

Ústav lékařské mikrobiologie KU, Praha, přednosta prof. Dr. Fr. Patočka

KULTIVACE VIRUSU ENCEPHALOMYELITIS ENZOOTICA SUUM V HOMOLOGNÍ TKÁNI I.

FR. PATOČKA, VL. KUBELKA, B. KORYCH

Úkolem, který jsme si vytyčili po prostudování biologických znaků virusu obrny vepřů, jeho schopností imunogenních a částečně pathogenese choroby jím vyvolané, bylo prověřit schopnost tohoto virusu množit se v homologní vepřové tkáni. Tato řada experimentů, dosud pro technické obtíže neukončená, měla za cíl doplnit nám dosud známé vlastnosti virusu i po této stránce a kromě toho vést v případě úspěchu k propracování metodiky produkce virusu ve velkých kvantech, aby ho mohlo být použito jako základu očkovací látky obsahující inaktivovaný virus, tedy analogické s tou, jež se dnes vyrábí na celém světě jako úspěšná součást boje proti poliomyelitidě. Vedlejším a dlouhodobým smyslem experimentů tohoto druhu má být studium variability námi standardně používaného kmene virusu Těšínské choroby ve smyslu snížení jeho pathogenních schopností protrahovanou ev. modifikovanou kultivací tak, aby, je-li možno, byl získán kmen, jehož by bez nebezpečí mohlo být použito jako živé vakciny v dalším vývoji této práce. Pokud nám bylo přístupno světové písemnictví, neměli jsme mnoho předchůdců. Horstmannová (1) ve své souborné práci z r. 1952 naznačila, že měla pocit, jako by se virus vepřové obrny množil v explantátech Maitlandova typu kuřecích embryí. Tento fakt považujeme za nepravděpodobný. Larski (2) dosáhl velmi pravděpodobného pomnožení téhož virusu v explantátech kultivovaných podle Maitlanda z ledvin vepřových embryí. Na efektivní množení virusu v druhé pasáži usuzuje hlavně ze zkrácení inkubační doby pokusného onemocnění vyvolaného mediem z této tkáňové kultury. Práci Mayra a Schwöbela (3) známe pouze z citace Fortnerovy, neboť nám v originále nebyla přístupná. Podle Fortnera (4), který neudává jejich pracovní metodiku ani přesné výsledky, dopracovali se kladného výsledku.

Sami jsme pracovali s kultivací vepřové tkáně od r. 1954 a to nejprve s embryonálními fibroblasty, později pro nepravidelný přísun této tkáně jsme se pokusili o pěstování fibroblastů z testes čerstvě kastrovaných vepřů.

Částičky tkáně uloženy do kuřecí plasmy, jako živného media užíváno tehdy 50% Hanksova roztoku, 10% dvacetiprocentního kuřecího embryonálního extraktu a 40% koňského sera. Příležitostně bylo užito místo tohoto roztoku hovězí amniové vody a extraktu z hovězích embryí. Množení fibroblastů v těchto typech media bylo velmi dobré. Infekce kultury v první pasáži provedena 0,1 ml 10^{-1} suspence míchy obsahující virus. V jednom případě 2 pasáž v tkáňových kulturách tohoto typu obsahovala virus v takovém množství, že stačil k vyvolání smrtelné encefalomyelitidy po i. c. aplikaci.

O těchto orientačních pokusech referováno dvěma z autorů v listopadu 1955 na virologickém semináři v Budapešti.

Plynulejší a systematická práce s tkáňovými kulturami s novou a přesně vypracovanou metodikou obnovena v polovici r. 1955.

M a t e r i á l — m e t o d y : K infekci kultur bylo užito standardního virusu kmene vepřové obrny, se kterým pracováno v laboratoři od roku 1949 a který od této doby prodělal řadu desítek i. c. pasáží. Biologické a imunogenní vlastnosti tohoto virusu popsány v práci 5, 6 a 7. PD_{50} tohoto virusu při i. c. inokulaci v roce 1951 byla stanovena na $10^{-3,1}$. Dalšími pasážemi od té doby se o něco zvýšila, ale nikdy nedosáhla hodnoty $PD_{50} 10^{-4}$. Cervikální a lumbální části mích, obsahující podle

citovaných pokusů největší kvanta virusu byly konservovány až do použití zpravidla na suchém ledu, někdy též v lednici při -15°C . Četnými i. c. pasážemi nabyt tento ústavní kmen virusu velmi výrazných neurotropních vlastností, výrazné a těžké symptomy onemocnění po vstříknutí 0,5 ml míšní suspence 10^{-2} nastupovaly zpravidla mezi 8. až 14. dnem po inokulaci, při čemž váha selat v rozmezí od 25 do 50 kg nehrála prakticky žádnou roli.

Tkáňové kultury: Ke kultivaci v prvním orientačním pokusu užito dospělé tkáně ledvinné (1955) a v roce 1956, počínaje měsícem červnem, vesměs vepřové tkáně embryonální, zejména kůže, plíce a celé ledviny. Tkáňové kultury byly kultivovány metodou popsanou Wellerem a spol. (8) ve formě fragmentů. Tkáň byla před nasazením (obzvláště u tkáně dospělých zvířat) mnohonásobně promyta, aby byly odstraněny ev. přítomné protilátky. Dobře rozrostlá tkáň byla po propláchnutí Hanksovým roztokem infikována množstvím 0,1 ml 2×10^{-1} suspensí míchy obsahující virus, 10 min. ponechána v horizontální poloze a medium doplněno do objemu 1 ml. Jako media bylo užito práškového laktalbuminhydrolyzátu (Nutritional Biochem. Corp., Ohio) 0,5% v Hanksově roztoku s 5% koňského sera, antibiotiky v množství po 50 jednotkách penicilinu a 50 γ streptomycinu na 1 ml media. pH bylo upraveno natriumbikarbonátem na 7,5. Medium z infikovaných zkumavek bylo vybíráno a smícháno po 4denní inkubaci při $36,5^{\circ}\text{C}$ ve stationární poloze. Před přenesením na další kultury uchovávalo v lednici při -20°C . Medium po vynětí bylo zkoumáno na bakteriologickou sterilitu,

V ý s l e d k y p o k u s ů z r o k u 1 9 5 5 : Rozrostlé tkáně kortexu ledviny dospělého vepře infikovány 0,1 ml suspensí 10^{-1} shora uvedených infekčních mích. Po 4denní inkubaci vyňato medium a vstříknuto i. c. v kvantu 1 ml vepři č. 939. Typické symptomy těšínské choroby se vyvinuly po 9denní inkubační době, zvíře v paralysách zabito. Histologicky potvrzena diagnosa encephalomyelitis enzootica suum. Tento orientační pokus ukázal persistenci masivních dávek virusu ředěného 10^{-2} při teplotě 37°C trvajících po výše uvedenou dobu. Jelikož podle dřívějších zkušeností je zachování aktivity virusu po tuto dobu při této teplotě nepravděpodobné, považovali jsme již tento pokus za určité potvrzení, že virus se pomnožuje na homologní tkáni. Tím spíše, že inkubační doba infikovaného zvířete mediem z kultury byla stejná jako při užití vysoce virulentních mích.

V ý s l e d k y p o k u s ů z r o k u 1 9 5 6 : Kultury embryonálních tkání získaných shora popsaným způsobem infikovány míšní suspensí 2×10^{-1} z vepře č. 939 v množství 0,1 ml na jednu kulturu. Podotýkáme, že dodatečným experimentem z 30. IX. 1956 ukázala se tato mícha tak infekční, že 1 ml 10^{-1} suspence i. c. injikované seleti vyvolal rychle postupující smrtelnou paralysu po inkubační době 8 dnů s typickým histologickým nálezem. Medium vyňaté z kultury po 4 dnech inkubace uloženo až do další pasáže při -20°C .

Mediemi z první pasáže infikována pasáž druhá a podobně z tohoto media pasáž třetí.

Experimentální ověření výsledků kultivace virusu na tkáňových kulturách pokusem na zvířeti: 30. XI. 1956 vstříknut 1 ml media z třetí pasáže na tkáňových kulturách i. c. seleti č. 209. Po 8denní inkubaci nástup prvních symptomů vepřové obrny, které vyústily v rychlou paralysu, takže zvíře druhého dne zabito. Při pitvě orgány nalezeny beze změn, mozek i mícha sterilní, histologický nález z míchy potvrdil diagnosu typické vepřové encefalomyelitidy Kloboukovy.

Pokus opakován 12. XII. 1956 s jinou ampulkou též šarže 3. pasáže jako v prvním případě. Infikováno sele č. 787. Současně sele č. 788 dostalo i. c. 1 ml téhož media ředěného 10^{-1} . Sele č. 787 onemocnělo již 7. den typickou symptomatologií Kloboukovy nemoci, druhý den zabito, pitváno a mícha poslána k histologickému vyšetření.

Sele č. 788 onemocnělo za stejných symptomů až 10. dne a zpracováno jako předchozí. Histologický nález v obou případech potvrdil diagnosu encephalomyelitis enzootica suum. Histologická vyšetření byla provedena laskavostí Doc. Dr. B. Bednáře.

Není třeba zvláště uváděti, že veškeré zkoušky bakteriologické sterility centrálního nervového systému zůstaly negativní.

D i s k u s e

Experimenty na zvířatech z konce roku 1956 potvrdily naprosto jasně skutečnost, prokázanou námi předběžně již dříve, že virus vepřové obrny se velmi efektivně (podobně jako u lidské polio) množí na explantátech z homologní tkáně. Ani první experiment, při němž k infekci použito přímo media ze 3. pasáže na tkáňových kulturách, nemůže být vykládán pouhým přetrváváním infekčního kvanta virusu v uvedeném mediu, neboť konečné ředění virusu v poslední tkáňové pasáži počítáno od výchozího inokula, bylo 1:5 000. Toto ředění přesahuje totiž infekční titr našeho virusového kmene, jak ho známe z dřívějších titračních pokusů, k čemuž ještě musíme připočítat škodlivý vliv teploty 37° C působící celkem po dobu 12 dnů na progresivně ředěný virus. Uvážíme-li pak, že i desateronásobné ředění poslední tkáňové kultury vyvolalo prudké a smrtící onemocnění v rozmezí našich běžných experimentálních dob (zde by šlo již o diluci původní míchy 1:50 000), nemůže být o faktu množení nejmenších pochyb.

Naše zjištění, které mimo jiné potvrzuje také dřívější námi citované práce, má pochopitelně kromě své základní hodnoty také eminentní praktický význam, jak v úvodu naznačeno. Metodika, které jsme použili, se prakticky neliší od běžně používané metodiky pomnožování poliomyelitických virusů na vnímavých tkáních a stejně tak snadno může býti propracována pro produkci velkých kvant vysoce účinného a při tom velmi čistého virusu těšínské nemoci. Prvé pokusy o kultivaci virusu v Roux láhvích na thypsinované tkáni jsme již metodicky úspěšně realizovali.

Vzhledem k tomu, že jako základní tkáň pro kultivaci ve velkém se může použít vepřové tkáň embryonální, která je při porážce vlastně odpadem, bylo by možno vyrábět, stejně jako u lidské poliomyelitidy, z tkáňových kultur očkovací látku jak inaktivovanou, tak po případě po modifikaci živou, nesmírně lacinou a přitom optimální kvality.

S O U H R N

Autoři prokázali schopnost virusu encephalomyelitis enzootica suum množit se na explantátech z homologní tkáně buď embryonální nebo dospělé, pěstované podle základní metodiky udané Wellerem a spol. Koncentrované medium z 3. pasáže tkáňových kultur usmrcovalo sele za typické symptomatologie po inkubační době 7 dnů, totéž ředěno 10X po inkubační době 10 dnů. Autoři navrhuji přezkoušení takto získaného virusu jako základu k velmi čisté a levné očkovací látce proti obrně vepřů a v případě, že by se osvědčila, její výrobu z tkáňových kultur ve velkém.

В ы в о д ы

Культивация вируса инфекционного энцефаломиелита свиней (болезни Тешена) в гомологической ткани I.

Авторы доказали способность вируса инфекционного энцефаломиелита свиней (болезни Тешена), культивированного по основному методу Веллера, Эндрса, Роббинса, размножаться в эксплантатах гомологических эмбриональных или взрослых тканей. Концентрированная питательная среда, взятая от третьего пассажа на тканевых культурах оказалась летальной для поросят, которые умерли на седьмой день инкубации при наличии типичных признаков данного заболевания. Та же среда, разведенная в десять раз привела к такому же исходу на десятой день инкубации. Авторы предлагают испробовать вирус, полученный таким путем, как основу дешевой и очень чистой вакцины против болезни Тешена, а в случае успешности апробации выработку ее в большом масштабе.

S U M M A R Y

Cultivation of the Encephalomyelitis enzootica suum Virus in Homologous Tissue I.

The authors have demonstrated the ability of the encephalomyelitis enzootica suum virus to propagate in explants of homologous tissue, either embryonic or adult, cultivated according to the basic technic devised by Weller, Enders, and Robbins. Concentrated tissue culture medium taken from the third passage killed farrows which evinced typical symptoms after a seven days incubation period. When a ten-fold dilution of the same medium was applied, the incubation lasted ten days. The authors suggest to test the virus thus cultivated for use as a basis for an inexpensive and pure vaccine against hog paralysis, and if it proves mass its good production.

L I T E R A T U R A

1. Horstmann, D. M.: J. Immunol. 69, 379, 1952. — 2. Larski, Z.: Med. Vet. (Polsko) 11, 589, 1955. — 3. Mayr, A., Schwöbel, W.: Mh. Tierheilkunde 8, 49, 1956. — 4. Fortner, J.: Arch. exp. Veterinärmed. 10, 7, 713, 1956. — 5. Patočka, Kubelka, Slavík: Věstník československé akademie zemědělské 1951, XXV, 461. — 6. Patočka, Kubelka, Boháč: Českoslov. hyg. epidemiol. mikrobiol. 2, 22, 1953. — 7. Kubelka, Vl. Patočka, F.: Arch. exp. Veterinärmed. 8, 666, 1954. — 8. Wellen, T. H., Enders, J. F., Robbins, F. C.: J. Immunol. 69, 6, 1952.