze sev. Afriky. Je-li typ Lansing udržován pouze v myších pasážích, klesá jeho virulence pro opici a zřejmě také pro člověka. Prototypem virusu typu Lansing, který téměř postrádá virulence, je kmen TN, jenž mohl býti bez nebezpečí použit živý perorálně k pokusu o lidskou imunisaci.

Objevem typu Lansing byly okamžitě dány všem virologickým laboratořím na světě možnosti participovat na pracích s polio. Naděje však, které při jeho objevení uváděly možnost vyřešit tím spornou problematiku poliomyelitidy, zůstaly nesplněny. Ukázalo se totiž ihned, že tento typ je laboratorním hlodavcům vočkovatelný pouze i. c. cestou, což neodpovídá — ani jako model — přirozenému lidskému onemocnění. Stejně tak záhy bylo jasno, že Lansing je pouze jediným z několika typů, které vyvolávají lidská onemocnění. Zato bylo možno použíti myší k průkazu lidských homologních, seroneutralisačních protilátek, což se prakticky začalo provádět téměř ve všech dílech světa.

Tato rozsáhlá zjištění ukázala, že, soudě podle přítomnosti zmíněných protilátek, je Lansing patrně nejvíce rozšířeným vyvolavatelem lidské poliomyelitidy, hlavně endemické, a přichází zejména v inaparentních formách. Někteří autoři (Hammon) našli protilátky proti Lansingu v hojné

míře i u domácích zvířat. Jejich původ zůstal prozatím nevysvětlen, zčásti byla dokonce vyslovena následkem tohoto nálezu i nedůvěra k jejich specificitě.

Jak z předchozího patrno, je titr Lansingova virusu u hlodavců nízký, takže z jejich ústřední nervové soustavy nebylo lze vyrábět antigen pro komplementfixační reakci, jež je méně nákladná a aktuální onemocnění přesněji prokazující, nežli seroneutralisace.

V koreferátu Dr Žáčka je uvedeno, jak Olitsky a Casals po desítkách pasáží na novorozených mláďatech myší, později pak Lahelle[16] jen v několika pasážích na novorozených mláďatech bavlníkových krys dokázali zvednout původně nízký titr tohoto virusu až do hodnot 10^{-6}, t. j. takových, kdy je možno užít ústřední nervové soustavy těchto zvířat k výrobě hodnotného antigenu.

Zmínili jsme se v souvislosti s typem Lansing o tom, že v něm byl nalezen prototyp poliomyelitického virusu zvláštních biologických vlastností, ale také odlišné antigenicity. Považujeme za vhodné se již zde zmínit i o ostatních typech poliomyelitických virusů, ač tím poněkud předbíháme kapitolu o imunitě a protilátkové odpovědi u poliomyelitidy. Zdá se, že nesporně prvními, kteří rozdělili poliomyelitické virusy na 3 antigenně a zčásti i biologicky distinktní typy, byli Kessel a Pait. Když Ward a Freund[17] ukázali možnosti rychlé aktivní imunisace zvířat za pomoci lipoidních adjuvancií i pro virusy poliomyelitidy, využil jejich metodiky zejména Salk a spolupracovníci,[18] kteří sami zpracovali imunologicky několik desítek kmenů polio imunisací opic neznámým virusem a ověřili jejich sera proti známým kmenům. Výsledkem, který byl schválen zvláštním komitétem, bylo definitivní prověření tří až dodnes uznávaných typů poliomyelitických virusů, a to:

Typ I (prototypový kmen Brunhilda, isolovaný z epidemie 1939 z Baltimoore) u opic vyvolává prudkou a náhlou paralysu s poměrně malou smrtností. Je schopen infikovat tato zvířata ve velkých dávkách nejen i. m., ale i subkutánně. PD_{50} i. c. $= 10^{-4.5}$, výjimečně 10^{-5}.

Typ II (Lansing — popsán dostatečně shora).

Typ III (prototypový kmen Leon, isolovaný 1937 v Los Angelos) má u opic nejvyšší infekční titr ($PD_{50} = ^{-5\ až\ -6}$), prudký začátek choroby a vysokou mortalitu. Pro člověka se zdá být nejnebezpečnějším vyvolavatelem paralytického onemocnění a až do nedávna, vinou nedokonalé isolační metodiky, byl považován (patrně mylně) za nejvzácnější.

Dosud je nerozřešena otázka, do jaké míry jsou touto klasifikací postiženy všechny v přírodě přicházející kmeny poliomyelitidy vůbec. Podle všeho se zdá, že další překvapení jsou možna tím spíše, že se nevyloučila, jak uvedeno, přesvědčivě možnost existence kmenů, až dosud nezachytitelných ani na opici. Jen mimochodem upozorňujeme na dosud nevysvětlitelný případ kmene Mack,[19] který byl zachycen při neparalytickém,

ale suspektním lidském onemocnění ze stolice na tkáňových kulturách, jevil cytotoxický fenomen, ale u opice po intranasálním vstříknutí vyvolal pouze velmi omezené laese, hlavně v olfaktorické krajině a bez paralys. Bude-li prokázáno, že jde skutečně o virus poliomyelitický, byl by jasně antigenně distinktní od všech tří doposud oficiálně uznávaných.

Dnes lze již těžko zhodnotit nálezy mnoha různých autorů, jednak na domácích zvířatech (Frauchiger — jalovice), jednak na laboratorních hlodavcích (Kraus — králík), které byly presentovány jako přirozená nebo experimentální infekce lidskou poliomyelitidou. Některá novější a nesporně exaktní pozorování ukazují, že množství citlivých zvířat, schopných přestát alespoň inaparentní infekci, je spíše větší nežli se původně předpokládalo.

Mezi tyto poslední patří patrně pokus Gavrilova a Fostera, kterým se údajně podařilo přenést s opice adaptovaný virus poliomyelitický intracerebrálně na fretky.

Nezávisle na těchto autorech a přibližně asi ve stejné době podařilo se Patočkovi a Šiklovi[20] totéž, ale dokonce přímým přenosem míchy dvou lidí, zemřelých na bulbární formu poliomyelitidy (klinicky i histologicky ověřenou). U albinotických fretek, očkovaných lidským materiálem do mozku, vznikl asi po 10denní inkubaci syndrom chabých paralys zadních končetin, spojených se zřetelnou svalovou atrofií, který v dalším průběhu u některých zvířat skončil smrtelně, jako Landryho paralysa. V jednom z obou případů bylo dosaženo dokonce ještě druhé pasáže na témže zvířeti. Mnoho laboratorních hlodavců (myši, krysy, králíci, morčata) bylo paralelně očkováno i materiálem lidským i z uhynulých fretek, ale bezvýsledně. Pokusné fretky pocházely z ústavního chovu, takže někteří z jejich zbývajících sourozenců mohli být přešetřeni epidemiologickým experimentem, jímž prakticky byla vyloučena možnost latentní enzootické infekce, vyvolané spontánním fretčím neurotropním virusem. Histologický nález prokázal masivní změny gangliových buněk, lokalisované stejně jako u poliomyelitidy v předních míšních rozích a záležející v rozpadu jádra a degeneraci až rozpadu celé buňky. Rozdíl proti klasické poliomyelitidě byl v tom, že vůbec nebyly nalezeny zánětlivé změny ústící v typickou neuronofagii.

Jelikož v té době neměli autoři možnost zkusit přenos fretčí míchy na opici a také tehdy ještě nebylo možno ověřit si nález serologicky (1939), byla k pozorování obou skupin autorů nedůvěra.

Řada experimentátorů v nejposlednější době obnovila pokusy o zvýšení vnímavosti běžných laboratorních zvířat na lidskou poliomyelitidu. Tak mimo jiné bylo zjištěno, že intravenosní vstříknutí mrtvých těl Salmonella typhi murium myškám nápadně zkracuje inkubační dobu pro infekci typem Lansing. Je běžně známou zkušeností, že surmenáž pokusných zvířat (zejména opic) v inkubační době zrychluje a nápadně zhor-

šuje průběh paralys. Nejdokonalejším prostředkem, snižujícím přirozenou resistenci některých zvířat (zvláště hlodavců), se ukázal být cortison, jak objevil po prvé Schwartzmann.[21]

Vstřikování cortisonu po infekci vyvolá u bavlníkových krys, očkovaných dávkou na pomezí lethality, paralytickou smrt všech zvířat. Syrský křeček je zvířetem středně citlivým na typ Lansing, vstříknutý intracerebrálně. Je prakticky vůbec necitlivým na intraperitoneální a intramuskulární inokulaci. Jsou-li tato zvířata zatížena cortisonem, vyvolá typ Lansing paralysující infekci i při obou posledně uvedených inokulačních cestách. Přitom byl Schwartzmannem paralelně pozorován nesmírně zajímavý zjev, že po intraperitoneální inokulaci má infekce naprosto typický sled, neboť první množení virusu probíhá zcela nečekaně v periadrenálním tuku, kde dochází dokonce k nekrosám, poté v paravertebrálních svalech, načež virus krátkodobě zaplaví krev a teprve nakonec se objeví v ústřední nervové soustavě. Jestliže Schwartzmann infikoval cortisonované křečky i. c., docházelo vesměs k fudroyantním a smrtícím paralysám, s nezvyklým histologickým nálezem: gangliové buňky v předních míšních rozích a v některých areálech mozku propadaly rychlé nekrose bez jakýchkoliv zánětlivých změn ve svém okolí, tedy stejně jako kdysi v nevysvětlitelném nálezu Šiklově.

Li a Habel pro polio typ III, později Steigmann a Kokko[22] pro polio typ I prokázali, že až 10 dní po i. c. inokulaci těchto typů myši lze virus (aniž dochází ke klinickým projevům) dokázat ve velkém kvantu nejenom v mozku, nýbrž i v nejdistálnějších částech míchy. Autoři soudí — podle našeho názoru právem — že v těchto případech jde určitě o více nežli o persistenci původních kvant virusu; nesporně se i typ I a III, byť jen do jisté míry a inaparentně i v hlodavcích pomnožuje.

Souhrnem lze říci, že tato nejnovější řada experimentů nejenom s jakousi pravděpodobností zpětně ukazuje, že nálezy Gavrilova a Fostera, Patočky a Šikla mohly skutečně prokázat přenos lidské poliomyelitidy na jiné zvíře než na opici, nýbrž že lze i do budoucnosti čekat vydatné a důležité rozšíření našeho pokusného arsenálu pro všechny dosud známé typy poliomyelitických virusů.

Nejdůležitějším experimentálním zvířetem pro objasnění záhad pathogenesy poliomyelitidy je nesporně šimpanz. I. c. nebo i. p. inokulace poliomyelitického virusu tomuto zvířeti vyvolává symptomatologii, podobnou zcela oné, jež je známa u menších opic. Již starší pokusy však ukázaly, že šimpanz, infikován subkutánně nebo perorálně, jen velmi vzácně onemocní paralytickou poliomyelitidou, ale má prakticky vždycky (není-li imunní) inaparentní formu poliomyelitidy, která vede k dlouhodobému vyměšování virusu stolicí (Paul). Jak se dodatečně zjistilo, vedla tato inaparentní nákaza vždy také ke stoupnutí titru neutralisačních protilátek v krvi. Tato pokusná zkušenost byla záhy srovnávána se zku-

šeností získanou u člověka a zjistilo se, že jde u šimpanzů (také u cynomolgů) i u člověka o analogický proces, který četnými záměrně vedenými experimenty a ověřením téže situace u lidských případů vedl k nové koncepci pathogenesy poliomyelitického onemocnění, jak jí níže podrobněji uvádíme.

Jak známo, vycházela nejstarší koncepce pathogenesy poliomyelitické choroby z předpokladu, že lidská poliomyelitida vzniká z kapénkové infekce vdechnutím nosní sliznicí, odkud se virus dostává lymfatickými cestami na meningy a přes bulbus olfactorium do ústřední nervové soustavy. Tato domněnka vznikla chybnou generalisací exaktního experimentálního pozorování opic, infikovaných intranasálně. Novější výklad pathogenesy se opíral o předpoklad striktního neurotropismu poliomyelitického virusu, o kterém se myslilo, že snad z orofaryngeální sliznice stoupá přímo podél nervů k míše a mozku. Obojí koncepce se ukázala neúplnou a chybnou.

Dogma o striktním neurotropismu poliomyelitického virusu bylo vydatně otřeseno poznáním, že infikovaný člověk vylučuje sice virus také orofaryngem (asi nejdéle týden před začátkem a týden po začátku paralys), kromě toho však hlavně stolicí, a to rovněž od doby krátce před vypuknutím paralys až do 3 nebo i 5 neděl po kulminaci paralytických symptomů. Vylučuje se tedy i v době, kdy v ústřední nervové soustavě již nelze žádný virus přímo dokázat. Je sice možno si představit, že virus může být v ústřední nervové soustavě po skončených paralysách maskován protilátkami, nelze tím však vysvětlit, jak by mohl být v plně aktivním stavu vylučován na př. po extrémní pozorovanou dobu i jednoho stadní od skončení klinických symptomů. Již tato zkušenost ukázala, že je nutno předpokládat v lidském těle i jinou tkáň, v níž se virus množí, a to nejen mimo ústřední nervovou soustavu, ale pravděpodobně mimo nervový aparát vůbec.

Druhým závažným argumentem proti koncepci striktně neurotropního poliomyelitického virusu bylo poznání, že experimentální i přirozené bezsymptomové poliomyelitidy, vedoucí pouze k masivnímu vylučování virusu střevem, vedou k imunitě, která ovšem nemusí být (hodnoceno podle titru protilátek) vždy stejně hluboká.

Třetím, mimo tyto druhy experimentu stojícím důkazem o schopnosti adaptace poliomyelitického virusu na mimonervovou tkáň jsou v koreferátu uvedené pokusy o dokonalém množení poliomyelitického virusu na banálních fibroblastech.

Je zejména zásluhou Francisovy školy, že se začalo vážněji uvažovat o poliomyelitidě jakožto infekci vnikající do lidského těla intestinálním traktem. To bylo později experimentálně rozšířeno na dnes téměř obecně uznávaný předpoklad, že poliomyelitis je *primárně onemocněním určité části zažívacího traktu,* a to *nejspíše tenkého střeva,* při čemž paralysy

jsou patrně jenom příležitostnými komplikacemi, způsobenými virusem proniklým ze zažívací trubice k ústřední nervové soustavě.

Není zde možno uvádět četné pokusy, které vykonávali zejména Bodian[25] a spolupracovníci a škola Paulova (Horstmannová). Uvedeme souhrnně jen jeden klasický pokus na 5 šimpanzích, jimž perorálně podáno 5 ccm 25% suspense infekční míchy s tímto výsledkem:

U prvního zvířete byl 8. den po nakrmení suspensí prokázán virus v krvi (inokulací šimpanzova sera, získaného kardiální punkcí cynomolgovi i. c.); 5 dní nato následovala paralysa a téměř současně nalezena velká kvanta virusu ve stolici a prudký vzestup serových protilátek.

U druhého zvířete probíhala infekce podobně až na to, že k viremii došlo 15. den a 17. den, současně s positivní stolicí, došlo k paralyse.

U třetího a čtvrtého zvířete nedošlo k viremii ani k paralysám, stolicí byl od 8. dne vylučován virus, ale protilátky počaly stoupat až od 12. dne.

U pátého zvířete došlo k viremii 8.—11. dne, současně s ní k prudkému vzestupu protilátek a stoliční eliminaci virusu. Ani zde nedošlo k paralysám, zvíře po několika nedělích zabito a v ústřední nervové soustavě nenalezeny vůbec žádné histologické známky přestálého poliomyelitického onemocnění.

Jak již uvedeno, je eliminace virusu stolicí nikdy nechybějícím zjevem u lidské poliomyelitidy a dnes se běžně záchytu virusu ze stolice na lidských fibroblastech užívá k diagnostice poliomyelitického onemocnění u člověka. Chyběl pouze až do nedávné doby průkaz viremie. Ten se podařil již v roce 1952 dvakrát Bodianovi a později dokonce u abortivní dětské poliomyelitidy.[24] Téměř současně dokázala viremii Horstmannová[25] u 4 z 15 případů v časné fázi mírného onemocnění, při čemž žádný z případů s prokázanou viremií neskončil těžkou paralytickou chorobou. Konečně Jungenblut dokázal viremické stadium u těhotné ženy prvý den paralytické poliomyelitidy.

Souhrnem těchto pozorování, získaných experimentem na zvířeti, nebo zachycených sledováním lidské choroby, uvádí Bodian tuto představu o pathogenese poliomyelitidy:

1. Po vniknutí virusu do těla alimentární cestou dochází *k prvé fázi choroby, kterou možno označit jako alimentární.* Virus se množí v zažívacím traktu a jest jím po řadu týdnů také vylučován. Již tato fáze vede k imunitě, dokumentované nejprve nízkým a pozvolna stoupajícím titrem sérových neutralisačních protilátek. Proběhne-li onemocnění pouze v této fázi, zůstává klinicky prakticky bez symptomů a zejména ústřední nervová soustava je naprosto nedotčena (t. zv. inaparentní neb němá infekce). Slabinou definitivního důkazu existence této fáze choroby je okolnost, že dosud nikdo nebyl schopen prokázat, v které části zažívacího traktu se virus množí.

2. Z této alimentární fáze pod vlivem prozatím neznámých okolností (snad snížení resistence, vlivy vnitřní sekrece, střevní poruchy atd.) dochází *k druhé fázi poliomyelitidy, jež se označuje jako vaskulární.* Není shody o tom, zda jde při ní pouze o invasi větších kvant virusu do krve a krvetvorných orgánů jak předpokládá Sabin, nebo o skutečné množení virusu v hematopoëtických orgánech (slezina, Sabin-Ward) nebo lymfatických uzlinách (Paul). Tato fáze není u člověka rovněž doprovázena žádnými nápadnými klinickými symptomy, snad s výjimkou zvýšené teploty, a odpovídá pravděpodobně naší koncepci abortivních infekcí bez zachvácení ústřední nervové soustavy. Pro imunitu u polio je tato fáze zvlášť důležitá, neboť sama o sobě vede k nejvyššímu vzestupu seroneutralisačních protilátek.

3. Z fáze vaskulární, jen zcela příležitostně a opět za okolností nám blíže neznámých, vzniká *fáze třetí, nervová,* při níž dochází k známému zachvácení ústřední nervové soustavy. Bodian tvrdí, že současně s motorickými ganglii jsou zachvácena též sensitivní, a to centrifugální cestou po citlivých kořenech. Tato fáze klinicky odpovídá přirozené infekci buď pouze s naznačenými symptomy zachvácení ústřední nervové soustavy, anebo s typickými paralysami, jak jsou známy z kliniky poliomyelitidy. Bodian uvažuje i o tom, kudy přechází poliomyelitický virus z krve do míchy a soudí, že by se tak mohlo dít v area postrema medulae oblongatae.

To, že onemocnění ústřední nervové soustavy znamená pokročilou fázi choroby a nikoliv její začátek, je zjevno již z relativně vysokého stupně protilátek, přítomných v krvi člověka na samém počátku paralys, jak to již dávno opětovaně prokázal Hammon.[26] V souvislosti s tímto předpokladem sledu fází poliomyelitické choroby je zajímavé si ověřit, že infekce přímo do ústřední nervové soustavy vede k relativně velmi pomalému a nízkému vzestupu protilátek (při přežití paralys je pravidelně imunita ústřední nervové soustavy vysoká), kdežto přirozený sled alimentární a zejména vaskulární fáze vede téměř vždy k jejich vydatnému a rychlému vzrůstu.

Tato koncepce obvyklého sledu přirozené lidské infekce, prokazovaná z velké části experimentálním záchytem různých stadií experimenty na šimpanzech, nevylučuje samozřejmě možnost paralytických infekcí, vzniklých i jinou cestou, kdy virus obnaženými nervy postupuje bez účasti zažívacího traktu a viremie přímo k ústřední nervové soustavě, jak tomu snad je na př. u těžkých bulbárních forem poliomyelitidy po tonsilektomiích.

Viremie, předpokládaná pro paralytickou poliomyelitidu, samozřejmě není tak dlouho trvající a masivní záležitostí jako u transmisivních encefalitid, ale může nám vysvětlit mnohé, dříve nesrozumitelné závislosti, na př. na vnitřní sekreci. Dále z její koncepce můžeme čerpat i oprávně-

nou naději (jež vedla již zčásti k positivním výsledkům) na možnost zásahu jak chemoterapeutického, tak hlavně imunologického, neboť je jasné, že i poměrně malá množství protilátek v krvi mohou zabránit viremickému stadiu a tím i znemožnit cestu virusu k ústřední nervové soustavě.

Z toho, co bylo řečeno o biologických vlastnostech poliomyelitických virusů, o jejich rozdělení na 3 dosud známé antigenní typy, dále z novodobé koncepce pathogenesy poliomyelitidy a zkušeností o dlouhodobé homotypní imunitě proti přirozené infekci, vyplývají již základní imunologické zákonitosti choroby.

Přesto však zůstává imunita nejdůležitějšího orgánu, t. j. ústřední nervové soustavy, dosud zčásti nerozřešeným problémem. Ze starších prací lze vidět, že vyvolat solidní imunitu ústřední nervové soustavy, prokazatelnou přímo i. c. challengí, je poměrně obtížné tím spíše, že mnoho běžně isolovaných kmenů poliomyelitického virusu, jak na př. vyplývá ze Salkovy a Kesselovy práce (typisace kmenů poliomyelitidy), má jen zcela prostřední, či dokonce slabé antigenní vlastnosti.

Je jisto, že hlubokou imunitu ústřední nervové soustavy (samozřejmě homotypní) lze nejsnáze vyvolat přímým vniknutím živého virusu do ústřední nervové soustavy, tedy prakticky za cenu risika paralytického onemocnění. Tímto způsobem vzniklá imunisace ústřední nervové soustavy může být svou podstatou téměř nesporně nezávislá na protilátkách a faktor, který v imunní ústřední nervové soustavě neutralisuje či inaktivuje virus — přes opačné mínění Morganové[27] — asi neodpovídá vždy protilátkám, byť i lokálně koncentrovaným (Boyd). Speciální extrakční metodikou se podařilo Sabinovi z míchy opice zabité delší dobu po začátku paralys, tedy v době, kdy se normální inokulací zvířeti nedaří již virulenci míchy prokázati, vyluhovati ještě nepatrná kvanta aktivního virusu. Tím ožívá alespoň zčásti stará koncepce Olitského o dlouhodobé persistenci aktivního virusu v infikované tkáni, jakožto podkladu virusové imunity. Tento důkaz však sám o sobě neodůvodňuje tak dlouhou persistenci imunity, jaká je v těchto případech pravidlem.

Někteří z účastníků I. a II. Mezinárodního antipoliomyelitického kongresu naznačovali (aniž pro to měli konkretní důkazy, přímo u poliomyelitidy — viz již dříve Sven Gard), že poměry při poliomyelitidě mohou být analogické tomu, co se čím dále tím více poznává u jiných virusů zejména bakteriálních, z živočišných též u virusu chřipkového: možnost persistence v citlivé tkáni t. zv. provirusu, t. j. nepathogenní vývojové formy poliomyelitického virusu, jež svou přítomností v gangliových buňkách interferuje s novým kvantem virusu, vnikajícím při infekci.[28]

Starší autoři se zřetelem na tehdejší koncepci poliomyelitidy, jakožto čistě nervové choroby, se tedy pochopitelně snažili dosíci vysoké imunity ústřední nervové soustavy, kterou hodnotili velmi tvrdou zkouškou,

t. j. i. c. challengí desítkami až stovkami smrtných dávek. Přitom si kladli otázku, zda je možné dosáhnout takového stupně imunity i perifernim očkováním.

V řadě prací, z nichž namátkou uvádíme práce Ayccock-Kaganovy, Brodieho, Melzerovy, nebo Loringovy, Schwerdtovy či Morganové, se vesměs ukázalo, že je možno dosáhnout takového stupně imunity, a to nejlépe aktivním živým virusem v malých dávkách, dále virusem inaktivním, ale purifikovaným a koncentrovaným, nebo konečně i virusem inaktivním v míšní suspensi, ale většinou po neúnosně velkém počtu injekcí (Morganová). Schwerdt, Dick a spol. dokonce přesnou titrací zjistili, že pro dosažení tak vysokého stupně imunity ústřední nervové soustavy je živá vakcina 150 až 5000krát účinnější než velmi pečlivě připravená vakcina inaktivovaná.

Souhrnem těchto prací starší doby bylo dosti skeptické zjištění, že příprava dokonalé vakciny proti poliomyelitidě všech známých typů by narážela na těžko překonatelné obtíže, tím spíše, že jediným možným výrobním substrátem v té době byly alespoň pro typ I a III pouze opičí míchy.

Pravděpodobnost domněnky o odlišně chápané pathogenese poliomyelitického onemocnění (zvl. existence viremie) přivedla v pochybnost názor, že je nutno k dosažení postačující ochrany člověka před přirozenou paralytickou chorobou vyvolat imunitu takového stupně, při níž i ústřední nervová soustava sama je imunní. Mnoho prací, které se objevily téměř současně (Bodian,[29] Howe, Melnick a Horstmannová), ukázalo, že poměrně malé dávky lidského gamaglobulinu, obsahujícího protilátky proti všem typům poliomyelitidy, ochránily šimpanzy proti paralysám, byly-li podány profylakticky. Nejmenší protekčně účinnou dávkou gamaglobulinu se ukázalo býti 0,1 ml na 1 kg tělesné váhy. Howe našel, že opice jsou bezpečně chráněny proti i. m. infekci živým virusem takovým množstvím gamaglobulinu, které zvýší pasivně hladinu protilátek v jejich seru tak, že chrání i koncentrované jen proti 32 PD_{50} virusu.

V jiných pokusech bylo zjištěno, že velmi nízké až střední titry pasivně zjištěných protilátek v seru zabraňují s jistotou paralytickým komplikacím po perorální infekci. K prolongované eliminaci virusu střevem však dojde, byť i opožděně, i při poměrně vysokých hladinách protilátek, t. j. i v koncentraci 1:100.[30] Z toho lze vidět, že ani poměrně vysoký titr protilátek není schopen zabránit intestinální infekci, pouze ji oddálí. Jedním z nejdůležitějších nálezů při těchto pokusech je zjištění, že tato opožděná intestinální fáze vede ještě dále k aktivní imunisaci, dokumentované značně opožděným, ale vysokým vzestupem vlastních tělových protilátek. Může tedy pasivní imunisace zabrániti paralytické poliomyelitidě dojde-li po ní k infekci, ale nezabrzdí dodatečnou spontánní aktivní imunisaci organismu, jež je patrně výslednicí intestinální formy onemocnění.

Předesíláme hned, že této zkušenosti bylo použito i při aktivní imunisaci živým virusem, při čemž gamaglobulin, podaný v stejnou dobu jako vakcina, ale na jiné místo těla, ochránil zvíře před eventuálními komplikacemi, ale nezabránil jeho vydatné aktivní imunisaci, pouze zdržel okamžik jejího vyvrcholení.

Vyličené experimentální výsledky byly předvídány Hammonem jako výsledek vlastní práce, která záležela v systematickém sledování hladiny neutralisačních protilátek již v okamžiku lidských paralys (nalezeny i do titru 1:5) a jejich rychlým vzestupem v dalším průběhu onemocnění, zejména byl-li k jejich titraci použit homologní kmen virusu. Týž autor také navrhl používání lidského gamaglobulinu k rychlé profylaxi v průběhu poliomyelitických epidemií.[31] Když bylo dodatečně ověřeno, že gamaglobulin získaný ze smíchaných ser lidí v oblastech, kde je poliomyelitida velmi rozšířena, obsahuje pravidelně protilátky proti všem typům poliomyelitických virusů, bylo tohoto návrhu v lidské praxi opětovaně s úspěchem využito. Jest ovšem nutno počítat s tím, že v případě poliomyelitidy jde opravdu o dosažení skutečně pasivní imunity, t. j. že gamaglobulin musí chovat protilátky proti všem 3 typům virusu a má být vstřikován v dostatečně velikých dávkách, počínajících od 0,2 až do 0,8 na 1 kg tělesné váhy očkovaného dítěte. Nevýhodou této pasivní imunisace je její krátké trvání (pouze několik málo neděl), neúnosně vysoká cena a relativní nedostatek lidského gamaglobulinu. Neocenitelnou výhodou je okolnost, že člověk pasivně imunisovaný a v průběhu epidemie infikovaný je schopen bez risika se dostatečně aktivně imunisovat přirozenou infekcí.

Vyličené nevýhody pasivní imunisace a okolnost, že kultivace virusu ve tkáni, zejména při použití synthetického media, dokáže produkovat veliká kvanta virusu jen s nepatrným obsahem bílkovin, vedla v nejposlednější etapě k nové úvaze o možnostech aktivní imunisace za předpokladů dříve netušených. Cílem této imunisace již pochopitelně není dosažení vysokého stupně imunity ústřední nervové soustavy, což prozatím zůstává nesplnitelným — a ukáže-li se domněnka o 3 fázích přirozené choroby správnou — snad také zbytečným ideálem. Zdá se, že stačí zvýšit hladinu protilátek na takovou míru, aby stačila vázat virus při jeho pronikání do krve a tím zamezila nervovým komplikacím. Dosažení tohoto požadavku je podle dosavadních náznaků splnitelné, ač prozatím nikdo nemůže říci, jaká je minimální hladina protilátek, nutných k tomuto stupni imunity a jak trvalá je tato dosažená ochrana.

Z důvodů, které jsou nasnadě, je vyloučeno v rámci tohoto pojednání probrat, byť i jen přibližně, většinu pokusných studií o aktivní imunisaci. Boyd,[32] na jehož práci zde odkazujeme (1953), sebral k tomuto cíli více nežli 200 prací. Několik modelových publikací jsme uvedli již dříve. Zde můžeme shrnout, že k účelům pokusného očkování, prováděného největším dílem na opicích, zčásti na citlivých hlodavcích a konečně i na člově-

ku, bylo použito jednak vakcin živých v nejrůznější síle, jež byly vstřikovány intrakutánně (Aycock a Kagan, Rhodes, Stimpert a Kessel), podkožně (Thomsen, Zapper, Morganová, Howe a Bodian), zejména však intramuskulárně a konečně perorálně. Po orientačních pokusech Wardových a Freundových[33] byli první Salk a spol.,[34] kteří využili známé Freundovy metodiky s lipoidními adjuvanciemi k potencování imunisačních vlastností malých dávek živého virusu. Výsledky, i při všem risiku paralytické infekce, byly v posledním případě velmi povzbuzující. Velmi slušného stupně imunity bylo dosaženo intranasálním a intraperitoneálním vstřikováním živého virusu. Ku podivu jsou výsledky, dosažené intracerebrální infekcí živým virusem v tak malých kvantech, že nevyvolají vůbec klinických symptomů, nevalné.

Na rozdíl od živého virusu byly prvé výsledky, dosažené virusem inaktivovaným, naprosto neuspokojující. Zcela se neosvědčil virus inaktivovaný teplem a sušením, o málo lepší jsou výsledky virusem fenolisovaným, poměrně nejlepší byla vakcina, kde bylo dosaženo inaktivace mírným ultrafialovým zářením. Zajímavých a dlouho komentovaných výsledků se dosáhlo vakcinou adsorbovanou na aluminiumhydroxyd a známou očkovací látkou Kolmerovou s ricinolejanem sodným, jíž bylo použito v mnoha případech i u dětí. Oba poslední principy se ukázaly být málo bezpečnými, neboť právě v nejhodnotnějších vakcinách se zjistilo přežívání aktivního virusu.

Podle všeho byl Römer první, jenž zkusil inaktivaci virusu formaldehydem, který byl ze všech metod k výrobě vakciny daleko nejlepší, takže tuto metodu napodobili četní jiní autoři. Vzhledem k tomu, že prolongované působení formaldehydu ničí ještě dále antigenicitu poliomyelitického virusu, neutralisuje se jeho účinek dodatečně buď diamoniumfosfátem nebo natriumbisulfitem. Byly-li takto pečlivě připravené vakciny vstříknuty pokusným zvířatům i. m., došlo k uspokojivému stoupnutí serových protilátek, zejména proti typu Leon (nejméně proti typu Brunhilda, který se zdá být nejhorším antigenem).

Abychom ukončili tuto obsáhlou kapitolu, kde pokusy starších autorů dávají výsledky vesměs velmi kolísavé a dnes těžko hodnotitelné, uvedeme zcela stručně 3 serie pokusů z poslední doby, v nichž vakcina, ověřená pokusem na zvířeti, byla zhodnocena moderními titračními metodami také na člověku.

První z nich byli Koprowski a spol., kteří se odhodlali k odvážnému experimentu a zkusili za účelem vakcinace napodobit pokusy s perorální infekcí u šimpanzů. Použito živého kmene TN (typ Lansing) s minimální virulencí pro opici, jenž byl podán v míšní suspensi dobrovolníkům per os. U všech vznikla intestinální fáze choroby dokumentovaná vyměšováním virusu, u všech došlo ke zřetelnému zvýšení homologních protilátek, ale u žádného z nich ke zřetelným známkám choroby. Při reinfekci většina

z očkovaných nereagovala již ani nosičstvím, ani dalším stoupnutím hladiny protilátek, z čehož je patrno, že očkovaní byli imunní proti základní formě choroby.

Kladný výsledek této zkoušky byl o něco později potvrzen Sabinem a Winsserem,[35] kteří infikovali větší množství opic mnoha opětovanými minimálními kvanty živého virusu per os. Přibližně za 5 měsíců bylo více nežli 60% zvířat zřetelně imunních. Zdá se, že tento pokus — podobně jako předchozí na lidských dobrovolnících — modelově ukazuje mechanismus imunity populace, promořované malými kvanty virusu.

Téměř současně vyrobil Howe trivalentní formolisovanou vakcinu s lipoidními adjuvanciemi, jejíž účinek vyzkoušel na opicích. Dodatečně vstříkl podobný přípravek, ale bez adjuvancií, zato však se současným podáním gamaglobulinu do jiného místa šesti dětem. Pokud došlo ke zvýšení protilátek, držel se jejich titr i po 6 měsících.

Nejobsáhlejší a nejlépe připravený pokus podobného druhu provedli 1953 Salk a spol.[36] Jako zdroje antigenu použil Salk po prvé virusu všech 3 typů pomnoženého ve tkáňových kulturách z lidské ledviny. Virus byl inaktivován formaldehydem, jenž neutralisován natriumbisulfitem. Větší skupině lidí vstříknuta tato vakcina intradermálně, menší skupině intramuskulárně s lipoidními adjuvanciemi. Nepozorovány nepříznivé reakce a bezpečnost vakciny vyzkoušena i tím, že zvláště prokázána její neschopnost vyvolat tvorbu protilátek proti lidské ledvinové tkáni. V pokuse především ukázána jasná antigenní superiorita vakciny s lipoidními adjuvanciemi. Dosaženo přibližně takového titru protilátek, jakého bývá dosaženo přirozeným onemocněním, a jejich hladina při uzavření pokusů v neztenčené míře persistovala po dobu téměř 5 měsíců.

Ze všech novodobých pokusů o aktivní imunisaci se zdá být patrno, že jest možno dosáhnouti aktivní imunisací takové hladiny protilátek, jež zhruba odpovídá minimu, nutnému pro ochranu před paralytickou poliomyelitis (pokud ovšem tato hladina byla zjištěna pokusy s použitím imunního gamaglobulinu). Toto prozatímní zjištění znamená nesporně veliký pokrok v boji proti poliomyelitidě. Všichni autoři se však shodují, že se nelze prozatím s jistotou vyslovit o tom, zda splnění těchto pokusně ověřených předpokladů skutečně v terénní praxi vždy stačí zabránit paralytické poliomyelitidě, zda je vakcinace při masovém použití metodou zaručeně neškodnou a konečně jak dlouho vydrží efekt tohoto aktivně imunisačního postupu.

Není dosud shody v tom, do jaké míry se imunita přenáší s matky na potomstvo. U hlodavců pokusně potvrzen přenos imunity mlékem.[37] Někteří tvrdí, že i v lidském mléce zjištěny protilátky, a co je snad důležitější, také faktor prozatím nejasné podstaty, ale odlišný od protilátek, jenž působí ničivě na malá kvanta virusu poliomyelitidy.

Nelze skončiti tuto stať o vlastnostech virusu poliomyelitidy, aniž se

zmíníme o stále intensivněji se rozvíjející snaze po chemoterapeutickém zásahu při poliomyelitidě.

Virus poliomyelitidy se samozřejmě po této stránce nezpracovává isolovaně, nýbrž v rámci těžké, ale nesmírně zajímavé kapitoly o chemoterapii virusových infekcí vůbec. Přiznáváme hned z počátku, že dosud nebylo dosaženo výsledků, použitelných pro lidskou praxi, ačkoliv účinek některých látek mohl být pozorován nejenom na virusu množeném v tkáňových kulturách, nýbrž i v experimentu na nakaženém zvířeti.

Při kultivaci kmenu MEF_1 na lidském embryonálním mozku se ukázalo (Brown),[38] že řada aminokyselin, z nich zejména l-methionin, je bezpodmínečně nutná k synthese virusového nukleoproteinu. Jestliže byl k tkáňovým kulturám přidán d-1-ethionin, jenž je jeho biologicky neúčinným analogem, nastává blokování nutného methioninu a k pomnožení poliomyelitického virusu ve tkáni nedochází. Je zajímavé, že v pokuse na myši působí právě přebytek methioninu (hlavně za současného snížení tryptofanu) na zvýšení resistence proti poliomyelitidě typu Lansing. Podobně jako d-1-ethionin působí na př. alfa-amino-beta-fenylethansulfonová kyselina, jež jest nemetabolisovatelným analogem fenylalaninu.

Z látek, nutných pro synthesu nukleinových kyselin, působil jako inhibitor zejména benzimidazol, proflavin a malononitril (Szento - Felsenfeld).

Zkoušeny také látky, působící rušivě na průběh Krebsova cyklu v buňce. Jednou z nejúčinnějších se ukázal natriumfluoroacetát (Ainslie),[39] jenž brzdí oxydaci citronové kyseliny. Byl-li tento vstříknut v netoxických dávkách myši i. p. před infekcí typem Lansing, nedošlo buď vůbec k projevům choroby nebo alespoň k velkému prodloužení inkubační doby. Benzimidazol a malononitril se ukázaly[40 41] dodatečně do jisté míry účinnými při minimálních infekčních dávkách i v experimentu na zvířeti. Z antibiotik brzdilo množení virusu jediné (jen do jisté míry), a to u nás neznámé, Phagopedin-sigma.

Do jaké míry lze k těmto počátečním snahám o experimentální chemoterapii přiřadit známé zjevy interference mezi jednotlivými typy poliomyelitických virusů[42] (nevirulentní by mohl v praxi blokovat pomnožení virulentního), lymfocytární choriomeningitidy a poliomyelitidy, nebo B skupiny virusu Coxsackie (jejichž přítomnost u pokusného zvířete velmi prodlužuje inkubační dobu u poliomyelitidy), jest prozatím velmi těžko říci.

V rámci vylíčení exaktního stavu vědy o poliomyelitickém virusu nelze zacházeti do hypotéz, přesto si však nemůžeme odpustit tuto konečnou úvahu: Je nutno pokládat za jisté, že virus poliomyelitidy patří mezi virusy velmi rozšířené po celém světě. Stejně rozšířená je asi i inaparentní forma této choroby, jak nesporně ukáží příští léta, věnovaná záchytným experimentům na tkáňových kulturách u nás i jinde. Věříme-li

tomu, že primární množení virusu nastává v mimonervové tkáni, zdá se nám jedním z nejdůležitějších úkolů pokus o rozřešení problému, co (mimo vlastní virulenci virusu) působí na jeho přechod s místa základního množení do ústřední nervové soustavy, čímž je teprve vyvolán obávaný syndrom nervové poliomyelitidy. Je jisté, že je to vliv ústřední nervové soustavy jako nejvyššího regulátoru celého makroorganismu, ale ten zůstává v podrobnostech působení dosud záhadným. Experimentem byl prověřen vliv fysické surmenáže. Mnoho se mluví o nepříznivém vlivu operativních zákroků a v inkubační době prováděných vakcinací, zejména proti pertussi.[43] Jistý je i vliv vnitřní sekrece, jak patrno u gravidity[44] a zvláště z pokusů s cortisonem. Nesporně i způsob a stav výživy a některých buněčných metabolitů hraje důležitou roli. To jsou však pouze náznaky celé této problematiky: podaří-li se ji v celé šíři prověřit a zvládnout ve prospěch člověka, byl by, podle našeho soudu, problém poliomyelitidy — nikoliv snad jako infekční choroby, ale jako jednoho z nejobávanějších lidských pathologických syndromů — do nejvyšší míry rozřešen.

LITERATURA

1. Ždanov: Opredelitel' virusov čeloveka i životnych — Moskva 1953, 303.
2. Jungenblut: VI. Intern. Congr. f. Microb., Rome — Vol. II, 441.
3. Koprowski: Virus and rick. classif. and nomenclature N. Y. Acad. of Science 1953, str. 601.
4. Čumakov-Prisman-Zacelin: Poliomielit — detskij spinomozgovoj paralič — Medgiz 1953, str. 470.
5. Sabin: Virus and rick. classif. N. Y. Acad. of Science 1953, str. 580.
6. Bodian: Am. J. Hyg. 54, 174, 1951.
7. Paul-Melnick atd.: Am. J. Hyg. 55, 402, 1952.
8. Paul-Riordan-Melnick: Am. J. Hyg. 54, 275, 1951.
9. Loring-Marton-Schwerdt: Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 62, 291, 1946.
10. Polson-Selzer: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 81, 218, 1952.
11. Reagan-Schenk: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 77, 42, 1951.
12. Patočka-Kubelka-Žáček: Biol. listy 31, 45, 1950.
13. Warren a spol.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74, 662, 1949.
14. Lo Grippo-Earle-Ward: Am. J. Hyg. 55, 70, 1952.
15. Dunham-Ewing: J. Bact. 65, 224, 1953.
16. Lahelle: Am. J. Hyg. 54, 391, 1951.
17. Ward-Rader-Lipton-Freund: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74, 536, 1950.
18. Am. J. Hyg. 54, 191, 1951.
19. Steigmann-Kokko: Fed. Proc. 1953, V 12, P I, čl. 1518.
20. Patočka-Šikl: ČLČ 80, 1594, 1941.
21. Schwartzmann-Aronson: Fed. Proc. 1953, V 12, P I, čl. 1508.
22. Steigmann-Kokko: Proc. Soc. Biol. Med. 81, 261, 1952.
23. Bodian: Am. J. Hyg. 55, 414, 1952.
24. Bodian: Fed. Proc. 1953, V 12, P I, čl. 1437.
25. Horstmann: VI. Int. Congr. f. Microb., Rome, Vol. II, čl. 438.

26. Hammon: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 69, 256, 1948.
27. Morgan: I. Int. Polio Conf. N. Y. 1949, 263.
28. Patočka: ČLČ, 88, 1263, 1949.
29. Bodian: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 72, 259, 1949.
30. Bodian: Fed. Proc. 1952, VII, P I, 462.
31. Hammon: Pediatres 6, 696, 1950.
32. Boyd: Bact. Rew. 17, 339, 1953.
33. Ward-Rader-Lipton-Freund: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74, 536, 1950.
34. Salk a spol.: Am. J. Hyg., 54, 255, 1951.
35. Sabin-Winsser: Fed. Proc. 1953, V 12, P I, čl. 1502.
36. Salk a spol.: J. A. M. A. 151, 1081, 1953.
37. Thompson-Meyers: Am. J. Hyg. 52, 213, 1950.
38. Brown: Journ. Immun. 69, 441, 1952.
39. Ainslie: J. of Exp. Med. 95, 9, 1952.
40. Szanto-Felsenfeld: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 72, 15, 1949.
41. Brown a spol.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83, 408, 1953.
42. Ledinko: Fed. Proc. 1953, Vol. 12, P I, čl. 1483.
43. Nat. Found. f. Inf. Par.: J. A. M. A. 149, 170, 1952.
44. Anderson a spol.: Am. J. Hyg. 55, 1, 1952.