Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Page Denied

Next 3 Page(s) In Document Denied

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

SBORNÍK ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
VETERINÁRNÍ MEDICINA ROČNÍK XXVIII-1955-ČÍSLO 8

Biochemické studie viru slintavky a kulhavky

(Sledování hladiny fibrinogenu po infekci virem slintavky a kulhavky)

Биохимическое изучение вируса ящура I.
Наблюдение за количеством фибриногена после инфекции вирусом ящура

Biochemische Studien des Maul- und Klauenseuche Virus I

Dr G. PETR
Bioveta n. p., Terezín

Došlo dne 15. III. 1955

Po infekci a během následující immunisace dochází k nápadným změnám v chování hladin různých složek krevní plasmy. Tak bylo zjištěno, že po infekci (3, 4) a vakcinaci (6) virem slintavky a kulhavky nastávají nápadné změny v hladinách mukoproteinů, albuminů, gamma-globulinů i celkových serových bílkovin. Tyto změny byly pozorovány ve větším či menším měřítku také při jiných infekčních onemocněních. Hlavně se tu setkáváme se sledováním změn gamma-globulinů (1, 5), které jako nositelé protilátek s přibývající immunitou zvyšují i svou hladinu.

Dosud jsme se však nesetkali s případem, kdy by byla také soustavně sledována hladina fibrinogenu, ačkoliv je známo, že při akutní infekci je hladina fibrinogenu vyšší. Při zpracovávání krve zvířat v různých dobách po infekci virem slintavky a kulhavky nám byla nápadná srážlivost krve, která byla v první fázi immunisačního procesu mnohem větší než v době pozdější. To nás vedlo k domněnce, že se bude pravděpodobně během immunisace měnit i hladina fibrinogenu. V této práci jsme se tedy zabývali sledováním fibrinogenu v hovězí plasmě po infekci virem slintavky a kulhavky.

Materiál a metodika

K pokusům bylo použito nevakcinovaných, zdravých 12 kusů hovězího dobytka, ve stáří více než 2 roky, váhy 400—500 *kg*. Infekce byla provedena natřením jazyka hadříkem, namočeným do suspense viru. Používáno bylo zásadně Vallée ‚0' typu viru slintavky a kulhavky titru řádu 10^{-7}.

Klinický průběh onemocnění byl vesměs velmi těžký s příznačnou vysokou horečkou, počínající již v nejrannějším stadiu infekce.

Odběry byly prováděny téměř každodenně po dobu 32 dní po infekci. Plasma byla získávána z oxalátové krve následujícím způsobem: do 100 *ml* centrifugační zkumavky byly napipetovány 3 *ml* 30 % šťavelanu drasel-

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

ného a za občasného otáčení vysušeny při teplotě asi 50—60° C. Šťavelan se vyloučil ve formě drobných krystalků na stěnách nádobky. Do každé takové nádobky pak bylo odebráno 100 *ml* krve a zamícháno, aby se krystalky rozpustily. Krev pak byla odstředěna a plasma stažena pipetou. Část plasmy byla zpracována ihned, část zatavena do ampulek a uložena při —25° C. V případě hovězí krve bylo použito mnohem většího množství oxalátu než tomu jsme zvyklí při odběrech plasmy lidské proto, že hovězí krev i zdravých zvířat obsahuje mnohem větší množství fibrinogenu, a tím více pak zvířat po infekci, kdy je obsah fibrinogenu více než třikrát vyšší než u lidské plasmy.

Stanovení fibrinogenu bylo prováděno adaptací běžné klinické metody, uváděné Hořejším (2). 0,4 *ml* plasmy se zředí fysiologickým roztokem na 20 *ml*, přidá se 0,5 *ml* 2,5 % chloridu vápenatého a doplní do 25 *ml* opět fysiologickým roztokem. Roztok se zamíchá a nechá stát přes noc v ledničce. Vytvořená síťka nerozpustného fibrinu se sbalí přidáním kapky oktanolu a protřepáním, pak se odfiltruje a sesbírá na filtru otavenou skleněnou tyčinkou v kuličku, která se obvyklým způsobem spaluje s 0,5 *ml* koncentrované H_2SO_4 *sine N* za občaného přidání peroxydu vodíku k urychlení mineralisace.

Zmineralisovaný dusík se při přesnější práci destiluje v mikrokjeldahlově přístroji a uvolněný čpavek se chytá do kyseliny borité (5 *ml* nasyceného roztoku kyseliny borité plus 5 *ml* destilované H_2O) a titruje n/70 HCl na Tashiro indikátor. Výsledná spotřeba n/70 HCl, zmenšená o spotřebu ve slepé zkoušce, pak dělena 32 udává přímo procento fibrinogenu ve vzorku.

Část experimentální

Podle údajů Petra a Boháče (3) počínají albuminy klesat 5. dne po infekci a k maximálnímu poklesu dochází 16.—19. dne po infekci. Gamma-globuliny se počínají zvedat 8.—11. dne a dosahují maxima asi 3 neděle po infekci. Mukoproteiny v seru se pak počínají zvedat asi 3. dne po infekci a jejich nejvyšší hladina byla zjištěna mezi 6. a 9. dnem po infekci.

Fibrinogen se proti těmto složkám krevní plasmy chová zcela odlišným způsobem. Pro lepší přehlednost byly výsledky stanovení sestaveny v tab. 1, kde je zvláště dobře patrný pohyb fibrinogenu v procentech bílkoviny v plasmě, který kolísá od 0,45 % až do 1,73 %. Je zde patrný vzestup hladiny fibrinogenu již záhy po infekci, a to v mnoha případech již 1. dne po infekci. Odtud pak strmě stoupá až do 7. dne po infekci, kdy byly u všech typických případů zjištěny hodnoty nejvyšší. Odtud hladina více či méně pomalu klesá. Na konci pokusného období, t. j. 32 dní po infekci, jsou výsledky poněkud nesourodé. U některých zvířat hladina fibrinogenu dosáhla hodnot zvířat zdravých, u jiných byla vyšší či dokonce nižší. Vcelku však nutno poznamenat, že u všech případů se jeví znatelné maximum 7. dne po infekci.

Zcela výjimečně se chovala zvířata č. 7 a 12, u nichž se hladina fibrinogenu od 1. dne po infekci postupně zvyšovala téměř až na konec pokusného období, kdy stále ještě činila více než 200 % hodnot zvířat zdravých.

Procentické vyjádření získaných hodnot, vztažených na hodnotu fibrinogenu u zvířete zdravého jako na základ, rovnající se 100 %, je nejlépe vidět na obr. 1 a 2.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Tab. 1. Vliv infekce virem slintavky a kulhavky na hladinu fibrinogenu. (V levém sloupci u každého zvířete uvedeno procento fibrinogenu v plasmě, v pravém sloupci jsou uvedena relativní procenta, vztažená na základní hodnotu fibrinogenu u zvířete před infekcí, rovnající se 100 %).

Табл. 1. Влияние инфекции вирусом ящура на уровень фибриногена. (В левом столбце у каждого животного указывается процент фибриногена в протоплазме, в правом столбце приведен относительный процент, относящийся к исходному уровню фибриногена у животного до инфекции; это количество принято за 100%.)

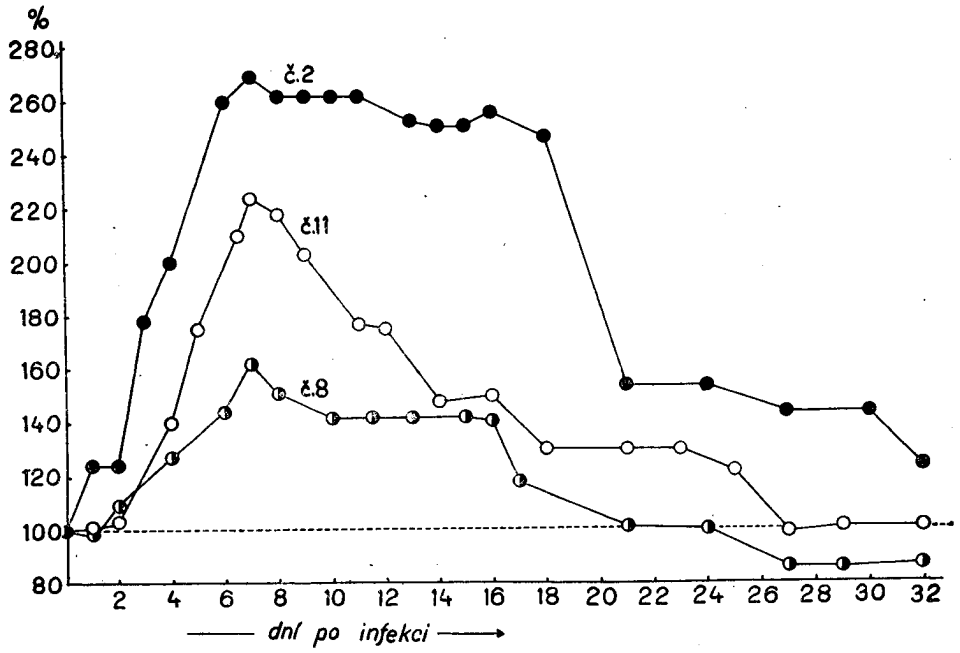
dní po injekci	zvíře č.											
	2		5		6		10		3		12	
	%	rel. %	%	rel. %	%	rel. %	%	rel. %	%	rel. %	%	rel. %
Z	0,55	100	0,70	100	0,72	100	0,63	100	0,46	100	0,54	100
1	0,68	124	0,68	97	0,72	100	0,66	105	0,49	106	0,61	113
2	0,68	124	0,72	103	0,75	104	0,69	109	0,49	106	0,66	122
3	0,98	178	0,87	124	1,09	151	—	—	—	—	—	—
4	1,11	200	—	—	1,14	159	0,93	148	0,75	163	1,12	207
5	—	—	1,17	167	—	—	1,12	178	0,86	187	1,18	219
6	1,43	260	1,30	186	1,27	177	—	—	1,01	220	—	—
7	1,47	269	1,33	190	1,35	188	1,33	211	1,10	239	1,25	232
8	1,44	262	1,22	174	1,20	167	1,29	205	1,02	222	1,31	243
9	1,44	262	—	—	1,12	156	1,12	178	1,01	220	1,34	248
10	1,44	262	1,12	160	1,10	153	—	—	1,02	222	1,58	293
11	1,44	262	1,06	152	1,05	146	1,13	180	0,98	213	1,69	313
12	—	—	0,96	137	—	—	1,11	176	0,98	213	—	—
13	1,39	253	0,89	127	—	—	—	—	—	—	1,65	306
14	1,38	251	—	—	1,00	139	1,06	168	0,95	206	—	—
15	1,38	251	0,83	119	1,00	139	—	—	—	—	1,52	282
16	1,41	256	—	—	1,02	142	0,92	146	0,90	196	1,49	276
18	1,36	247	0,89	127	1,02	142	0,90	143	0,90	196	1,66	307
21	0,85	154	0,89	127	1,10	153	0,83	132	0,85	185	1,59	294
24	0,85	154	0,77	110	1,05	146	0,83	132	0,85	185	1,73	320
27	0,79	144	0,75	107	0,85	118	0,71	113	0,60	130	—	—
30	0,79	144	0,65	93	0,82	114	0,64	102	0,60	130	1,63	302
32	0,68	124	0,66	94	0,76	105	0,64	102	—	—	1,46	270

Na obr. 1 jsou uvedeny výsledky pokusu u 3 zvířat. Byly vybrány případy nejzajímavější. Tak u zvířete č. 2 nastává zvláště prudký vzestup hladiny fibrinogenu již 1. dne po infekci a maximum 7. dne po infekci bylo ze všech zkoumaných případů nejvyšší, t. j. činilo 269 % původní hodnoty. Na konci pokusného období je hladina stále ještě mnohem vyšší než u zvířete zdravého, t. j. 124 %. U zvířete č. 11 nastává znatelný prudký vzestup až 3. dne po infekci a maximum 7. dne činí 224 %; opět normálních hodnot bylo zde dosaženo již 27. dne. U zvířete č. 8 bylo maximum ze všech zkoumaných případů nejnižší, pouze 163 %. Hladina fibrinogenu zde dokonce klesá pod normální hodnotu na pouhých 85 %, a to 27. dne po infekci a zůstává tak až do konce.

Na obr. 2 jsou uvedeny 2 případy s abnormálním pohybem fibrinogenu. Hladina fibrinogenu se stále zvyšuje téměř až do konce pokusného období, aniž by v průběhu křivky byl patrný nějaký náznak výraznějšího maxima. Hladina fibrinogenu činí ještě 32 dní po infekci u zvířete č. 12 270 % a u zvířete č. 7 220 %. U zvířete č. 12 byla mimo to zjištěna nejvyšší hodnota vůbec, t. j. 1,73 % fibrinogenu v plasmě, čili 320 % proti obsahu fibrinogenu před infekcí.

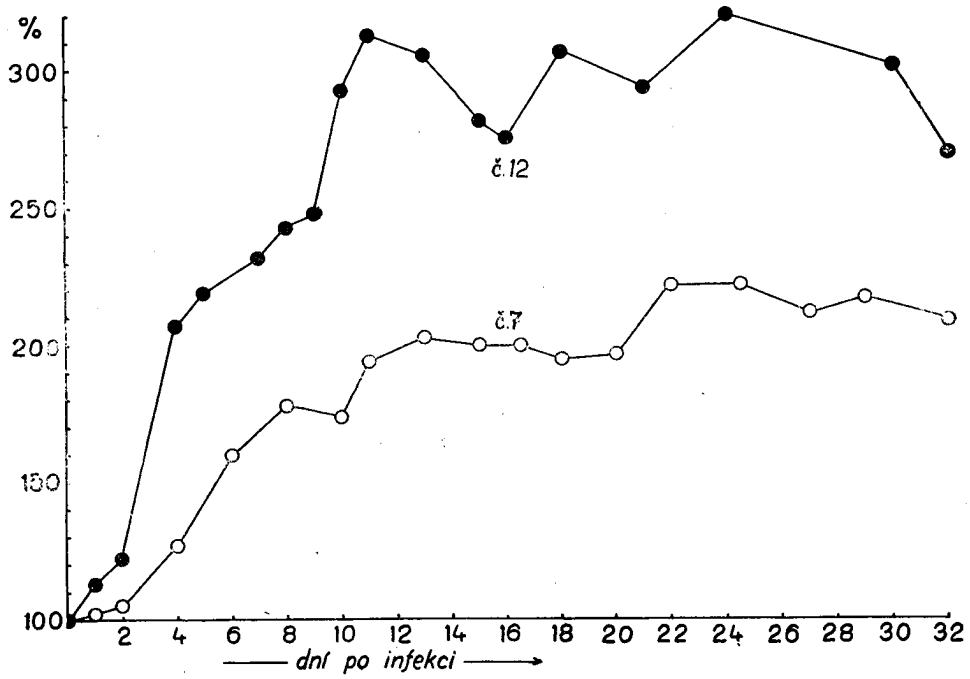
Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2



Diagr. 1. Pohyb hladiny fibrinogenu po infekci virem slintavky a kulhavky. Uvedeny 3 normální případy u zvířat č. 2, 8 a 11.

Диагр. 1. Изменение уровня фибриногена после инфекции вирусом яшура. Приведены 3 нормальных случая у животных №№ 2, 8, 11.



Diagr. 2. Pohyb hladiny fibrinogenu po infekci virem slintavky a kulhavky. Uvedeny 2 odlišně se chovající případy u zvířat č. 7 a 12.

Диагр. 2. Изменения уровня фибриногена после инфекции вирусом ящура. Приведены 2 отличающихся случая у животных №№ 7 и 12.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Z výsledků zde podaných lze učinit takový uzávěr, že infekce virem slintavky a kulhavky tvoří hluboký zásah do chování hladiny fibrinogenu v hovězí plasmě a znamená její prudký vzestup mezi 1. a 7. dnem po infekci, odkud pak více či méně pomalu klesá. Mohutnost vzestupu pak bude pravděpodobně záviset na síle infekce, protože ještě dodatečně bylo zjištěno, že u zvířat po masivní infekci, tak jak se provádí k výrobě infekčního materiálu, dosahovala hladina fibrinogenu již za 18 hodin po infekci hodnot až o 50 % vyšších než zvířata zdravá.

Výjimkou zde byly dva případy, kde hladina fibrinogenu byla i na konci pokusného období více než dvakrát vyšší než hodnoty zvířat před infekcí. Je možné, že toto odlišné chování je způsobeno tím, že všechna zvířata byla během celého pokusného období chována v prostoru, silně zamořeném slintavkou a kulhavkou, byla zde tedy možnost trvalého přílivu antigenu do těla zvířat. Zajímavé je, že při sledování hladin fosforu v krvi se tatáž zvířata chovala rovněž odlišným způsobem.

Závěr

Byla sledována hladina fibrinogenu v plasmě po infekci virem slintavky a kulhavky.

K prvnímu zvýšení dochází již prvního nebo druhého dne po infekci, odtud příkře stoupá a dosahuje maxima 7. dne po infekci, kdy činí 163 až 269 % hodnot zdravých jedinců před infekcí. Počínajíc 8. dnem po infekci se hladina fibrinogenu více či méně pomalu snižuje. Na konci pokusného období, t. j. 32 dní po infekci, část zvířat dosáhla původních hodnot, jiná znamenala dosud hodnoty zvýšené nebo dokonce nižší než před infekcí.

Ve dvou případech se hladina fibrinogenu postupně zvyšovala bez jakéhokoliv náznaku maxima téměř až do konce pokusného období. 32 dní po infekci tu hladina fibrinogenu činila 270 a 220 % hodnot výchozích. Obsah fibrinogenu v plasmě se v tomto pokuse pohyboval od 0,45 % do 1,73 %.

Literatura

1. Grausgruber W., Stöckl W., 1953: Z. f. exp. Veterinärmed. 8, 404-415. — 2. Hořejší J., Slavík K.: Základy chemického vyšetřování v lékařství, 1953, 4. vyd., str. 223, Stát. zdrav. nakl. v Praze. — 3. Petr G., Boháč J., 1954: Vet. časopis SAVu, 3, 133-151. — 4. Petr G., Dombek R., 1954: Vet. časopis SAVu, 3, 151-155. — 5. Stöckl W., Zacherl M. K., 1953: Hoppe-Seyl. Z. 293, 278-283. — 6. Wehmeyer P., 1950: Revue d'Immunol. 14, 57-61.

Биохимическое изучение вируса ящура I.

Наблюдение за количеством фибриногена после инфекции вирусом ящура

В работе ведется наблюдение за количеством фибриногена в протоплазме после инфекции вирусом ящура.

Первое повышение количества фибриногена наблюдается уже в 1 или во второй день после инфекции, с этого момента резко возрастает и достигает максимума

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

на 7 день после инфекции, когда оно составляет 163—269% количества здоровых экземпляров до инфекции. Начиная с 8 дня после инфекции количество фибриногена более или менее постепенно снижается. В конце опытного периода, т. е. на 32 день после инфекции, у части животных это количество достигло первоначального уровня, у других наблюдалось повышение или даже снижение по сравнению с состоянием до инфекции.

В двух исключительных случаях уровень фибриногена постепенно повышался без каких-либо признаков достижения максимума почти до конца опытного периода. На 32 день после инфекции уровень фибриногена составлял 270—220% исходного содержания.

Содержание фибриногена в протоплазме крупного рогатого скота в этом опыте колебалось от 0,45% до 1,73%.

Biochemische Studien des Maul- und Klauenseuche Virus I

Die Verfolgung des Fibrinogenniveaus nach der Infektion mit dem MKS Virus

Es wurde das Fibrinogenniveau im Plasma nach der Infektion mit dem Maul- und Klauenseuche-Virus verfolgt.

Zur ersten Erhöhung des Fibrinogenniveaus kommt es schon am 1.—2. Tag nach der Infektion, worauf ein heftiger Anstieg erfolgt und das Maximum am 7. Tag nach der Infektion erreicht wird (das Fibrinogen erreicht hier 163 bis 269 % der ursprünglichen Konzentration). Beginnend mit dem 8. Tage nach der Infektion wird das Fibrinogenniveau mehr oder weniger langsam herabgesetzt. Am Ende der Experimentalperiode, d. h. 32 Tage nach der Infektion, erreichte ein Teil der Versuchstiere die ursprüngliche Konzentration, während bei den anderen entweder höhere oder sogar niedrigere Werte als vor der Infektion festgestellt wurden.

In zwei Ausnahmefällen stieg das Fibrinogenniveau nach und nach ohne irgendwelche Andeutung eines Maximums fast bis zum Ende der Experimentalperiode, am 32 Tage nach der Infektion betrug das Fibrinogenniveau 270 und 220 % der ursprünglichen Werte.

Der Fibrinogengehalt im Plasma von Rindvieh bewegte sich bei diesem Versuch von 0,45 % bis zu 1,73 %.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

SBORNÍK ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ROČNÍK XXIX - 1956 - ČÍSLO 11-12

Biochemické studie viru slintavky a kulhavky

II. Kombinace viru slintavky a kulhavky s protaminsulfátem

Биохимическое изучение вируса ящура
II. Комбинация вируса ящура с протаминсульфатом

Biochemical Study of Foot-and Mouth Disease Virus II — Combination of Foot-and-Mouth Disease Virus with Protamine

RNDr Gustav PETR
Bioveta, n. p., Terezín, řed. Dr R. Dombek

Došlo dne 30. VII. 1956

Z četných publikací je známo, že protaminu lze často velmi výhodně užívat při čištění různého biologického materiálu, ať již v přípravě antigenů v serologii, nebo při isolaci virů ze surového tkáňového extraktu (5, 17). Warren a spol. (20) klasifikovali řadu virů podle toho, zda po přidání protaminu k virové suspensi byl virus ve větší míře přítomen ve vzniklé sraženině nebo supernatantu. Tak zjistili, že virus západní koňské encephalomyelitidy (WEE), encephalomyokarditidy, japonské B a St. Louis encephalitidy a poliomyelitidy (Lansing) po přidání protaminu k příslušné suspensi je přítomen v supernatantu, kdežto na př. virus herpesu, vakcinie, lymfocytární choriomeningitidy (LCM) nebo myší encephalomyelitidy je přítomen v sedimentu. Viry čištěné tímto způsobem si zachovaly plnou potenciální hodnotu jako antigeny a u japonské B encephalitidy i jako vakciny po ozáření ultrafialovými paprsky. Z jiných autorů zjistili F. C. Bawden a N. W. Pirie (3), že virus tabákové mosaiky je protaminem precipitován a L. A. Chambers a W. Henle (15) pozorovali totéž u vakcinie. S úspěchem bylo užito protaminu též při čištění viru myší encephalomyokarditidy (21).

U viru slintavky a kulhavky studovali reakci viru s protaminem a albuminem Hansen a Holm (10). Zjistili, že protamin, přidáván ke směsi suspense viru a hovězího albuminu způsobuje kvantitativní vyvločkování komplexu virus-albumin-protamin. Tento komplex je ve vodě nerozpustný, ale rozpouští se dobře v *n/1 NaCl*. K čištění viru slintavky a kulhavky nelze tohoto postupu použít, neboť suspense je naopak obohacena o přidávaný albumin, ale po ozáření ultrafialovými paprsky a po adsorpci na hydroxyd hlinitý může sloužit jako vakcina.

Po chemické stránce tvoří protaminy nejjednodušší skupinu bílkovin. Vzhledem k vysokému obsahu basických aminokyselin, hlavně argininu, mají charakter vysloveně basický, což se projevuje tvorbou komplexu s bílkovinami, majícími isoelektrický bod na straně kyselé a nesoucími negativní náboj. Předpokládá se tedy, že precipitace protaminem je výsledkem kombinace mezi obráceně nabitými částicemi za vzniku komplexů podobných solím. Tímto pro-

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

blémem se podrobně zabýval E. Hammarsten (9) a A. Kleczkowski (16).

Cílem této základní práce bylo zjistit, zda je možno pomocí protaminu získat virus slintavky a kulhavky ve stavu pokud možno čistém, zbaveném co největší části doprovodních balastních látek a dále, zda je možno touto metodou virus koncentrovat. Zavedení takové metodiky by mělo dále velký význam nejen pro bližší chemický výzkum viru slintavky a kulhavky, nýbrž i pro výrobní účely i v serologii při přípravě čistého antigenu.

Řešení problému si vyžadovalo rozdělení celé práce na několik úkolů dílčích. Bylo nutno zjistit: 1. Jakého množství protaminu je třeba ke kvantitativnímu vyvločkování viru do sedimentu, 2. v jakém ředění virové suspense protamin úspěšně působí, 3. jakým způsobem lze virus nebo komplex virus-protamin extrahovat ze sedimentu a 4. je-li možno použít protaminu k přímé purifikaci viru slintavky a kulhavky.

Materiál a metody

Infekční materiál tvořila sliznice hovězího jazyka, infikovaná masivně virem slintavky a kulhavky Vallée „A", resp. „O" typu, buď čerstvá nebo ve většině případů uchovávaná v mrazicím pultě při -60^0 *C*. Veškeré práce s infekčním materiálem byly prováděny při *pH* 7,6 a za pokojové teploty, pokud neuvedeno jinak v textu.

Suspense viru byla připravována roztíráním infikované sliznice s přečištěným pískem do konsistence pasty a ředěním m/150 fosfátovým pufrem *pH* 7,6. Po centrifugaci suspense byl sediment extrahován stejným způsobem ještě dvakrát a supernatanty posléze doředěny na žádanou koncentraci suspense viru.

Obsah viru byl zjišťován titrací infekčního materiálu podle metody Hendersonovy (13) v úpravě Barkově (2) na jazyku mladého skotu (asi 300 *kg* živé váhy): na každý jazyk aplikovány 3 řady různých ředění, při čemž bylo každým provedeno 5 vpichů po 0,5 *ml* v řadě. Řady byly uspořádány tak, že 2 byly umístěny každá po straně jazyka longitudinálně a třetí řada transversálně pod valem. Vedle toho byly jednotlivé řady ředění umístěny tak, aby umožnily trojí pozorování vždy na jiném místě jazyka a u tří různých zvířat.

Protaminsulfát: 1 *gram* klupeinsulfátu byl rozpuštěn ve 100 *ml* destilované vody. K tomuto silně kyselému roztoku byl přidáván n/50 *NaOH* tak dlouho, až se vytvořil slabě viditelný zákal, t. j. do *pH* 5,8—6,1. Použitý klupeinsulfát byl připraven podle metody R. J. Blocka a spol. (4) ze zmraženého mlíčí sleďů.

Chloroform byl nejprve čištěn uhličitanem draselným a před použitím destilován. Výtřepek s vodou reagoval neutrálně.

Celkový dusík byl stanoven mikro-Kjeldahlem za použití selenia jako katalysátoru.

Výsledky

Stanovení optimální koncentrace protaminu ke kvantitativní precipitaci viru do sedimentu

A. Hansen a P. Holm (10) ve svých pokusech s komplexem virus-albumin-protamin používají většinou 1% suspense viru. Toto ředění by bylo pro praktické účely příliš vysoké, zejména pro nepohodlnou manipulaci s veli-

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

kými objemy. Pro zjišťování množství protaminu, potřebného ke kvantitativní precipitaci viru do sedimentu, byla proto zvolena suspense 5 %. Do řady zkumavek byla napipetována 5% suspense viru v množství, odpovídajícím 2 g materiálu. Do každé zkumavky pak byl postupně přidáván protamin v množství od 1 do 20 *mg* ve formě upraveného 1% roztoku. Již během přidávání protaminu se tvořil těžký bílý zákal, který zejména při vyšších koncentracích protaminu rychle klesal ke dnu. Zkumavky byly po 20minutovém stání v lednici odstřeďovány při 3000 otáčkách/min. Sediment, obsahující vedle komplexu virus-protamin i jiné balastní látky, byl promyt m/150 fosfátovým pufrem *pH* 7,6, resuspendován tímtéž pufrem do objemu výchozí suspense. Obsah viru byl zjišťován titrací jak sedimentu, tak supernatantu i výchozí suspense na zvířatech.

Výsledky jednoho z těchto pokusů jsou shrnuty v tab. 1. U Vallée „O" typu byly hodnoty, udávající ID_{50}, zaokrouhleny. U typu „A" byla titrace provedena přesněji, aby bylo možno lépe pozorovat vztah mezi jednotlivými pokusy. Jak je vidět, infektivita sedimentu se při přidání protaminu v množství 2 až 20 *mg* na 2 gramy infekční tkáně prakticky rovná kontrolní výchozí suspensi. Supernatant zůstává sice infekční (asi 10,000 ID_{50}), ale jeho titr je v porovnání s titrem sedimentu (asi 10,000,000 ID_{50}), bezvýznamný. Zajímavé je porovnání těchto výsledků s pokusy H a n s e n a a H o l m a (10), kteří udávají, že při přebytku protaminu se zdá sediment opět rozpouštět. Nic takového nebylo pozorováno ani při těch nejvyšších koncentracích protaminu. *Při srážení 5% suspense viru protaminem je tedy možno použít na 1 gram infekční tkáně stejný nebo až desetinásobný počet miligramů protaminu ve formě 1% upraveného roztoku.*

Tab. 1. Zjišťování množství protaminu, potřebného ke kvantitativní precipitaci viru do sedimentu

Таблица 1. Определение количества протамина, необходимого для квантитативной преципитации вируса в седимент

Table 1. Determining the amount of protamin necessary for a quantitative precipitation of virus to sediment

Vallée "O" typ 2 *g* materiálu v 5 % suspensi			Vallée "A" typ 2 *g* materiálu v 5 % suspensi		
mg protaminu užitého ke srážení (1% roztok)	ID_{50}		*mg* protaminu užitého ke srážení (1% roztok)	ID_{50}	
	sedimentu	supernatantu		sedimentu	supernatantu
0 *mg* (kontrola)	$10^{-7,2}$	—	0 *mg* (kontrola)	$10^{-7,52}$	—
1 *mg*	$<10^{-5}$	$<10^{-7}$	—	—	—
2 *mg*	$>10^{-7}$	10^{-4}	2 *mg*	$10^{-7,3}$	10^{-3}
3 *mg*	10^{-7}	10^{-5}	3 *mg*	$10^{-7,6}$	10^{-4}
4 *mg*	$>10^{-7}$	$>10^{-3}$	4 *mg*	$10^{-7,4}$	10^{-4}
6 *mg*	10^{-7}	10^{-4}	6 *mg*	$10^{-7,2}$	10^{-4}
10 *mg*	$>10^{-6}$	10^{-3}	—	—	—
20 *mg*	$>10^{-7}$	$<10^{-5}$	—	—	—

Rozmezí ředění suspense při precipitaci viru protaminem

Úkolem druhé fáze pokusů bylo zjistit, v jakém rozmezí ředění suspense dochází ke kvantitativní precipitaci viru do sedimentu po působení protaminem. Bylo tedy zvoleno určité stálé množství protaminu, kterým byl precipitován virus

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

z různě ředěných suspensí viru, ale obsahujících stejné váhové množství infekčního materiálu. Zvolené množství protaminu, používaného ke srážení, činilo 4 *mg*, opět ve formě 1% upraveného roztoku. Postup při zpracování suspense byl tentýž jak uvedeno shora, t. j. po přidání protaminu ponechána suspense 20 minut v lednici, aby zákal řádně vyvločkoval, odstředěna, supernatant zkoušen na infektivitu přímo a sediment po předchozím promytí m/150 fosfátovým pufrem *pH* 7,6 a resuspendaci stejným pufrem titrován na obsah viru. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2. Ředění suspense viru slintavky a kulhavky, při kterém lze virus srazit protaminem kvantitativně do sedimentu

Таблица 2. Разбавление суспензии вируса ящура, при котором возможно протамином квантитативно седиментировать вирус.

Table 2. Dilution of suspension of foot-and mouth disease virus, during which the virus can be precipitated quantitatively with protamine in sediment

Vallée "O" typ + 4 *mg* protaminu			Vallée "A" typ + 4 *mg* protaminu		
2 *g* materiálu v celkovém objemu	ID_{50}		2 *g* materiálu v celkovém objemu	ID_{50}	
	sedimentu	supernatantu		sedimentu	supernatantu
200 (= 1% virus)	$10^{-6,7}$	10^{-3}	200 (= 1% virus)	$<10^{-7}$	10^{-3}
80 (= 2,5% virus)	$10^{-6,5}$	10^{-4}	80 (= 2,5% virus)	10^{-7}	10^{-4}
40 (= 5% virus)	$10^{-6,8}$	10^{-3}	40 (= 5% virus)	$<10^{-6}$	10^{-4}
20 (= 10% virus)	$10^{-6,7}$	10^{-4}	20 (= 10% virus)	10^{-7}	10^{-4}
10 (= 20% virus)	$10^{-6,6}$	10^{-5}	10 (= 20% virus)	10^{-7}	10^{-4}
kontrola	$10^{-6,8}$		kontrola	$10^{-7,3}$	

Jak u typu „O", tak u typu „A" byl virus získán opět prakticky kvantitativně. Spolu s výsledky pokusů předchozích vyplývá, že lze protaminem v množství, odpovídajícím dvou až desetinásobku miligramů protaminsulfátu na dané množství infekčního materiálu v gramech, úspěšně *precipitovat virus ze suspensí, obsahujících 1 až 20 % infekčního materiálu.*

Vliv doby na precipitaci viru protaminem

K doplnění předchozích pokusů byl ještě sledován vliv doby srážení na infektivitu supernatantu i sedimentu. Vzorky po přidání protaminu byly odstřeďovány ihned, po 10, 20 a 30minutovém stání za pokojové teploty i za chladu a po 1, 2, 3, 6, 12 a 24hodinovém stání v lednici. Bylo dokázáno, že *doba srážení má vliv pouze na vyvločkování zákalu a nikoliv na ještě dokonalejší precipitaci viru.* Naopak již po 3hodinovém stání v lednici začal obsah viru v sedimentu i supernatantu klesat a po 24hodinovém stání v lednici byl již mnohem nižší než obsah viru v původní suspensi. Výtěžnost viru, resp. snížení titru supernatantu se nezvětšilo ani byl-li protamin přidáván ve dvou částech, druhá dávka 10 minut po první. Tento způsob srážení má určitý význam při zpracovávání většího množství infekčního materiálu, na př. při výrobě koncentrátové protaminové vakciny, kdy se vypočítané množství protaminu přidává ve dvou dávkách 10 minut po sobě (19). Z uvedených důvodů bylo upuštěno od delší doby precipitace a vzorky ponechávány stát 5—10 minut za teploty pokojové nebo 10—20 minut za chladu. Ve většině případů není ani

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

nutno čekat na vyvločkování, neboť bylo-li protaminu dostatečné množství, zákal velmi rychle sedimentoval již při 2,500 *o/min*. Výjimečně zákal nevyvločkoval a po odcentrifugování sedimentu byl supernatant ještě stále slabě zakalen. V takovém případě stačilo přidat trochu protaminu, aby i zbylý zákal sedimentoval. Ve všech případech byl sediment špinavě bílé barvy, lepkavý a po určité době stání na vzduchu poněkud zprůsvitněl a nabyl syrupovité konsistence.

Extrakce viru z protaminového sedimentu

Sediment, vznikající po přidávání protaminu k suspensi viru, obsahuje pochopitelně vedle komplexu virus-protamin i velkou část balastních látek. Běželo tedy o to, jakým způsobem virus extrahovat, aby do extraktu přešlo co nejméně cizích látek. Původně byl k extrakci používán 1 *mol NaCl*. Experimentální výsledky však ukázaly, že tento způsob není vhodný, jednak proto, že extrakcí 1 *mol NaCl* přecházela do roztoku i značná část komplexů protaminu s balastními látkami, jednak bylo obtížné oddělovat extrakt od sedimentu, protože i při jednohodinové centrifugaci při 6,000 o/min. zůstával supernatant silně zakalen balastními bílkovinami, případně jejich komplexy s protaminem.

K odstranění zákalu a zlepšení metody hlavně se zřetelem k získání co nejčistšího viru, byly prováděny pokusy extrakce viru za přítomnosti chloroformu. Chloroform sám nemá mít inaktivačního vlivu na aktivitu viru a mimo to pro svou schopnost tvořit nerozpustné gely třepáním s roztoky bílkovin je velmi často používán při odstraňování bílkovin z roztoků. Podle toho by při extrakci viru ze sedimentu za přítomnosti chloroformů byla odstraněna i velká část balastních bílkovin, což by mělo pro purifikaci viru nesmírný význam. Z těchto důvodů byla 10% suspense infikované tkáně hovězího jazyka rozdělena po 25 *ml* do 4 centrifugačních zkumavek, část pak použita jako kontrola ke stanovení obsahu viru. Ke všem vzorkům bylo přidáno po 5 *ml* protaminu a po 10 minutách stání při pokojové teplotě vzniklý zákal odstředěn. Pak bylo do každé zkumavky napipetováno 5 *ml* chloroformu a 25 *ml* různě koncentrovaného roztoku *NaCl*, upraveného na *pH* 7,6, případně m/150 fosfátového pufru *pH* 7,6. Směs byla důkladně třepána 10 minut a odstředěna při 3.000 o/min. Supernant byl pak titrován běžným způsobem na obsah viru. Výsledky vyjádřené jako ID_{50}, poukázaly na to, že množství viru, případně komplexu virus-protamin, extrahovaného za přítomnosti chloroformu, stoupalo s koncentrací *NaCl* a při použití 1 *mol NaCl* dosáhlo téměř stejných hodnot jako kontrola (tab. 3). Ke zjištění stupně čištění byl současně v supernatantech stanoven obsah dusíku. Hodnoty, vyjádřené v *mg % N*, byly daleko nižší než u kontrolní suspense a se zvyšující se koncentrací *NaCl* se zvyšovaly. Údaje, uvedené v 1. sloupci v tab. 3 značí průběh jednoho takového pokusu. Jindy byly nalezeny poměry jiné.

Stoupající hodnoty ID_{50} i zvyšující se obsah dusíku sice sledovaly prakticky tutéž křivku v závislosti na molaritě *NaCl*, ale obsah viru a hlavně obsah dusíku byly závislé výhradně na důkladnosti i době třepání. U vzorků třepaných kratší dobu byl obsah dusíku vyšší, u vzorků třepaných na turmixu byl obsah dusíku opět nižší. V 1. sloupci tab. 4 byl protaminový sediment extrahován pouze 3 minuty třepáním s chloroformem. Výtěžnost viru v supernatantu byla nižší, kdežto naopak obsah dusíku byl vyšší. I při tomto způsobu extrakce zůstával supernatant občas zakalen zejména při vyšších koncentracích *NaCl*. Zákal byl odstraňován třepáním supernatantu s dalšími 5 *ml* chloroformu, znovu centrifugováno a opět stanoveny hodnoty ID_{50} i obsah dusíku. Hodnoty vy-

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

jádřené ve 2. sloupci tab. 3 ukazují, že infektivita supernatantu se neměnila, ale obsah dusíku se snížil ještě více. U výtřepku s m/150 fosfátovým pufrem *pH* 7,6 jevil supernatant po druhém třepání dokonce již zápornou reakci na kyselinu sulfosalicylovou. Tak bylo znovu potvrzeno, že chloroform nemá škodlivého vlivu na infektivitu viru, neboť vzorky, které byly třepány s chloroformem třikrát za sebou, nejevily rozdílu v obsahu viru od vzorků třepaných pouze jednou. *Nejvýhodnějším roztokem pro extrakci viru z protaminového sedimentu je 0,15 mol NaCl nebo m/150 fosfátový pufr pH 7,6* vzhledem k tomu, že výtřepky s těmito roztoky byly na balastní bílkoviny poměrně chudší než tomu *bylo u vyšších koncentrací NaCl.*

Tab. 3. Extrakce viru slintavky a kulhavky z protaminového sedimentu m/150 fosf. pufrem pH 7,6 a různými roztoky NaCl za přítomnosti chloroformu. (Vallée „O" typ, třepáno 10 minut)

Таблица 3. Экстрагирование вируса ящура из протаминового седимента м/150 фосфатным буфером pH 7,6 и различными растворами NaCl при наличии хлороформа (Valle O typ, встряхивание 10 минут)

Table 3. Extraction of the foot-and-mouth disease virus from protamine sediment with a phosphate buffer solution of a concentration of m/150 at pH 7,6 and with various solutions of NaCl in presence of chloroform. (Vallée 0 type, shaken 10 minutes)

	1. třepání		2. třepání	
extrakční roztok	ID_{50}	*mg* % N	ID_{50}	*mg* % N
m/150 fosf. pufr	$10^{-6,1}$	0,9	$10^{-6,2}$	<0,1*)
0,15 mol NaCl	$10^{-6,3}$	1,8	$10^{-6,5}$	0,6
0,5 mol NaCl	$10^{-6,3}$	3,1	$10^{-6,5}$	1,6
1 mol NaCl	$10^{-6,7}$	4,7	$10^{-6,7}$	2,9
Kontrolní suspense	$10^{-6,9}$	38	—	—

*) Vzorek dával negativní reakci na kyselinu sulfosalicylovou.

Tab. 4. Extrakce viru slintavky a kulhavky z protaminového sedimentu m/150 fosf. pufrem pH 7,6 a různými roztoky NaCl za přítomnosti chloroformu. (Vallée „A" typ, třepáno 3 minuty)

Таблица 4. Экстрагирование вируса ящура из протаминового седимента м/150 фосфатным буфером pH 7,6 и различными растворами NaCl при наличии хлороформа (Valle A typ, встряхивание 3 минуты)

Table 4. Extraction of the foot-and-mouth disease virus from protamine sediment with a phosphate buffer solution of a concentration of m/150 at pH 7,6 and with various solutions of NaCl in presence of chloroform. (Vallée A type, shaken 3 minutes)

	1. třepání		2. třepání	
extrační roztok	ID_{50}	*mg* % N	ID_{50}	*mg* % N
m/150 fosf. pufr	$10^{-5,4}$	1,2	$10^{-5,2}$	<0,1*)
0,15 mol NaCl	$10^{-5,8}$	2,4	$10^{-6,0}$	0,8
1 mol NaCl	$10^{-6,5}$	5,2	$10^{-6,5}$	3
Kontrolní suspense	$10^{-7,2}$	41	—	—

*) Vzorek dával negativní reakci na kyselinu sulfosalicylovou.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Pokusy o purifikaci viru slintavky a kulhavky

Na základě předchozích pokusů byly upraveny další pokusy, zaměřené k čištění viru slintavky a kulhavky pomocí protaminsulfátu. Ke 250 *ml* 10% suspense „A" typu, mající obsah dusíku 42 *mg %* a ID_{50} $10^{-7,4}$, bylo přidáno 50 *mg* protaminu ve formě 1 % upraveného roztoku, vloženo na 10 minut do lednice. Vyvločkovaný zákal byl odstředěn při 2° *C* v chlazené odstředivce. Sediment byl promyt m/150 fosfátovým pufrem, načež bylo k němu přidáno 100 *ml* vychlazeného 0,15 *mol NaCl*, upraveného na *pH* 7,6 a 40 *ml* chloroformu a směs turmixována 2 minuty. Opět odstředěno na chlazené odstředivce. Supernatant byl uložen do lednice a sediment extrahován ještě jednou dalšími 100 *ml* 0,15 *mol NaCl* stejným způsobem. Spojené, úplně čiré supernatanty měly ID_{50} 10^{-7} a 1,3 *mg %* dusíku. Další čištění pak bylo provedeno 2minutovým turmixováním spojených supernatantů s novými 25 *ml* chloroformu. Tento supernatant měl ID_{50} 10^{-7} a obsah *N* asi 0,1 *mg %*, což znamená, že čištěný vzorek byl co do obsahu dusíku přibližně 420krát čistší, bereme-li v úvahu 10% suspensi jako základ, a to při pouze malém snížení hodnoty ID_{50}. U vzorků ještě čistších, dávajících negativní reakci na kyselinu sulfosalicylovou, je stupeň čištění pochopitelně ještě vyšší. Je ovšem nutno připomenout, že čištěné vzorky viru jsou velmi labilní a velmi rychle ztrácí aktivitu. Předběžné pokusy ukázaly, že i sám protaminový sediment je značně labilní: vzorky, uložené 1 týden v mrazícím pultě při −60° *C*, dávaly po titraci ID_{50} 10^{-3} až 10^{-4} místo původních $10^{-7,2}$.

Shora uvedeným způsobem vyčištěné vzorky jsou stejného ředění jako výchozí suspense. Aby bylo dosaženo větší koncentrace, byl k čištění extraktu přidáván nový podíl protaminu. Podle očekávání neměl být znovu vytvořený komplex virus-protamin již zatížen balastem, takže jeho dissociace by byla tím snazší. Avšak po přidání protaminu zůstával roztok čirý a ke tvorbě zákalu vůbec nedocházelo. Teprve po přidání 10 % suspense neinfekční sliznice hovězího jazyka k čištěné suspensi, docházelo po působení protaminem k tvorbě charakteristického zákalu, který obsahoval prakticky všechen přítomný virus. Takovým způsobem ovšem nebylo možno dojít ke koncentrování viru a tak zůstala tato otázka zatím nerozřešena. Částečné koncentrace lze dosáhnout použitím malých množství extrakční tekutiny. Běžně tak lze získávat 20—40 % suspense čištěného viru. Při přípravě vyšších koncentrací, až 100 % suspense (množství tekutiny použité k extrakci se rovná přibližně váze výchozí infekční sliznice), je výhodnější používat vzhledem k výtěžnosti viru 0,5 až 1 *mol NaCl* jako extrakčního roztoku, což však na druhé straně předpokládá větší počet protřepávání s chloroformem.

Obecně lze říci, tolik, že purifikace viru slintavky a kulhavky pomocí protaminsulfátu, prováděná extrakcí protaminového sedimentu za přítomnosti chloroformu, je závislá na počtu opakovaných extrakcí.

Diskuse

Uvedené výsledky nasvědčují tomu, že působením protaminu na suspensi viru slintavky a kulhavky dochází pravděpodobně ke tvorbě komplexu virus-protamin, který je strháván s nerozpustnými komplexy balastních bílkovin do sedimentu. To, že vzorky suspense viru, vyčištěné až do slabě positivní nebo dokonce negativní reakce na kyselinu sulfosalicylovou, se po přidání protaminu nezakalují, zatím co na druhé straně tatáž suspense po dodatečném přidání suspense neinfikované jazykové tkáně tvoří po působení protaminem zákal, obsahující prakticky opět všechen virus, může znamenat, že protamin sám ne-

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

stačí ke tvorbě zákalu u čištěné suspense viru, nýbrž že je k tomu třeba ještě jiné, třetí komponenty. Je možné, že při precipitaci viru protaminem spolupracuje albuminová nebo některá jiná frakce bílkovin, zejména β-globuliny, obsažené v surové suspensi jazykové sliznice. Je-li tomu tak, pak by za tím účelem musily být zaměřeny další pokusy, protože i když se Hansen a Holm (10) zmiňují o tvorbě komplexu virus-albumin-protamin, je tím míněn komplex, vznikající přidáním nejen protaminu, ale i albuminu k výchozí suspensi. Autoři předpokládají, že se komplex tvoří až po přidání nadbytečného albuminu k suspensi. R. J. Heckly (11) pozoroval, že antiserum proti tkáňovým složkám normálního hovězího jazyka precipitovalo takřka kompletně preparáty viru slintavky a kulhavky, čištěné diferenciální ultracentrifugací. Vysvětloval si to jednak nečistotami, přítomnými v preparátu viru, majícími stejné sedimentační vlastnosti jako virus, jednak možností kombinace viru s normálními tkáňovými částicemi, jak udává Curnen a spol. (7, 8) pro virus myší pneumonie (VPM). Nejpravděpodobněji však dochází ke kombinaci viru slintavky a kulhavky s β-globuliny, jak tomu nasvědčují práce některých autorů (1, 12, 14). V poslední době to byl především J. Hirtz (14), který studoval elektroforetické vlastnosti viru slintavky a kulhavky a zjistil, že v infekčním seru je u A, O i C typu vázáno na β-globuliny 70—83 % celkové infektivity, kdežto na př. u albuminů zjistil maximálně 2,7 % infektivity. Došel tak k přesvědčení, že jak v seru, tak v lymfě je virus vázán na β-globuliny.

Otázka extrakce viru ze sedimentu po působení protaminu na infekční suspensi viru byla řešena extrakcí různě koncentrovanými roztoky *NaCl* za přítomnosti chloroformu. Bylo dokázáno, že chloroform nejen nemá inaktivačního vlivu na infektivitu viru ani po čtyřnásobném třepání, ale vedle toho za jeho přítomnosti přechází do supernatantu virus nebo komplex virus-protamin poměrně chudý na balastní látky, kdežto v sedimentu zůstává daleko největší část bílkovinných komplexů. Takovým postupem lze připravit suspense viru ve velmi čistém stavu, nedávající dokonce ani reakci na kyselinu sulfosalicylovou.

Podobného způsobu užili i Ch. F. Crampton a spol. (6) při frakcionaci deoxyribonukleové kyseliny frakcionovanou dissociací komplexu této kyseliny s basickýmmi bílkovinami. Frakcionace tu spočívala v postupné extrakci gelu, vytvořeného třepáním vodného roztoku nukleohistonu s chloroformem a 1,3 mol *NaCl*, postupně se zvyšujícími koncentracemi *NaCl*.

Pokud jde o význam chloroformu při extrakci, lze se domnívat, že za přítomnosti chloroformu dochází pravděpodobně k dissociaci komplexu virus-protamin, za současného přecházení čistého viru do supernatantu. Tento názor je podporován pokusem, kdy byl protaminový sediment extrahován pouhým m/150 fosfátovým pufrem za nepřítomnosti chloroformu. Supernant zůstával vždy neinfekční, kdežto při stejné extrakci za přítomnosti chloroformu se stával extrakt silně infekční. Vazba mezi virem a protaminem však musí být poměrně labilní, neboť k její dissociaci stačí již nízká molarita *NaCl*, zatím co na př. vazba nukleohistonu (5) vyžaduje několik extrakcí postupně se zvyšujícími koncentracemi *NaCl*.

U virů, srážených protaminem do sedimentu, se mělo za to, že tohoto principu nelze k purifikaci virů použít, nejvýše že lze vzniklého sedimentu využít jako depot k immunisačním účelům. Tento názor, jak se zdá, není ve všech případech oprávněný. Na základě našich pokusů jsme došli u viru slintavky a kulhavky, který je protaminem srážen do sedimentu, k preparátům vysoce čistým. Avšak i tam, kde virus zůstává v supernatantu, je používání protaminu brzděno problémem uvolnění komplexu. K tomu byly používány různé metody, zejména trávení komplexu bu3 trypsinem (21) nebo papainem (18). Je pocho-

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

pitelné, že i krátká doba inkubace infekčního materiálu, nutná k působení enzymu, může mít značný vliv na infektivitu čištěného materiálu a že natrávené bílkoviny musí být stejně dalším postupem dokonale odstraněny, protože jinak pokusy zvláště o elektronovou mikroskopii zpravidla selhávají. Je proto jinou nespornou výhodou popsaného zavedení chloroformu do metodiky, že není třeba zařazovat do postupu purifikace viru trávení komplexu virus-protamin.

Závěr

Byla řešena možnost čištění viru slintavky a kulhavky pomocí protaminsulfátu. Experimentálně bylo dokázáno:

1. Ze suspense infikované jazykové hovězí tkáně lze virus srazit do sedimentu prakticky kvantitativně 1 % protaminsulfátem, a to množstvím 1—10 *mg* protaminu na 1 *gram* tkáně, nejlépe 2 *mg* protaminu na 1 *gram* tkáně.

2. Protaminsulfátu lze použít k precipitaci viru z 1—20 % infekční suspense viru.

3. Extrakce sedimentu po precipitaci protaminsulfátem se musí provádět za přítomnosti chloroformu, a to nejlépe opakovanou extrakcí pomocí 0,15 *mol NaCl*.

4. Pomocí protaminu byl virus slintavky a kulhavky vyčištěn natolik, že suspense tohoto viru dávala jen slabě positivní nebo dokonce neagtivní reakci na kyselinu sulfosalicylovou a co do obsahu dusíku byla minimálně 300—500-krát čistší než výchozí suspense.

5. Protaminem čištěný virus je velmi nestabilní a ztrácí největší část aktivity i v mrazu za několik dní.

Byl vysloven názor, že extrakcí protaminového sedimentu za přítomnosti chloroformu dochází k dissociaci komplexu virus-protamin za současného uvolnění viru do supernatantu.

Literatura

1. Bachrach H. L. 1952: Am J. Vet. Res. *13*, 17. — 2. Barek B. 1952: Disertační práce, vet. fakulta VŠZ Brno. — 3. Bawden F. C., Pirie N. W. 1937: Proc. Roy. Soc. Serie B 123, 274. — 4. Block R. J., Bolling D., Gershon H., Sober H. A. 1949: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *70*, 494. — 5. Craft L. M., Melnick J. L. 1950: J. Exp. Med. *92*, 483. — 6. Crampton Ch. F., Lipshitz R., Chargaff E. 1954: J. Biol. Chem. *211*, 125. — 7. Curnen E. C., Pickels E. G., Horsfall jr. F. L. 1947: Exp. Med. *85*, 23. — 8. Curnen E. C., Horsfall jr. F. L. 1947: J. Exp. Med. *85*, 39. — 9. Hammarsten E. 1924: Biochem. Z. *144*, 383. — 10. Hansen A., Holm P. 1950: Acta path. et microb. scand. *27*, 882. — 11. Heckly R. J. 1953: J. Immunol. *71*, 52. — 12. Heckly R. J. 1954: Am. J. Vet. Res. *15*, 252. — 13. Henderson W. M. 1949: A. R. C. Report Series No. 8. H. M. Stationary Office, London. — 14. Hirtz J. 1955: Archiv f. die ges. Virusforschung *6*, 124. — 15. Chambers L. A., Henle W. 1941: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *48*, 481. — 16. Kleczkowski A. 1946: Biochem. J. *40*, 677. — 17. Oker - Blom N., Nikkilä E. 1952: Acta path. et microb. scand supl. *93*, 340. — 18. Patočka F., Kubelka V., Slavík K., Boháč J. 1951: Věstník ČAZ *25*, 461. — 19. Petr G., Dombek R.: dosud nepublikováno. — 20. Warren J., Weil M. L., Russ S. B., Jeffries H. 1949: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *72*, 662, — 21. Weil L. M., Warren J., Breese S. S., Russ S. B., Jeffries H. 1952: J. Bact, *63*, 99.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Биохимическое изучение вируса ящура
II. Комбинация вируса ящура с протаминсульфатом

Автор нашел решение, дающее возможность производить изоляцию вируса ящура при помощи протаминсульфата. В результате произведенных экспериментов было доказано:

1. Что практически в квантитативном отношении из суспензии инфицированной ткани языка рогатого скота возможно достичь седиментации вируса 1% протаминсульфатом, а именно в количестве 1—10 мг протамина на 1 г ткани, лучше всего 2 мг протамина на 1 г ткани.

2. Протаминсульфат возможно применить для преципитации вируса из 1—20 % инфекционной суспензии вируса.

3. Экстрагирование осадка после преципитации протаминсульфатом следует производить при наличии хлороформа, а именно лучше всего повторным экстрагированием при помощи 0,15 мол NaCl.

4. При помощи протамина вирус ящура был изолирован настолько, что суспензия этого вируса давала только слабые позитивные или даже отрицательные реакции на сульфосолициловую кислоту, а в отношении содержания азота была по меньшей мере в 300—500 раз более чистой, нежели исходная суспензия.

5. Изолированный протамином вирус становится очень неустойчивым и теряет большую часть активности и при морозе через несколько дней.

Было высказано мнение, что путем экстрагирования протаминового седимента при наличии хлороформа происходит диссоциация комплекса вирус-протамин при одновременном переходе вируса в супернатант.

Biochemical Study of Foot-and-Mouth Disease Virus II — Combination of Foot-and-Mouth Disease Virus with Protamine

The possibility of purifying of the foot-and mouth disease virus with clupein sulphate was studied. Experiments showed:

1. From a suspension of the infected tissue of beef tongue, the virus can be precipitated in a sediment almost quantitatively with a 1% solution of clupein sulphate, as follows: 1—10 *mg* protamine per gram of tissue — the best being 2 *mg* of protamine per gram of tissue.

2. Protamine sulphate can be used to precipitate the virus from a 1—20 % infectious suspension of the virus.

3. Extraction of the sediment after precipitation with protamine sulphate must be done in the presence of chloroform, the best being repeated extraction with 0.15 mcl NaCl.

4. By means of protamin the foot-and-mouth disease virus was so purified that the suspension of this virus gave only a weak positive or even a negative reaction to sulphosalicylic acid and with regard to nitrogen content it was at least 300 to 500 times purer than the original suspension.

5. The virus purified with protamine is very unstable and loses the greater part of its activity, even when kept cold, after a few days.

6. The opinion was expressed that when the protamine sediment is extracted in the presence of chloroform there occurs a dissociation of the complex virus-protamin with a following release of the virus to supernatant.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

SBORNÍK ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
VETERINÁRNÍ MEDICINA ROČNÍK XXVIII - 1955 - ČÍSLO 2

Nebakteriální infekční onemocnění zúčastněné na komplexu t. zv. „chřipky" prasat

I. Isolace agens vyvolávajícího infekční polyserositis prasat*

Небактериальные инфекционные заболевания, составляющие комплекс так называемого «гриппа» свиней

I. Изоляция возбудителя, вызывающего инфекционный polyserositis свиней

Non-bacterial Infectious Disease Participating in the Complex of so-called "Influenza" of Swine

I. Isolation of the agent causing infectious polyserositis of pigs*

J. BOHÁČ, B. BEDNÁŘ, F. LÁZNIČKA, R. DOMBEK
Bioveta, n. p., Terezín
I. path.-anat. ústav lékařské fakulty KU v Praze

Došlo dne 8. XII. 1954

Jednou z hlavních příčin neutěšeného stavu v živočišné výrobě v ČSR je nesporně t. zv. „chřipka" prasat, která decimuje naše velkochovy vepřového bravu.

Pod pojem „chřipky" prasat se řadí téměř všechny nebakteriální afekce dýchacího traktu různorodého charakteru, a to více méně bez ohledu na etiologii. Historie a vývoj názorů na etiologii tohoto onemocnění je obecně znám. Velmi zevrubný přehled podává Andrejev (1951), na něhož v podrobnostech odkazujeme. Proto uvedeme dále jen základní nebo novější data. Jako samostatná nosologická jednotka v této skupině byla Shopem a spol. (1931) blíže definována t. zv. influenza vepřů (Swine Influenza, Hogflu) vyvolávaná synergickým působením viru vepřové influenzy a Hemofila influenzae suis. Samotný Shopeův virus vyvolává jen prchavé onemocnění, t. zv. „filtrátovou chorobu" *(filtrate disease)*. Waldmann a Köbe popsali v r. 1933 u selat podobnou chorobu, kterou nazvali „chřipka selat" *(Ferkelgrippe)*, jejímž původcem je domněle pneumotropní virus rovněž za spoluúčasti sekundární bakteriální infekce, podmíněné nejčastěji opět H. influenzae suis. Glässer později, když zjistil vnímavost prasat — nikoliv jen selat — bez ohledu na stáří, zavedl málo šťastné označení „Schweinegrippe".

Shopeův kmen viru influenzy prasat byl později velmi podrobně prostudován, byly určeny jeho biologické vlastnosti a zjištěn jeho blízký antigenní vztah k viru lidské influenzy typu A.

Waldmannův a Köbeho kmen, pokud je nám známo z dostupné litera-

* Předneseno na Celostátním pracovním sjezdu mikrobiologické, epidemiologické a hygienické sekce Čs. lékařské spol. J. E. Purkyně 24. 9. 1954 v Mariánských Lázních.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

tury, moderními virologickými methodami studován nebyl a zdá se, že ani není dochován, takže o jeho zařazení jsou jen dohady a popis má více méně historickou cenu.

Guljarani a Beveridge (1951) zjišťovali během epizootií pneumonických chorob prasat v roce 1949—1950 po Spojeném království a v Australii, do jaké míry se Shopeův virus zúčastnil na tehdy probíhajících infekcích dýchacího traktu prasat. K velkému překvapení se jim nepodařilo ani jednou zjistit jako původce virus, který by měl vlastnosti virů skupiny influenza ani isolací, ani serologicky protilátkovou odezvou. Isolovali však jiné filtrabilní agens, vyvolávající chronické pneumonie.

Betts (1952) a Betts-Beveridge (1953) potvrdili tyto nálezy. Podařilo se jim isolovat rovněž virové agens s předchozím asi totožné, a to z onemocnění, které nazvali *Virus Pneumonia of Pigs* (V. P. P.). Tímto virem pokusně vyvolávali rozsáhlé pneumonie. V přirozeně probíhajících onemocněních byla vedle viru zjištěna i sekundární bakteriální infekce (zejména *Pasteurelly*).

Hjärre-Dinter-Bakos (1952) isolovali ve Švédsku z chronických pneumonických procesů jako původce virus t. zv. enzootické pneumonie prasat (Enzootische Pneumonie der Schweine EPS).

A posléze i v USA byla zjištěna virová pneumonie prasat (Virus pneumonia of swine) Fultonem a spol. (1953).

I u nás má výzkum problému „chřipky" prasat starou tradici již od dob Mackových. V poslední době se třem pracovištím podařila isolace virů (Harnach-Hubík-Chvátal, 1950; Hubík, 1952; Čupík-Müller-Pokorný, 1952; Vasil-Neubert-Tirčo, 1954), které měly vlastnosti skupiny influenza. Přehled epizootické situace u nás v chorobách respiračního traktu u prasat, kliniku a pathologicko-anatomické změny popsal výstižně Rossi (1951).

V našem ústavu jsme se s problémem t. zv. „chřipky" prasat setkali v době, kdy nám byla jako výrobní úkol přidělena produkce vakciny BVE 67 (podle prof. Harnacha, 1952) proti t. zv. infekční bronchopneumonii prasat.

Klinické příznaky a pathologicko-anatomické nálezy

S prací o t. zv. „chřipce" prasat jsme započali koncem října 1953, kdy jsme si dovezli materiál z jedné výkrmny v okrese Doksy. T. zv. „chřipka" prasat tam byla stacionární, klinika a postmortální změny zcela odpovídaly popisu Rossiho. Klinicky se „chřipka" projevovala u selat tak, jak ji terénní veterináři velmi dobře znají, t. j. zaostalostí ve vývinu, celkovou sešlostí, postižením dýchadel, oběhu krevního a navíc někdy i nervového systému, což se projevovalo jako náhlé nekoordinované trhavé pohyby, vyskakování do výše, přemety, trvalé stáčení hlavy na jednu stranu, tedy příznaky, které bychom mohli označit jako choreiformní. Největší hynutí bylo zaznamenáno v době odstavu, nebo do třech neděl po odstavu.

Shrnutím morfologických nálezů u jatečných prasat, které jsme měli příležitost vyšetřovat, a u selat později uměle infikovaných se nám podařilo do jisté míry ozřejmit pathologicko-anatomický ráz změn.

Makroskopicky v těchto případech převládal vždy nález na serosách hrudních a břišních orgánů. V počátečních fázích onemocnění pů-

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

sobily změny dojmem difusního hnisavého zánětu pobřišnice, pohrudnice a perikardu; u déle přeživších selat bylo vidět i zřetelné fibrosní ztluštění týchž serosních blan (obr. 1). Někdy nebyl proces na peritoneu a pleurách tak rozsáhlý. Zpravidla však nescházel alespoň mírný fibrinový nález na pouzdru sleziny a jater a na přilehlých kličkách tenkého střeva. Slezina byla v některých případech poněkud zvětšena, lehce tužší, textura na řezu bývala výraznější než obvykle. Játra měla většinou konsistenci sníženou ve smyslu křehkosti. Pokud byly změny na pleurách malé, nejspíše postihovaly mediastinodiafragmatické úseky, a to opět jen jako lehký fibrinosní nálet. Nález v plicích nelze jednoznačně shrnout. Někdy nebyly makroskopicky zřetelné žádné podstatné změny, jindy byly v plíci po různu rozložené okrsky kolapsu, nebo konečně i zřetelná ložiska pneumonické konsolidace, jež se zdála být častější v subpleurální zoně ve ventrálních a mediastinálních úsecích obou plic. Lymfatické uzliny respirační i mesenteriální bývaly často mírně překrvené a snad i poněkud zvětšené. Nejnápadnější býval nález na perikardu, v němž již uvedené zánětlivé projevy nescházely prakticky nikdy, i když byly v různých pozorováních různě intensivní a zřejmě i různě staré. Při déle trvajících onemocněních bývalo zřejmé rozšíření celého perikardu, i když někdy docházelo k zřetelné organisaci exsudátu na povrchu. Srdce samo bývalo lehce rozšířené, zejména pravá komora; k přesvědčivému zbytnění ani k výraznějšímu ochabnutí srdečního svalu nedocházelo. Ostatní blíže neuváděné orgány nevykazovaly zřetelné odchylky od normy.

Mikroskopicky je v nejčasnějším stadiu onemocnění přítomna jen výrazná aktivace a lehká proliferace mesothelií seros s nenápadnou leukocytární příměsí zhusta eosinofilní. Mohli bychom mluvit o mesotheliální fázi onemocnění (obr. 2a).

Brzy však mesothel deskvamuje a zaniká. Dostavuje se silná exsudace fibrinu a leukocytů. Zde by tedy nebylo nesprávné mluvit o fibrinosní nebo hnisavé peritonitidě, resp. pleuritidě a perikarditidě (obr. 2b). Zvláštnost je v tom, že již v časné, exsudativní fázi se zde dostavuje zřetelná fibroplastická reakce ve spodině exsudátu. Můžeme tedy spíše mluvit o kombinované exsudativně fibroplastické fázi onemocnění (obr. 3a, b).

Exsudace fibrinu zanedlouho ubývá, nebo se udržuje jen v drobných ložiscích. Resorpce exudátu se děje novotvořenou, naznačeně granulomatosní tkání z histiocytů. V ložiscích histiocytů bývá v centru nebo v úseku přivráceném k povrchu serosní blány příměs leukocytů. Granulační tkáň pod vrstvou histiocytů se již zřetelně jizví (obr. 3b). V této reparativně fibroplastické fázi procesu bývá značná uzlíčkovitá aktivace buněk retikula ve slezině (obr. 4) i v uzlinách hrudních a břišních. V Giemsově barvení jsou v plasmatu hyperplastických buněk retikula — i mimo ně — nepatrné, sotva viditelné, do modra zbarvené krátké tyčinky, podstatně menší než běžné bakterie.

Přežije-li sele déle, vyrovnává se rychlost povrchového, do jisté míry floridního, exsudativního procesu a rychlost fibroplastického pochodu v hloubce. Tím je umožněno stálé narůstání nových vrstev vaziva, jehož konečným efektem je *kalosní polyserositis* (obr. 5b). Tloušťka vazivového povlaku na serosách může dosáhnout mnoha milimetrů. Navzájem naléhající serosy se často spojí silnými fibrosními srůsty (obr. 5a).

V mozečku byly opakovaně prokázány zřetelné degenerativní změny Purkyňových buněk (obr. 6); méně konstantně byly přítomny alterativní

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

a proliferativně zánětlivé změny v bílé hmotě mozečku a v mesencefalu.

V ostatních orgánech nebyly mikroskopicky zjištěny žádné konstantní ani závažné změny. Pokud byly přítomny změny pneumonické, jevily se nekonstantní a zcela banální katarální bronchopneumonií v malém rozsahu, jež může být jen terminální komplikací, nebo se jevily jako mononukleární reakce v alveolech subpleurální zony; připomínaly atypickou virusovou pneumonii, ale zpravidla je bylo možno vysvětlit přímým přechodem zánětlivého exsudátu z pleury do příslušného intersticia přiléhajícího úseku plíce. Totéž lze říci o tu a tam zastižených zánětlivých změnách v myokardu; zde je přechod z epikardu nepochybný; samostatnou *myocarditis* jsme nikdy nenašli.

Vzhledem k anatomickému obrazu jsme zavedli pro sledované onemocnění pracovní označení *„polyserositis infectiosa"*. Nehledě k negativním nálezům při bakterioskopii vyšetřovaných histologických řezů, je zjištěný způsob tkáňové reakce a šíření se na serosách tak neobvyklé, že jsme pomýšleli na abakteriální etiologii. Nález nepatrných tyčinek v Giemsově barvení byl ex post hodnocen jako významný, vcelku však celá problematika vyřešení etiologie procesu závisela na výsledcích mikrobiogického vyšetření.

Etiologie

Bakteriologické vyšetření kromě občasného nálezu banálních mikrobů s pochybným vztahem k etiologii (stafylokokky, pyocyaneus) vyznělo negativně.

U t. zv. „stájových nákaz", k nimž „chřipka" prasat patří, bývá přikládán etiologický význam hygieně a krmení. Soustředili jsme se proto nejprve na průkaz přenosnosti, t. j. toho, že onemocnění je infekční a reprodukovatelné za čistě laboratorních podmínek, po vyloučení vlivu hygieny a částečně i krmení. Pracovní hypothesou byla pro nás nejprve etiologie virová. Zpracovali jsme proto materiál běžnou virologickou technikou a provedli jsme pokus o primoisolaci viru. K supernatantu orgánové suspense jsme přidali penicilin a po provedení zkoušky sterility jsme jím infikovali pokusná zvířata. Jelikož nám šlo jen o průkaz přenosnosti, museli jsme užít téhož živočišného druhu (t. j. prasete), a abychom si umožnili konání pokusu ve větším měřítku, zavedli jsme jako pokusné laboratorní zvíře ssající sele do jednoho týdne stáří. Abakteriální suspense byla vstřikována intraperitoneálně. Selata reagovala obvykle po inkubaci 4—12 dní po prvé teplotou slabě přes 40° C (diagr. 1). Po poklesu teploty se někdy objevila v dalších dnech druhá fáze teplotní, jindy ke zvýšení teploty ani nedošlo a selata pak chřadla a buď došlo k exitu nebo proces přešel v chronický stav uvedený výše.

Těmito pokusy a dalšími pasážemi jsme dokázali, že jde o infekční chorobu, jejímž vyvolatelem je nebakteriální agens, které samo o sobě, t. j. bez sekundárních činitelů hygieny a krmení je schopno vyvolávat onemocnění charakterisované vyhraněným pathologickým obrazem. Další naše pokusy směřovaly samozřejmě k potvrzení nebo odmítnutí virové etiologie, a to provedením klasického pokusu filtračního. Všechny pokusy o průkaz infektivity filtrátu přes Seitzovy EK vložky dopadly negativně. Tato skutečnost by ještě virovou theorii nevylučovala, neboť je známa celá řada virů, které tímto filtrem neprojdou. Pokusy s filtrátem nás upozornily na zajímavý úkaz, že totiž filtráty sice nedovedly reprodukovat onemocnění s jeho charakteristickým klinickým a anatomickým obrazem, že však do-

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

cházelo někdy k náhlým uhynutím bez obvyklých pathologických změn. Teprve filtrací přes jenské G 5 střední filtry o přibližné porositě 1,2 μ se prokázala infektivita filtrátu.

Při dalších pokusech jsme zjistili, že přídavek streptomycinu silně snižuje nebo vůbec ruší pathogenní účinnost suspense. To již značně otřáslo virusovou pracovní hypothesou a proto jsme provedli další serie pokusů se zřetelem na možnost *rickettsiové etiologie* onemocnění. Šlo nám zejména o vyloučení Q-rickettsiosy. Pathologicko-anatomický obraz s výlučným postižením seros bez podstatnějších změn v plicním parenchymu nedával mnoho naděje této theorii. Avšak na druhé straně posilovala tuto hypothesu ta okolnost, že v době započetí intensivní práce a zvířecích pokusů došlo v naší laboratoři k neobjasněné epidemii všech laboratorních pracovníků i cizích lidí, kteří prošli naší laboratoří za příznaků, typických pro Q-horečku; aureomycin měl přitom promptní therapeutický účinek.

Diagr. 1. Dvojfázová teplotní křivka u selete pokusně infikovaného první amniotickou pasáží kmene „Doksy".

Диагр. 1. Двухфазная темпедатурная кривая у поросенка искусственно инфицированного амниотическим пассажем штамма «Доксы».

Serie slepých pasáží na morčatech však dopadla negativně a stejně negativní byly pokusy o přenos na všechna běžná laboratorní zvířata (králíci, myšky, krysy, křečci, kuřata, kočky).

Současně jsme započali s pokusy o záchyt na kuřecí embrya, a to očkováním na chorio-allantois 11denních, do amnií 13denních a žloutkových vaků 6denních embryí. Embrya na počátku pasáží nejevila zvláštní změny, postupem pasáží se zkracovala jejich životnost, takže většina umírala do 48 hodin. Zkouška infektivity z 1., 5., 7., 9., a 11. pasáže amniotické byla positivní pokusem na seleti, stejně jako ze 3. žloutkové pasáže. Infekční amniová ani allantoidní tekutina neaglutinovala kuřecí erytrocyty. Otiskové preparáty ze žloutkových vaků a z orgánů pokusných selat, barvené podle Macchiavella, ukázaly sice určité intra- i extracelulárně uložené elementy, které však nebyly charakteristicky Macchiavello-positivní. Těmito pokusy byla možnost rickettsiového původu onemocnění prakticky vyloučena.

Vyšli jsme tedy z případů, které byly označeny jako typická „chřipka" prasat a odpovídaly popisu, jak jej uvedl Rossi. Dokázali jsme infekční povahu této nosologické jednotky. Anatomický charakter změn tkání infikovaných selat a dosud zjištěné vlastnostmi původce onemocnění svědčí o zvláštnosti jednotky a dovoluje ji odtrhnout od komplexu t. zv. „chřipky" prasat. Pasážemi za experimentálních podmínek se celé onemocnění nejvíce přiblížilo k obrazu, který upomínal na onemocnění označované v literatuře jako t. zv. *„infekční polyarthritis et serositis fibrinosa"* s tím rozdílem, že v našich případech nikdy nedošlo k žádným arthritidám. Etiologie infekční polyarthritidy a fibrinosní serositidy není podle oficiálních pramenů (Hutyra - Marek, 1952) ještě zcela objasněna; starší theorie o nespecifických činitelích při dopravě (odtud je odvozeno synonymum nemoci — Transportkrankheit) není dosud opuštěna, i když onemocnění má v názvu přídomek „infekční". Glässer (1944) v analogických případech isoloval mikroba, kterého pojmenoval Serosenbacillus a kterého později identifikoval jako Hemofilus suis.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Při konečném rozboru našich nálezů se ukázaly jen dvě možnosti výkladu: buď jde v našich případech o onemocnění totožné s t. zv. Transportkrankheit a pak dosud uváděné etiologické theorie toho onemocnění jsou chybné, nebo jde o novou nosologickou jednotku.

Diskuse

Klinická podoba námi pozorovaného onemocnění s „chřipkou" prasat je nesporná. To, že se nám onemocnění po mikrobiologickém a anatomickém rozboru jeví jinak, svědčí pro značnou komplexnost t. zv. „chřipky" prasat v širším pojetí, jak je užíváno v praxi.

Na XV. mezinárodním veterinárním kongresu ve Stockholmu roku 1953 shrnul a zhodnotil Beveridge (1953) dosavadní znalosti o tomto problému a konstatoval, že prozatím lze podle vyvolavatele rozlišovat dvě velké skupiny:

1. Akutní horečnaté onemocnění o krátkém trvání, způsobené virem influenzy (Shope).

2. Chronické pneumonie s původcem nebo původci (virusy?) přežívajícími dlouho v lézích, jež se špatně hojí, nebo se nehojí vůbec.

Klinické popisy nemocí označovaných jako Ferkelgrippe, Schweinegrippe, Piglet Influenza, Virus Pneumonia of Pigs (V. P. P.), enzootische Pneumonie der Schweine (EPS) a j., i když se v lecčems liší, mají v zásadě mnoho společného a jsou možná jedna a táž nemoc. Bohužel nebylo dosud provedeno srovnání virů isolovaných z těchto chorob, jež by potvrdilo nebo vyvrátilo tuto domněnku.

Jisté je, že Shopeův objev a pokroky ve studiu virů lidské influenzy značně ovlivnily názory na respiratorní choroby vepřů. Ale již v pracích Shopeových bylo zřejmé, že popisy jím studovaného onemocnění nevystihují zcela situaci v terénu, kde velká většina onemocnění dýchacího traktu prasat měla spíše charakter chronický, odlišný od akutního onemocnění, vyvolávaného expirimentálně isolovanými činiteli. Předpoklad, že by Shopeův virus influenzy mohl vyvolávat tak rozsáhlé a hluboké chronické změny plicní, jaké se vyskytují v terénu, nebyl pravděpodobný. Tyto rozdíly mezi experimenty a skutečností byly dlouho předmětem spekulativních úvah a hypothes, snažících se vysvětlovat rozdíl v průběhu choroby, vyvolávané pokusně a po přirozené infekci, hygienickými poměry při chovu, kvantitativními i kvalitativními chybami v krmení a j. a někdy i násilnými domněnkami, aniž byly opřeny o exaktní experimentální práci. Přes všechny nesrovnalosti byly tedy dlouho všechny respiratorní choroby prasat pokládány za různé projevy influenzy.

I práce Waldmanna a Köbeho a j., které nebyly opřeny o přesné virologické vyšetření, předpokládaly, že původce náleží do rámce skupiny virusu influenzy; teprve Betts a Beveridge upozornil jako první na původce, který nemá vlastnosti virů skupiny influenza a je odpovědný za chronické pneumonie, jak je Beveridge (1953) zjišťoval náhodně u prasat téměř po celém světě.

K vyjasnění situace v nomenklatuře uvedených chorobných jednotek lze jen vítat a plně souhlasit s návrhem Hjärre-Dinter-Bakosovým (1951), aby označení *„influenza"* (chřipka) bylo vyhrazeno pouze pro ty případy, u nichž jako vyvolávající činitel byl zcela bezpečně zjištěn virus influenzy. Pro všechna ostatní onemocnění,

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

pokud nebudou přesněji zařaditelná, se doporučuje označení „chřipkovitá" (influenza-like). Stejnou koncepci respiratorních chorob vepřů i stejné názory na tento problém jsme našli u Jelínka (1954) v jeho přednášce na VI. valném shromáždění ČSAZV, což je příslibem, že řešení problému t. zv. „chřipky" vepřů se dostane na správnou základnu a povede k úspěšnému vyřešení.

Zvláštnost infekčního agens isolovaného z našich případů ukazuje, že „chřipkovitá" onemocnění existují, a že se po detailním rozboru mohou jevit od „chřipky" značně odlišně. Domníváme se proto, že naše snaha o odtržení této jednotky z rámce chřipky je oprávněná.

Námi navržené označení onemocnění jako infekční polyserositis je třeba ovšem považovat za provisorní, i když se nám v praxi osvědčilo, protože vyzdvihuje převážnou lokalisaci chorobných změn a odlišuje tak onemocnění postihující převážně respirační trakt.

V našich případech neznáme přirozený způsob přenosu infekce. Vniknutí etiologického agens inhalací nelze vyloučit a snad se první fáze onemocnění skutečně týká převážně plic, což by souhlasilo s tím, že se klinicky podobá „chřipce". Předpokládaná, ale nikterak jistá pneumonická fáze onemocnění by však musela být jen krátkodobá. V dalším průběhu onemocnění převládají změny na serosách a nepochybně tyto změny jsou podkladem vlastního klinického obrazu onemocnění. Cirkulační jevy jistě souvisí s prakticky konstantně přítomnou perikarditidou. Reflektorický útlum dýchacích pohybů z pleuritidy může kardiovaskulární insuficienci dále prohlubovat. Na celkovém stavu výživy se jistě mohou zúčastnit též změny zjišťované na peritoneu. Pathogenesa neurologických příznaků jistě souvisí se zjišťovanými změnami v CNS. O těchto změnách není jisté, jsou-li způsobeny přímo etiologickým agens, nebo námi předpokládaným jeho toxinem. Pro tuto možnost svědčí to, že inframikrobiální filtrát infekčního materiálu nevyvolá onemocnění i při bezpečně zastavené a přezkoušené methodice, ale usmrtí zvíře, jež hyne za příznaků toxického poškození.

Souhlas morfologických nálezů s infekční polyarthritidou a fibrinosní serositidou dokumentuje výše uvedenou komplexnost „chřipky". Pokud jsou naše nálezy identické s nálezy při infekční polyarthritis et serositis fibrinosa, o čemž jsme přesvědčeni, jistě neplatí dotud užívaný výklad pathogenesy a etiologie tohoto onemocnění, protože nespecifické „transportní" činitele jsme u experimentu vyloučili, a přece jsme mohli vyvolat obraz pro „Transportkrankheit" typický a Serosenbacillus, resp. Haemophilus suis nebyl přítomen v infekčním materiálu, kterým jsme mohli infekční polyarthritidu a fibrinosní serositidu vyvolat.

Dokud se ovšem nepodaří přesně identifikovat infekční agens námi pozorovaného „chřipkovitého" onemocnění souhlasného s infekční polyarthritis a fibrinosní serositis, nelze uvedené závěry považovat za definitivní.*

Závěr

Onemocnění vepřů, které se jevilo jako chřipka, bylo sledováno klinicky, pathologicko-anatomicky a mikrobiologicky.

Pathologicko-anatomickým rozborem byla zjištěna podoba s t. zv. infekční polyarthritis et serositis fibrinosa.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Mikrobiologickým a klinickým rozborem byla vyloučena přítomnost etiologických a pathogenetických činitelů, uváděných v literatuře v příčinné souvislost jak s infekční polyarthritis et serositis fibrinosa, tak s „chřipkou" vepřů.

Proto bylo podle převážných pathologicko-anatomických změn navrženo neprejudikující označení onemocnění polyserositis infectiosa, i když identita procesu s infekční polyarthritis et serositis fibrinosa je velmi pravděpodobná, ale dotud uváděná etiologická agens tohoto onemocnění nejsou jeho skutečnými vyvolavateli.

Etiologické agens onemocnění bylo isolováno, ale nebylo dosud identifikováno. Bylo možno zjistit tyto jeho vlastnosti:

1. Nedá se kultivovat běžnou technikou na obvyklých bakteriologických půdách.
2. Prochází skleněnými jenskými filtry G 5 — mitte, avšak neprojde Seitzovými EK filtry.
3. Intraperitoneální injekce abakteriální suspense agens, získaného z postižených orgánů nemocných zvířat, vyvolává u vepřů obraz polyserositidy podobný těm změnám, z kterých bylo isolováno. Tímto způsobem lze agens seriově pasážovat.
4. Běžná laboratorní zvířata nejsou vůči němu citlivá.
5. Agens je necitlivé na penicilin, ale citlivé na streptomycin.
6. Agens lze pěstovat v kuřecích embryích, a to v amniové tekutině a v žloutkovém vaku.
7. Agens lze konservovat zmražením při —20° C nejméně po dobu jednoho měsíce. Byla provedena korelace nálezů klinických, anatomických a mikrobiologických.

Na bližší identifikaci agens a nosologickém zpřesnění onemocnění se dále pracuje.*

Literatura

Andrejev P. N.: Nakažlivé nemoci prasat. Brázda, Praha, 1951. — Betts A. O.: Respiratory diseases of pigs. V. Some clinical and epidemiological aspects of virus pneumonia of pigs. Vet. Rec. 64:283, 1952. — Betts A. O., Beveridge W. I. B.: Virus Pneumonia of Pigs. The effect of the disease upon growth and efficiency of Food Utilisation. Vet. Rec. 65:515, 1953. — Beveridge W. I. B.: Virus Pneumonia of Pigs. Proc. XVth Int. vet. Congr. Stockholm 1953, Part II, 240. — Beveridge W. I. B., Betts A. O.: Virus Pneumonia of Pigs. Proc. XVth Int. vet. Congr. Stockholm 1953, Part I., vol 1, 345-349. — Čupík J., Müller A., Pokorný V.: Chřipka vepřů jako jedna z příčin hynutí selat. Veterinářství 2:91, 1952. — Fulton J. S., Burton A. N., Millar J. L.: Virus Pneumonia in Swine. JAVMA, 123:221, 1953. — Glässer K.: Die Krankheiten des Schweines. M. & H. Schaper, Hannover, 1944. — Gulrajani T. S., Beveridge W. I. B.: Infectious Pneumonia of Pigs. Nature 167; 856, 1951. — Harnach R.: Specifická immunoprofylaxe enzootické bronchopneumonie (chřipky) selat a vepřů virovými a polyvalentními vakcinami. Veterinářství 2:151, 1952. — Harnach R., Hubík R., Chvátal O.: Isolace chřipkových virů v ČSR. Čas. čs. veterinářů 5:289, 1950. — Hjärre A., Dinter Z., Bakos K.: Influensa och influensaliknande sjukdomor hos svin. Proc. of Scand. & Fin. Vet. Conf., Stockholm 10.-11. 8. 1951. Cit. Vet. Bull. 24:1954, Abstr. 1098. — Hjärre A., Dinter Z., Bakos K.: Ver-

* Identifikace etiologického agens jako subbakteriální nevirový mikroorganismus ze skupiny pleuropneumonických borellomycet (L-organismů) byla již provedena a je rozvedena v dalším sdělení.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

gleichende Untersuchungen über eine influenzaähnliche Schweinekrankheit in Schweden und Shopes Schweineinfluenza. Nord. Vet. Med. 4:1025, 1952. — Hubík R.: Isolace a studie domácích virů chřipky vepřů. Spisy Vysoké školy veterinární XXI.; 199, 1952. — Hutyra F., Marek J., Manhiger R., Moczy J.: Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere. IX. vyd. G. Fischer, Jena 1952. — Jelínek V.: Přednáška na VI. valném shromáždění ČSAZV 6.-9. září, 1954; referát: Veterinářství 4:348, 1954. — Köbe K.: Die Aetiologie der Ferkelgrippe (enzootische Pneumonie des Ferkels). Zblt. Bakt. I. Orig. 129:161, 1933. — Lewis P. A., Shope R. E.: Exp. Med. 54:361, 1931. Cit. u Hubík R. (1952). — Rossi L.: Choroby vepřů a jejich tlumení v socialistickém zemědělském výrobním sektoru. Referát na odborném semináři o chovu prasat v červnu 1951 v Brně. Referát: Veterinářství 1:69, 1951. — Shope R. E.: J. Exp. Med. 54:373, 1931 cit. u Hubík R. (1952). — Vasil M., Neubert J., Tirčo Š.: Izolácia kmeňov chrípky ošípaných na Slovensku. Veterinářství 4:235, 1954. — Waldmann O.: Die Aetiologie des Ferkelkümmerns. Die Ferkelgrippe. BTW, 45:693, 1933.

Небактериальные инфекционные заболевания, составляющие комплекс так называемого «гриппа» свиней

I. Изоляция возбудителя, вызывающего инфекционный polyserositis свиней

Заболевание свиней, проявлявшееся в виде гриппа, изучалось клинически, патологическо-анатомически и микробиологически.

Патологическо-анатомическим анализом была установлена схожесть с так называемыми инфекционными polyarthritis et serositis fibrinosa.

Микробиологическим и клиническим анализом было исключено наличие этиологических и патогенетических факторов, которые в письменных материалах приведены в их взаимозависимости, как с инфект. polyarthritis et serositis fibrinosa, так и с «гриппом» свиней.

Non-bacterial Infectious Disease Participating in the Complex of so-called "Influenza" of Swine

I. Isolation of the agent causing infectious polyserositis of pigs*

The disease of pigs, which manifested itself as influenza, has been studied clinically, pathologico-anatomically, and microbiologically. Resemblance has been ascertained by pathologico-anatomic analysis to the so-called infectious polyarthritis et serositis fibrinosa. By way of microbiologic and clinical analysis, the presence of etiologic and pathogenic agents quoted in the literature as causing both infectious polyarthritis et serositis fibrinosa and "influenza" of swine has been excluded.

For this reason unprejudicative designation of the disease is proposed — in accordance with the prevailing pathologico-anatomic changes — as polyarthritis infectiosa, though the identity of the process with infectious polyarthritis et serositis fibrinosa is very probable, the hitherto alleged etiologic agents of this disease, however, being not its real cause.

The etiologic agent of the disease has been isolated but not yet identified; it was, however, possible to ascertain the following of its properties:

1. it cannot be cultivated by the common technique in usual bacteriologic media;

* Delivered at the State working conference of the microbiologic, epidemiologic, and hygienic section of the Czechoslovak Medical Association J. E. Purkynje on September 24th 1954 at Mariánské Lázně.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

2. it passes through Jena glass filters G5-Mitte, yet not through the Seitz EK-filters;

3. intraperitoneal injection of the abacterial suspension of the agent obtained from affected organs of diseased animals develops in pigs a polyserositis syndrome similar to the changes it was isolated from: in this way the agent can be propagated by serial passage;

4. common laboratory animals are not sensitive to it;

5. the agent is insensitive to penicillin, but sensitive to streptomycin;

6. the agent can be cultivated in fertile hen eggs: in the amnionic fluid and yolk sack;

7. the agent can be preserved by freezing at —20° C for at least one month;

The correlation of clinical, anatomic and microbiological findings has been examined.

Work is being continued on further identification of the agent**) as well as on more detailed nosologic qualification of the disease.

**) The identification of the etiologic agent as a subbacterial non-virous microorganism of the group of pleuropneumonic borrelomycetes (L-organism) has been already carried out and is specified in the other communication.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Obr. 1.: Zřetelný fibrinový nálet na epikardu, ztluštění v části odtaženého perikardu, jemné povláčky na povrchu jater a sleziny, špatně patrné srůsty kliček tenkého střeva v sousedství sleziny.

Рис. 1. Ясный фибриновый налет на эпикардии, утолщение в части перикардия, тонкие налеты на поверхности печени, селезенки, малозаметные сросты тонких кишек вблизи селезенки.

Obr. B: Produktivní synovialitis s menšími okrsky dosud trvající fibriosní exsudace na povrchu (×50, ×150).

Рис. В. Продуктивный synovialitis с малыми очагами до сих пор продолжающейся фибринозной экссудации на поверхности (×50, ×150).

Obr. A.: Otiskový preparát kolonií Borrelomycet. Barveno Giemsa, (×200).

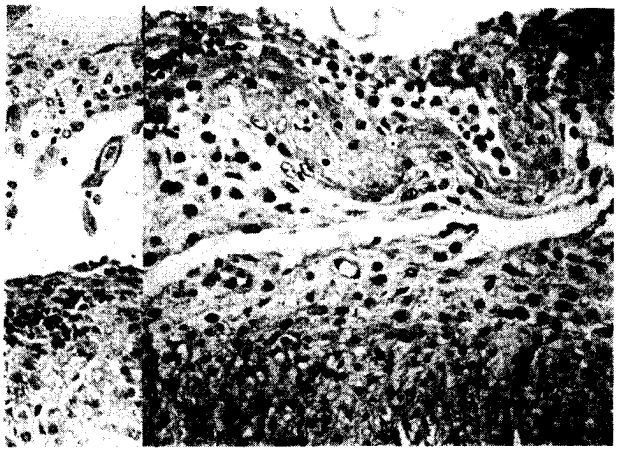
Рис. А. Оттисковый препарат колоний Борелломицетов. Окращено Гимса (×200).

Obr. 6.: Degenerativní změny Purkyňových buněk mozečku (×600).

Рис. 6. Дегенеративные изменения мозжечковых клеток Пуркини (×600).

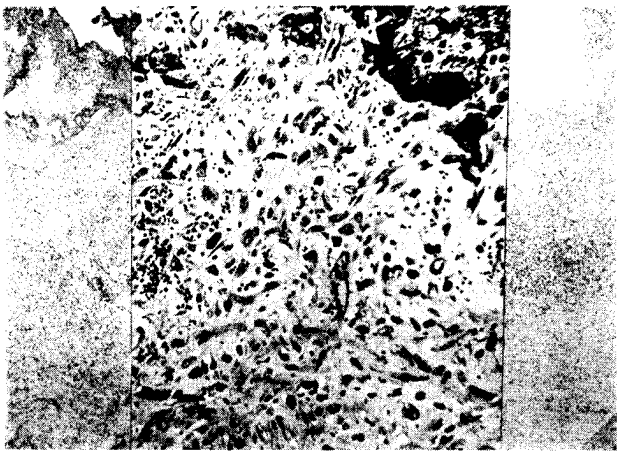
Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2



Obr. 2.: Deskvamace zbytnělého peritoneálního mesothelu a nevýrazná leukocytární exsudace na povrchu jater v časném stadiu onemocnění (a, ×50). Přechodná fáze mesotheliální a silné fimrinosní exsudace s mírnou leukocytární příměsí v epikardu (b, ×300).

Рис. 2. Десквамация ожиревшего перитонеального мезотелия и неясно выраженная лейкоцитарная экссудация на поверхности печени в начальной стадии заболевания (a, ×50). Переходная фаза мезотолиальной и сильно фибринозной экссудации с незначительной лейкоцитарной примесью в эпикардии (b, ×300).



Obr. 3.: Exsudativně fibroplastické stadium perikarditidy. Fibrinosně hnisavá exsudace na povrchu dosud trvá (a, ×50), ale v hloubce je již rozsáhlá vrstva jízvící se granulační tkáně (b, ×300). V pozdější, reparitivní fázi procesu je fibrinu na povrchu již málo, převládají rozpadající se leukocyty, zatím co hlouběji převládá jizvení (c, ×50).

Рис. 3. Экссудативно-фибропластическая стадия перикардия. Фибринозногнойная экссудация на поверхности продолжается до сих пор (a, ×50), но в глубине виден уже широкий слой зарубцовывающейся грануляционной ткани (b, ×300). В более поздней, репаративной фазе процесса фибрина на поверхности уже мало, преобладают распадающиеся лейкоциты, в то время как в глубине преобладает процесс зарубцевания (c, ×50).

Obr. 4.: Organisující se exsudát na povrchu sleziny, uzlíčkovité seskupování buněk RES (×150, ×300).

Рис. 4. Экссудат образующийся на поверхности селезенки, узловатое скопление клеток RES (×150, ×300).

Obr. 5.: Kalosní peritonitis (a, ×40), pleuritis (b, ×50) a perikarditis (c, ×20) v protahované probíhajícím onemocnění.

Рис. 5. Кал. перетонит (a, ×40), плеврит (b, ×150) и перикардит (c, ×20) в прерывисто происходящем заболевании.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

SBORNÍK ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ROČNÍK XXVIII - 1955 - ČÍSLO 2

Identifikace agens vyvolávajícího infekční polyserositis prasat

(Nebakteriální infekční onemocnění zúčastněné na komplexu t. zv. „chřipky" prasat Sdělení II.)

Идентификация возбудителя, вызывающего инфекционный polyserositis свиней (Небактериальные инфекционные заболевания, составляющие комплекс так называемого «гриппа» свиней. Сообщение II)

Identification of the Agent Causing Infectious Polyserositis of Pigs (Non-bacterial infectious disease participating in the complex of so-called "influenza" in swine II.)

F. LÁZNIČKA, B. BEDNÁŘ, J. BOHÁČ, R. DOMBEK
Bioveta n. p., Terezín
I. path.-anat. ústav lékařské fakulty KU v Praze

Došlo dne 8. XII. 1954

V předchozím sdělení (Boháč - Bednář - Láznička - Dombek, 1954) jsme popsali onemocnění prasat patřící do skupiny chřipkovitých procesů, morfologicky shodné s infekční *polyarthritis et serositis fibrinosa*, ale etiologicky od nich odlišné; označili jsme je jako *infekční polyserositis*. Popsali jsme též infekční *agens* onemocnění isolované ze změněných orgánů nemocných vepřů z terénu. Toto agens je nebakteriální a nepatří ani do skupiny rickettsií. Po vyloučení rickettsiového původu, spec. Coxiel, a po zeslabení theorie o virusové etiologii popsané nosologické jednotky zúžily se možnosti při identifikaci původce na skupinu subbakteriálních, ale nevirových mikrobů, patřících do skupiny t. zv. pleuropneumonických organismů (PPO) *(Borrelomycet)*.

Podezření, že PPO mohou být původci infekční polyserositidy, se zakládalo na zjištění citlivosti původce na určitá antibiotika, na jejich morfologii a barevných reakcích v histologických řezech a na chronické povaze změn, které agens vyvolávalo. Všechny tyto vlastnosti souhlasí se známými vlastnostmi některých členů pleuropneumonické skupiny, zejména Sabinova A-organismu asi identického s L_5 — organismem Klienebergerové (Sabin, 1938 a, b, 1939; Findlay et all. 1938). Zjištění praktiků (Kubin, 1953) i výzkumných pracovníků (Börnfors, 1953), že aureomycin má u „chřipek" vepřů therapeutický účinek, rovněž podporuje důvodné podezření, že značná část případů v komplexu t. zv. „chřipek" vepřů je infekční polyserositida a že jejím původcem mohou být PPO.

Pleuropneumonické organismy se staly zvláště v poslední době předmětem intensivního studia sovětských mikrobiologů, a to v souvislosti s problémem filtrovatelných forem mikroorganismů, jak o tom svědčí

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

řada článků a diskusí. (Kalina, 1951, 1953; Kriviskij, 1952; Solncevová, 1953).

Zaměřili jsme proto celou další práci na průkaz těchto organismů v našem vyšetřovaném materiálu.*

Materiál

Abychom zvětšili pravděpodobnost úspěchu při kultivaci PPO, prováděli jsme vyšetřování jednak materiálu z kmene Doksy, studovaného v prvním sdělení, jednak čtyř dalších případů z různých míst v Čechách.

Původ a označení materiálu

„Doksy": Bylo použito materiálu z prasete infikovaného intraperitoneální injekcí tekutiny ze VII. amniotické pasáže infekčního agens z terénu; vepř onemocněl typickou polyserositidou. K vyšetření bylo odebráno: perikardiální tekutina, perikard a fibrinosně změněná pleura.

„Brňany": Materiál byl získán na jatkách z vepře při hromadné likvidaci lotu velkovýkrmny státního statku B. U všech prasat se objevoval prakticky týž anatomický obraz chronických fibrosních až kalosních procesů, zejména na perikardu, který byl veterinářem na jatkách diagnostikován jako „chřipka" prasat. Ke kultivaci bylo použito perikardu a změněných serosních blan. Odděleně byla založena kultivace z bronchiálního hlenu.

„Dušníky": Výchozím materiálem bylo zakrslé kašlající odstávče ze státního statku D., u něhož byla klinicky statkovým veterinářem diagnostikována t. zv. „chřipka" prasat a anatomický nález byl typický pro infekční polyserositidu. Filtrovanou perikardiální tekutinou (jenské střední filtry G 5) byl proveden přenos infekčního agens na ssající selata, z nichž jedno uhynulo za 19 dní. Pitvou byla zjištěna rozsáhlá polyserositis, bronchopneumonie, degenerace jater a katar střev. Ke kultivaci PPO bylo použito perikardu z tohoto selete.

„Kalešov": Na státním statku K. jsme se po prvé setkali s případem změn na kloubech, který nám dokreslil anatomický obraz a podepřel naši theorii o identitě naší infekční polyserositidy s infekční polyarthritis et serositis fibrinosa. Klinicky sele jevilo příznaky těžké arthritidy na všech čtyřech končetinách a bylo zcela neschopno pohybu. Pitvou a histologickým vyšetřením byl zjištěn silně rozvitý obraz infekční polyserositidy a v kloubech velmi intensivní fibrinosně hnisavá synovialitis s tvorbou pannusu na kloubních chrupavkách. Kultivace byla založena jednak ze synovialis a z fibrinových mas, uložených v kloubní dutině, jednak z fibrinosním zánětem postiženého perikardu a pleury.

„Hrdly": prase, z něhož byl získán materiál, bylo jediným chovaným kusem u soukromníka v H. Klinicky byl případ diagnostikován jako migrující rheumatoidní arthritis. Post mortem nebyly zjištěny na vnitřních orgánech žádné výraznější makroskopické změny. Zato v kloubech byla zjištěna zmnožená tekutina s vločkami fibrinu; mikroskopicky změny odpovídaly produktvní synovialitidě (obr. B). Pro kultivaci byla vzata zmnožená synoviální tekutina.

---

* Za zacvičení jednoho z nás (F. L.) do techniky práce s PPO jsme vděčni Dr M. Suchanové a prof. Dr F. Patočkovi z mikrobiologického ústavu LF KU v Praze.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Methodika

Zpracování materiálu pro kultivaci

Pokud byla výchozím materiálem tkáň, byla z ní připravena asi 20% suspense v serovém bujonu. Suspense byla odstřeďována při 3000/min. po 10 min., pak filtrována přes jenské G 5 střední filtry. Pouze v případu materiálu „Dušníky" místo filtrace bylo použito k bakterio-stasi přídavku penicilinu v množství 100 m. j./ml. Takto získaná bujonová suspense byla přímo inkubována. Byla-li výchozím materiálem tekutina, byla vyjasněna pomalu centrifugací a rovněž filtrována kromě případu kloubního punktátu „Hrdly", který byl kultivován bez filtrace a bez přídavku penicilinu. Zpracované výchozí tekutiny byly pro inkubaci ředěny 1:10 v serovém bujonu.

Použité živné půdy byly připraveny podle předpisů užívaných Dr Suchanovou.

Tekutá půda: Základem je bujon z hovězího srdce zmraženého, trypticky trávený, obohacený 8—10 % koňského sera.

Pevná půda: Čokoládový agar je připravován z tekuté půdy bez sera s přísadou 2,5 % agaru a 10 % defibrinované beraní krve, přidávané při 56° C a zahřívané na 100° C, až se krev srazí. Po zchladnutí na 56° C přidá se 8—10 % koňského sera.

Technika kultivace byla velmi podrobně a výstižně popsána Patočkou a Suchanovou (1950). Všechny naše kultivace byly prováděny jimi popsanou technikou t. zv. slepých pasáží tak, že po 48 hodinové inkubaci při 37° C bylo vždy přeočkováno asi 0,5 ml tekuté kultury do další tekuté subkultury a současně provedena kontrola růstu na čokoládovém agaru, inkubovaném ve vlhkém prostředí při 37° C po 24—48 hodin. Charakteristikou růstu v tekutých půdách je velmi slabý mlhovitý zákal a na pevných půdách drobné kolonie vnořené do agaru, jejichž totožnost se ověřuje otiskovým preparátem barveným Giemsou.

Výsledky

Popsanou technikou se nám podařilo ze všech zpracovávaných případů vykultivovat ve 3. nebo 4. subkulkultuře mikroby s vlastnostmi PPO (obr. A). Abychom splnili Kochův postulát a provedli důkaz, že vykultivované agens je příčinným činitelem studovaného onemocnění, provedli jsme intraperitoneální infekci ssajících selat jednotlivými kmeny ze VI. pasáže, a to propranou zahuštěnou 48hodinovou bujonovou kulturou. Ve všech případech se nám podařilo vyvolat u infikovaných selat anatomický obraz analogický tomu, jaký byl u zvířat, z nichž byl materiál ke kultivaci získán. Bylo zajímavé, že původní pouze artritický kmen „Hrdly" dovedl vyvolat vedle změn kloubních (obr. B) i celý obraz infekční polyserosity. Čistě polyserositické kmeny (Doksy, Brňany, Dušníky), které v přirozeném onemocnění nevyvolávaly příznaky artritid, nevyvolávaly kloubní změny ani v experimentální infekci příslušnou kulturou.

U kmene „Brňany" byla provedena adaptace kmene na kuřecí embrya, o čemž bude podána samostatná zpráva.

Další naše práce byla zaměřena ke zjištění, zda PPO, vyvolávající infekční polyserositidu vepřů, jsou samostatným členem této skupiny mikrobů, nebo zda snad nejde o jiný známý druh adaptovaný na vepře. Měli jsme

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

na mysli především hovězí pleuropneumonii a některé hlodavčí kmeny. Abychom vyloučili příbuznost vepřových PPO s Asterococcem mycoides, provedli jsme serii pokusů, při nichž jsme infikovali ve třech skupinách vždy dva hovězí kusy o váze asi 150—200 kg živé váhy 48 hod. promytou zahuštěnou bujonovou kulturou ze VI. pasáže kmene „Brňany", a to dávkami 100 ml intraperitoneálně, resp. 50 ml intravenosně nebo 50 ml subkutánně. Během 30 dní neprojevila zvířata žádných příznaků onemocnění a ani post mortem nebyly makroskopicky zjištěny žádné nápadnější změny.

Vedle hovězích kusů byla zkoušena infektivita zahuštěné proprané bujonové kultury ze VI. pasáže všech pěti isolovaných kmenů pro bílé myšky, a to různými cestami (ic, ip, in). Během 30 dní zůstaly myšky zcela bez jakýchkoliv klinických příznaků a rovněž nebyly zjištěny žádné změny post mortem. Podle tohoto výsledku se zdá, že vepřové PPO nejsou příbuzné ani s původcem hovězí pleuropneumonie, ani s hlodavčím L_5 — organismem a jsou samostatné.

Přes to, že důkaz nového samostatného člena skupiny Borrelomycet není bez serologického vyšetření úplný a že je také u těchto organismů vzhledem k jejich úzké antigenní příbuznosti obtížně proveditelný, domníváme se, že vyvolavatele infekční polyserositis vepřů můžeme považovat za nového člena této skupiny. Domníváme se dále, že lze infekční polyserositis s velkou pravděpodobností považovat za nově a úplně definovanou nosologickou jednotku.

Diskuse

Identifikací agens zachyceného z případů v terénu, označovaných jako t. zv. „chřipka" vepřů, jako příslušníka PPO jsme doplnili naše předchozí sdělení o jeho isolaci. Domníváme se, že se nám tím podařilo oddiferencovat z komplexu t. zv. „chřipek" vepřů nosologickou jednotku, rámcově definovanou v předchozím sdělení. Onemocnění jsme podle pathologicko-anatomického obrazu označili jako polyserositis infectiosa; podle etiologie jí náleží označení *pleuropneumonia suum*. Nejcharakterističtější pathologicko-anatomické nálezy tohoto onemocnění (t. j. *fibrinosní perikarditis, pleuritis* a *peritonitis)* byly dosud připisovány k jiným chorobným jednotkám (na př. plicní forma moru vepřů, nákazy vepřů, chřipka vepřů) nebo popisovány jako samostatná jednotka s jinými etiologickými činiteli (inf. polyarthritis et serositis fibrinosa).

Do jaké míry, pokud jde o kvantitu, je toto onemocnění na t. zv. „chřipce" vepřů účastno, ukáží další naše práce, zejména serologická depistáž v zamořených chovech.

Tento příspěvek je pouze předběžným sdělením o práci prováděné koordinací humánních a veterinárních lékařů, z které mohou vyplynout velmi závažná fakta pro oba obory.

V obecné mikrobiologii má zjištění nového člena skupiny Borellomycet značný význam, protože doplňuje dosud řídkou řadu známých druhů PPO a zvyšuje tak význam naší vědy.

Ve veterinární epizootologii je význam tohoto zjištění ještě pronikavější vzhledem k situaci v chovu vepřového bravu i s poukazem na to, že jde o objevení mikroba, který je blízkým příbuzným obávaného vyvolavatele pleuropneumonie skotu, onemocnění, které bylo tak

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

zhoubné, že si vynutilo vydání zcela zvláštního a vlastně vůbec prvního zákona na tlumení zvířecích nákaz.

Pro humánní medicinu má význam skutečnost laboratorní infekce lidí při práci s tímto vepřovým pathogenem, i když kausálně a epidemiologicky nebyla ověřena. Zároveň je udán směr, kterým se vyšetření podobných případů musí dít, udává i pokusný objekt a snad i event. zdroj podobných infekcí zjištěných u člověka, jak na to upozornil již Doyle et all. (1950). Z těchto infekcí je třeba jmenovat Curshmann-Pickovu polyserositidu a podle Swifta a Browna (1939) i rheumatoidní polyarthritidu, i když zde je problém dosud sporný (Findlay, 1946).

Závěr

Infekční agens isolované z pěti případů onemocnění, definovaného v předchozím sdělení jako infekční polyserositis prasat bylo identifikováno jako pleuropneumonický organismus (PPO) neboli Borrelomyces, či L — organismus.

PPO isolovaný z vepřů není infekční pro skot, bílé myšky ani jiná běžná laboratorní zvířata; zdá se však být infekční pro člověka.

Bylo prokázáno, že arthrotropní PPO isolované z rheumatoidní arthritidy vepře vyvolávají při intraperitoneální pokusné infekci obraz infekční polyserositidy. Tím byla podepřena dříve stanovená theorie o identitě t. zv. infekční polyarthritis et serositis fibrinosa s námi pozorovanou jednotkou, kterou podle zjištěné etiologie lze označit též jako *pleuropneumonia suum*.

Bylo poukázáno na význam identifikace etiologického agens infekční polyserositidy vepřů pro veterinární epizootologii, obecnou mikrobiologii a humánní medicinu.

Literatura

Boháč J., Bednář B., Lázníčka F., Dombek R.: Nebakteriální infekční onemocnění zúčastněné na komplexu t. zv. „chřipky" vepřů. I. Isolace agens vyvolávajícího infekční polyserositis vepřů. — Börnfors S.: Proc. XV.th Int. Vet. Congr., Stockholm 1953, Part II. 239. — Doyle L. P., Andrews F. N., Hutchings L. M.: The Use of Cortisone and ACTH in Rheumatoid Disease in Swine. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. N. Y. 74:373, 1950. — Findlay G. M.: Pleuropneumonia-like organisms and arthritis. Ann. Rheum. Dis. 5:153, 1946. — Findlay G. M., Klieneberger E., MacCallum F. O., Mackenzie R. D.: Rolling Disease. New syndrome in mice associated with a pleuropneumonia-like organism. Lancet, 235:1511, 1938. — Kalina G. P.: Filtrovatelné formy bakterií. Trudy inst. mikrobiologii, 1:45, 1951. — Kalina G. P.: Stadijní vývoj mikrobů. Mikrobiologia, 22:95, 1953. — Kriviskij A. S.: O úloze filtrovatelných forem v biologii mikroorganismů. Mikrobiologia, 21:596, 1952. — Kubin G.: Zur Bekämpfung der Ferkelgrippe. WTM, 40:332, 1953. — Patočka F., Suchanová M.: Borrelomycetaceae a L-organismy. Čas. lék. čes. 89:1463, 1950. — Sabin A. B.: Isolation of a filtrable transmissible agent with „neurolytic" properties from Toxoplasma-infected tissues. Science 88:189, 1938 a). — Sabin A. B.: Identification of the filtrable, transmissible neurolytic agent isolated from Toxoplasma-infected tissue as a new pleuropneumonia-like microbe. Science, 88:575, 1938 b). — Sabin A. B.: Experimental proliferative Arthritis in mice produced by filtrable, pleuropneumonia-like microorganims. Science, 89:228, 1939. — Solncevová L. N.: K metodice studia filtrovatelných

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

forem bakterií. Mikrobiologia, 22:151, 1953. — Swift H. F., McPherson Brown T.: Pathogenic pleuropneumonia-like microorganisms from acute rheumatic exsudates and tissues. Science, 89:271, 1939.

Идентификация возбудителя, вызывающего инфекционный polyserositis свиней

(Небактериальные инфекционные заболевания, составляющие комплекс так называемого «гриппа» свиней. Сообщение II)

Инфекционный возбудитель, изолированный в пяти случаях заболевания, означенный в предыдущем сообщении как инфекционный polyserositis свиней, был идентифицирован как плевропневмонический организм (ППО), или же Borrellomyces, т. е. L-организм.

ППО, изолированный из свиней, не является инфекционным для крупного рогатого скота, белых мышей а также для других обычных лабораторных животных, но возможно, что он является инфекционным для человека.

Было доказано, что артотропный ППО, изолированный из ревматоидного артрита свиней, вызывающий при интраперитонеальной опытной инфекции картину инфекционного polyserositida. Таким образом была подтверждена ранее установленная теория об идентификации так называемого инфекционного polyarthritis et serositis fibrinosa с нами наблюдаемым возбудителем, которого согласно установленной этиологии можно означить также как pleuropneumonia suum.

Было указано на значени идентификации этиологического возбудителя инфекционного polyserositida свиней для ветеринарной эпизоотологии, общей микробиологии и медицины.

Identification of the Agent Causing Infectious Polyserositis of Pigs

(Non-bacterial infectious disease participating in the complex of so-called "influenza" in swine II.)

The infectious agent, isolated from 5 cases of the disease defined in the preceding communication as infectious polyserositis of pigs, has been identified as a pleuropneumonia-like organism (PPLO) or Borrelomyces or L-organism.

The PPLO isolated from pigs is not infective to cattle, albino mice, or other common laboratory animals; it seems, however, to be infective to man.

It has been proved that arthrotropic PPLO's isolated from rheumatoid arthritis of pigs on experimental intraperitoneal infection produce the syndrome of infectious polyserositis. Herewith the previously put up theory has been confirmed of the identity of the so-called infectious polyarthritis et serositis fibrinosa with the unit studied by us which, according to the etiology ascertained, may be denoted also as pleuropneumonia suum.

The importance is pointed out of the identification of the etiologic agent of pig polyserositis for veterinary epizootology, general microbiology, and human medicine.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

VETERINÁRSKY ČASOPIS

SLOVENSKEJ AKADÉMIE VIED

ROČNÍK III, ČÍSLO 2—3
1954

SEPARÁTNY VÝTLAČOK

VYDÁVA
VYDAVATEĽSTVO SLOVENSKEJ AKADÉMIE VIED
BRATISLAVA

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

G. PETR, J. BOHÁČ

REKONVALESCENTNÍ A HYPERIMMUNNÍ HOVĚZÍ SERA U SLINTAVKY A KULHAVKY

I. BRDIČKOVA FILTRÁTOVÁ REAKCE

Ve snaze vypracovat pomocné metody při sledovaní výroby hyperimmunního sera proti slintavce a kulhavce jsme se zabývali sledováním Brdičkovy filtrátové reakce. Jak známo, Brdičkova filtrátová reakce dochází v medicině širokého uplatnění a provádí se běžně ve všech větších nemocnicích. Bylo zjištěno, že i u některých infekčních chorob dochází k charakteristické změně bílkovinné dvojvlny. Tak M. L. Crossley a spol. (1941) zjistili, že psů infikovaných kulturou I pneumokokka, nastává hned po infekci nápadný vzrůst vlny, které se postupně snižuje a asi po dvou dnech se vrací na normál. J. Berman a Polák (1950) studovali Brdičkovu reakci při infekční hepatitidě. I. H. Müller (1950) užil polarografické analysy likvoru k diagnose poliomyelitidy.

Poněvadž jsme měli k disposici hojně pokusného materiálu, rozhodli jsme se věnovat se tomuto problému poněkud důkladněji, abychom si učinili obraz o chování Brdičkovy filtrátové reakce během celého imunisačního procesu.

Materiál a metodika

K pokusům bylo užito zdravých, dosud slintavku neprodělavších volů, živé váhy 600—800 kg, stáří více než 2 roky. Krev byla odebíraná do suchých, sterilních nádob a po sražení bylo serum odděleno od koláče centrifugací. Část sera byla pak uchována v lednici při 1—3° C, zbytek rozplněn do 10 ml ampulek a uložen pri —30° C v mrazícím pultě. Při zpracování ser postupováno podle následujícího schematu:

a) Brdičkova filtrátová reakce celého sera: K 0,4 ml sera se za pokojové teploty přidá 1 ml 0,1 n KOH a po promíchání se nechá 45 minut stát. Pak se přidá 1 ml 20% kyseliny sulfosalicylové, protřepe se a po 10 min. se vysrážané serové bílkoviny oddělí tvrzeným filtrem. K 0,4 ml čiřeho filtrátu se přidají 4 ml Brdičkovy kobaltité soluce (0,001 mol chlorid hexamokobaltitý v 0,1 n NH_4Cl a 1 n NH_3) a polarografuje se v otevřené nádobce od 0,8 V a při citlivosti 1/100.

b) Brdičkova filtrátová reakce albuminů: K 1 ml sera se přidá 1 ml nasyceného ammoniumsulfátu (vytemperovaného na stejnou teplotu) a k 0,6 ml odfiltrovaných albuminů se přidá 1 ml 0,1 n KOH a po promíchání se nechá 45 minut stát. Pak se přidá 1 ml 20% kyseliny sulfosalicylové, pro-

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

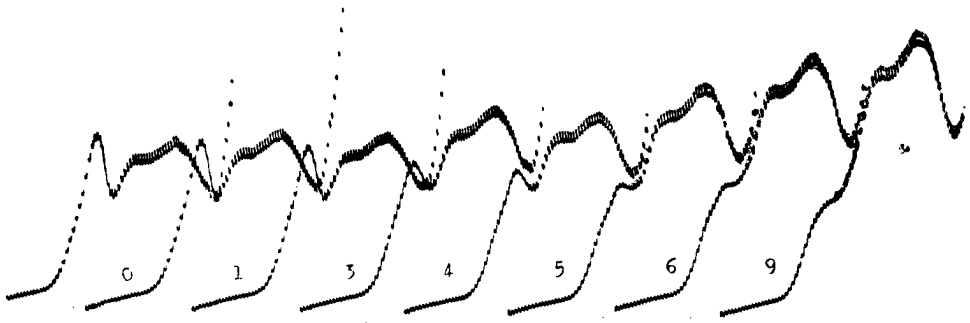
Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2
třepe se a po 10 minutách se vysrážený albumin odfiltruje. K 0,4 ml čírého filtrátu se přidají 4 ml Brdičkovy soluce a polarografuje se v otevřené nádobce od 0,8 V a při citlivosti 1/100.

Část pokusná

Zvířatům, která byla určena k vlastnímu pokusu, byla odebírána krev několik dní před infekcí (1., 2. a 4. den před infekcí), aby byla zachycena průměrná výška vlny, která pak sloužila jako základ pro další stanovení. Pak byly kusy vystaveny kontaktní infekci viru slintavky a kulhavky typu „A" Vallée a na krvi, odebírané téměř v každodenních intervalech a zpracované shora uvedeným způsobem, byla provedena Brdičkova filtrátová reakce. Klinický průběh onemocnění byl vesměs velmi těžký kromě zvířete č. 6. 23 dní po této infekci pak byla provedena vakcinace, a to 100 ml 1% vakciny typu „O" Vallée subkutánně do laloku. Protože nám šlo o tom, abychom mohli zpracovat více ser najednou a tím získali srozumitelnější výsledky, část ser jsme polarografovali hned po odběru a tytéž vzorky pak najednou po 14 i více dnech. Neshledali jsme žádných rozdílů, takže jsme mohli polarografovat vždy více odběru najednou (obr. 1 a 2), což mělo význam zejména při provádění filtrátové reakce u albuminů, kde bylo alespoň možno zachovat stejné pokusné podmínky.

A. Brdičkova filtrátová reakce u ser

Na obr. 1 jsou uvedeny polarografické záznamy Brdičkovy filtrátové reakce ser jednoho zvířete (č. 67) při různých odběrech po infekci, kde je patrna stoupající tendence výšky dvojvlny. Obr. 2 pak ukazuje totéž u albuminů.



Obr. 1. Polarografické záznamy Brdičkovy filtrátové reakce u sera zvířete č. 67 při různých odběrech po infekci. (Čísla u jednotlivých křivek značí počet dní po infekci.) Citl. 1/100; 4 V akum.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Výsledky, kterých bylo dosaženo u části pokusných zvířat při polarografickém sledování ser po infekci i vakcinaci, jsou shrnuty v tabulce 1 a 2. Ze zajímavých případů bylo vybráno č. 6, které bylo původně považováno za zvíře s „čistou minulostí", ale později se prokázalo jako již předtím vakcinované. Vyznačuje se také úplně odlišným polarografickým chováním. U ostatních zvířat vidíme nápadný vzrůst výšky dvojvlny již 3. den po infekci, dosahující maxima 6.—9. dne po infekci; odtud nastává pomalý

Tabulka 1

Sledování filtrátové Brdičkovy reakce u ser během immunisace proti viru slintavky a kulhavky po infekci Vallée „A" typem

Dní po infekci	Zvíře č.							
	2	8	15	27	67	69	66	6
	Výška vlny v mm							
Průměr zdravých	17	17	17	17,5	19	18	16	17
1	23	22	20	23	21	21	19	15
3	26,5	26,5	24	24,5	26	25	22	15
4	30	28	26	25	27	26	25	15
5	30	33	27	26	33	25	26,5	17
6	32	33	32	30,5	39	32	32	18
8	17	32	26	15	—	30	26	26
9	32	36	29	30	45	28	28	19
10	31	33	26,5	28,5	43	26	29,5	16,5
11	26	33	26	31	40	25	29	16,5
12	25	31,5	25,5	27	36	25	27,5	16,5
13	25	31	25	28	35,5	24	25	16
15	23,5	30	24	28	30	20	24	16
16	23,5	28	22,5	23	27	20	26	16
17	23	28	22	22	25	19	22,5	16
18	22	23	22	20	23	20	22	16,5
19	22	23	22	20	23	18	23	15
20	20	21,5	19	19,5	19	18	22	16,5
22	19	19	18	19	17	18	19	16,5
23	18	19	18	19	16,5	18	18,5	17

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Tabulka 2

Sledování filtrátové Brdičkovy reakce u ser během immunisace proti viru slintavky a kulhavky po vakcinaci Vallée „O" typem

Dní po 1. infekci	Dní po vakcinaci	Zvíře č.						
		2	8	27	67	69	66	6
		výška vlny v mm						
23	0	18	19	19	16,5	18	18,5	17
24	1	19,5	18,5	21	18	22,5	18	17
25	2	21,5	18,5	22,5	17	19	18	17
26	3	21	19	21	17	19,5	19	16,5
27	4	18	18	19	17	20	17,5	16
29	6	18,5	18	20	15	19,5	17	16,5
31	8	18	15	19,5	14,5	18	17	17
32	9	17,5	16	19,5	15	20	18	17
33	10	18,5	15,5	20,5	15,5	20	18,5	16,5
34	11	18,5	15,5	19,5	16	20	18,5	15,5
36	13	19	14,5	18	16	20	18	16
37	14	—	14,5	18	16	20	—	17
38	15	18,5	14	16,5	15,5	18	18,5	17
39	16	18,5	13,5	16,5	15,5	18,5	18,5	16,5
40	17	16	13,5	18,5	16	18	18,5	17
41	18	15	—	18,5	15	17,5	18,5	15,5
45	22	15,5	14	18,5	15,5	17,5	18	16,5
47	24	15,5	14	19	15	—	17,5	16,5
48	25	—	—	18,5	—	18,5	—	16,5
50	27	15	13,5	18,5	14,5	—	18	16

pokles a 22.—23. dne po infekci se výška vlny prakticky vrátila na původní hladinu. Výjimku tu činí již zmíněné zvíře č. 6, kde se výška vlny během imunisace spíše snižuje a pouze 6.—9. dne po infekci jeví znatelné maximum. Druhou výjimkou je zvíře č. 66, kde během 17.—22. dne po infekci vzniká druhé maximum (obr. 3). Srovnáním s klinickými protokoly jsme zjistili, že zvíře jevilo v této době aftosní a ulcerosní změny na paznehtech, na něž bylo léčeno.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

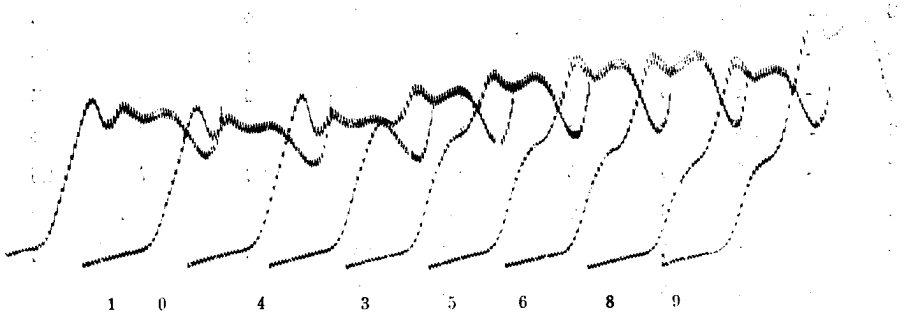
Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Na tab. 2 uvedené výsledky nám jednoznačně ukazují, že *vakcinace, provedená po předchozí infekci jiným typem, nemá žádného anebo jen velmi nepatrného efektu na charakteristiku vlny při filtrátové reakci.* Zjistili jsme pouze v několika málo případech nepatrné zvýšení vlny, které mnohdy leželo v mezích experimentálních chyb, a to 1.—3. den po vakcinaci. Jinak zůstávala výška vlny konstantní po dalších několik týdnů.

Abychom si učinili představu o chování filtrátové vlny během celého immunisačního procesu, sestavili jsme získané výsledky v graf, kde jsme na osu x nanášeli počet dní po infekci, resp. po vakcinaci a na pořadnici výšky vlny v mm. Získali jsme tím ucelený obraz, na kterém jasně vynikají příslušná maxima. Takové sestavení je znázorněno na př. na obr. 3 u zvířete č. 66 a na obr. 4 u zvířete č. 2.

B. Brdičkova filtrátová reakce u albuminů

Podobně jako u celých ser jsme sledovali filtrátovou Brdičkovu reakci u albuminů.



Obr. 2. Polarografické záznamy Brdličkovy filtrátové reakce u albumínů zvířete č. 67 při různych odběrech po infekci. (Čísla u jednotlivých křivek značí počet dní po infekti. Citl. 1/100; 4 V akum.

Poměry u albuminů zůstávají podobné jako tomu bylo u celých ser. I zde dochází k náhlemu vzrůstu vlny, dosahujícího maxima mezi 6.—9. dnem po infekci, odtud pak výška vlny pomalu klesá, i když v době vakcinace, t. j. 23. den po infekci, zůstává stále značně vyšší než výška vlny zdravých jedinců. Po vakcinaci však dochází k nápadnějšímu tvoření maxima a hodnoty, blížící se hodnotám zdravých jedinců, je dosaženo teprve po 10—12 dnech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 3.

I zde si můžeme získané hodnoty vyjádřit graficky tak, jak je uvedeno u zvířete č. 66 na obr. 3 a u zvířete č. 2 na obr. 4. Vidíme zde celkovou shodu mezi albuminy a celým serem. Pouze výškové rozdíly jsou u albuminů mnohem nápadnější, čili maxima jsou výraznější.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Tabulka 3

Sledování filtrátové Brdičkovy reakce u albuminů během immunisace proti viru slintavky a kulhavky po infekci Vallée „A" typem a vakcinaci Vallée „O" typem

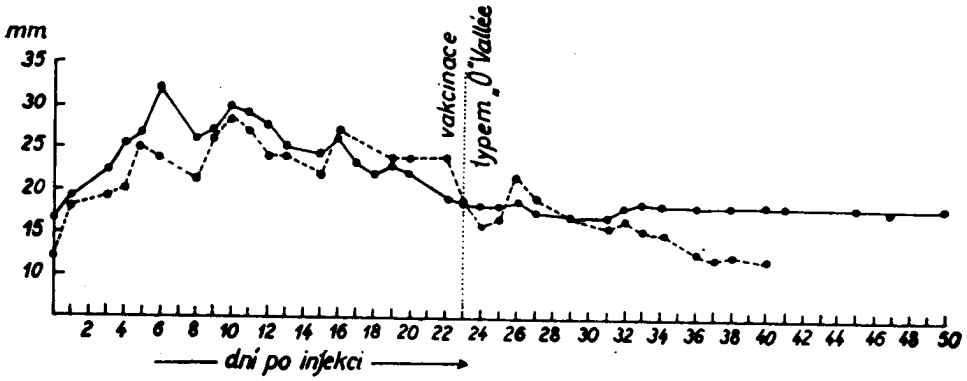
Dní po infekci	Dní po vakcinaci	Zvíře č.							
		2	8	27	67	69	66	6	15
		Výška vlny v mm							
Průměr zdravých	—	13	10	13	13	14	12	8	13
1	—	18	26	19	16	14	18	8	19
3	—	26	32	—	22	15	19	8	24
4	—	27	35	20	24	17	20	8	26
5	—	34	40	22	25	18	25	8,5	27
6	—	29	12	29,5	28	22	24	9	29
8	—	33	33	12	27	30	21	21	22
9	—	35	34	35	40	26	26	11	28
10	—	30	33	30	34,5	24	29	—	31
11	—	24	33	32	39	21	27	7	31
12	—	23,5	29	29	33,5	21	24	7	30
13	—	26	28	31	30	21	24	5	29
15	—	24	28	24,5	30	21	22	5	26
16	—	24	27	26	22	18	27	6	24
17	—	25	25	25	19	23	23	7	25
18	—	22	26	19	24,5	18	26	7,5	23
19	—	24	23	20	25,5	16	24	7,5	22
20	—	25	24	20	21,5	17	24	8	23
22	—	21	24	20	12,5	15	24	8	21
23	—	14	20	20	12	15	19	7,5	18
24	1	15	20	21	8,5	15	16	7,5	—
25	2	17,5	21	23,5	8	16	17	7,5	—
26	3	19	12,5	16	13,5	18	22	6,5	—
27	4	17	13,5	18	13	18	19	11	—
29	6	17	17	26,5	14	21,5	17	10,5	—
31	8	14,5	18	23,5	13	19	16	10,5	—
32	9	15	16	22	10	12,5	16,5	10	—
33	10	9	16	22	10,5	12,5	15,5	10	—
34	11	8,5	15,5	22	9,5	10,5	15	9,5	—
36	13	7,5	9	13,5	9,5	10	12,5	9,5	

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

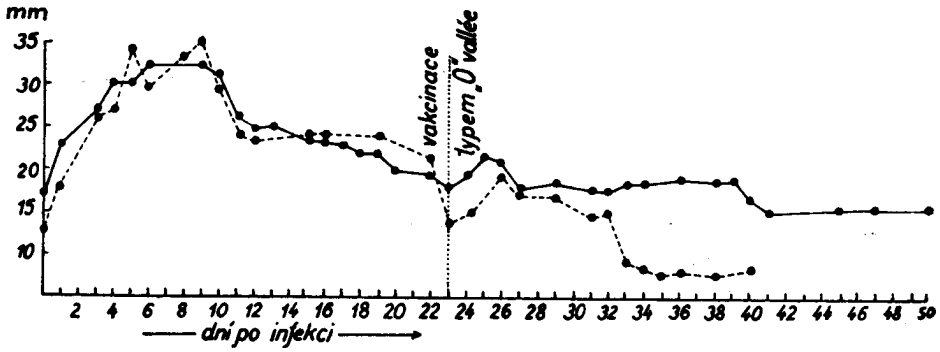
Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Diskuse

Na základě získaných výsledků můžeme říci, že Brdičkova filtrátová reakce prokazuje při sledování immunisačního procesu po infekci virem slintavky a kulhavky cennou službu. Již 3. den po infekci dochází k nápadnějšímu vzrůstu výšky vlny, dosahujícího maxima 6.—9. dne, na čež na-



Obr. 3.Chování Brdičkovy filtrátové reakce u zvířete č. 66 v průběhu 50 dní po infekci. (Na pořadnici nanášena výška druhé vlny v mm.)
o———o Brdičkova reakce u ser;
o— — — —o Brdičkova reakce u albuminů.



Obr. 4. Chování Brdičkovy filtrátové reakce u zvířete č. 2 v průběhu 50 dní po infekci. (Na pořadnici nanášena výška druhé vlny v mm.)
o———o Brdičkova reakce u ser;
o— — — —o Brdičkova reakce u albuminů.

stává pomalé snižování a asi 3 neděle po infekci se výška vlny vrací na normální hodnoty. Ještě kontrastnější průběh mají albuminy, kde jsou za daných podmínek výškové rozdíly mnohem nápadnější a maximální hodnoty bývají zpravidla 2 až 3-krát vyšší než hodnoty normální (u ser maximální hodnoty bývají zpravidla 2-krát vyšší).

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Vakcinace po předchozí infekci jiným typem naproti tomu nemá značnějšího vlivu na výšku filtrátové vlny. U ser lze pouze občas pozorovat nepatrné zvýšení, která je opět nápadnější a trvalejší u albuminů.

Poněvadž pokus o sledování filtrátové reakce u globulinů ztroskotal — po srážení kyselinou sulfosalicylovou nám filtrát nedával žádný polarografický efekt — a protože chování sera i albuminů sleduje přibližně tutéž křivku, je jasné, že látky, zodpovědné za Brdičkovu reakci, zůstávají při polovičním nasycení ammoniumsulfátem v supernatantu.

Jak nejnovější výzkumy naznačují, tvoří podstatu Brdičkovy filtrátové reakce mukoproteiny. Dochází tedy při zvýšení obsahu mukoproteinů ke zvýšení dvojvlny. Tento fakt nás zaujal tím spíše, že současné sledování ser komplement-fixačním testem poukázalo na zaujímavou shodu: u mnoha ser, kde se nám projevilo maximální zvýšení dvojvlny, byl test fixace komplementu velmi zřetelný. Zdá se tedy, že by mohl existovat určitý vztah mezi mukoproteiny v Brdičkove filtrátové reakci a mezi komplement-fixačnými látkami. Tento vztah chceme pokusně blíže prozkoumat.

Význam Brdičkovy filtrátové reakce při sledování výroby hyperimmunního sera tkví v tom, že, jak jsme se na mnoha případech přesvědčili, lze tímto způsobem odlišit po infekci zvířata předtím vakcinovaná nebo immunní proti témuž typu, kterým jsme infikovali a že můžeme podle výšky vlny vedle zdravotního stavu usuzovat, nedošlo-li během immunisačního procesu ke druhotné nákaze jiným typem.

Souhrn

Sledována Brdičkova filtrátová reakce u ser a albuminů během immunisačního procesu proti viru slintavky a kulhavky. K nápadnému zvýšení vlny dochází již 3. den po infekci, dosahujícího maxima mezi 6.—9. dnem po infekci, na čež pomalu klesá. Následující vakcinace odlišným typem viru nemá značnějšího vlivu na další změny ve výšce vlny. Filtrátová reakce albuminové frakce, získané z těchže vzorků sera ammoniumsulfátovou frakcionací, sleduje prakticky tutéž křivku jako filtrátová reakce u ser, což by poukazovalo na to, že látky, zodpovědné za Brdičkovu filtrátovou reakci, jsou uloženy v albuminové frakci sera při polovičním nasycení ammoniumsulfátem.

II. POLAROGRAFICKÉ SLEDOVÁNÍ ALBUMINŮ

Při studiu chování bílkovinných frakcí během immunisace skotu proti viru slintavky a kulhavky jsme stáli před úkolem zabývat se sledováním albuminové frakce. Velké množství pokusného materiálu nás nutilo hledat

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

rychlou metodu, kterou by se dal zpracovat značný počet vzorků současně. Pokusili jsme se tento úkol zvládnout polarograficky.

Chování bílkovinných frakcí během immunisace je již známo. Na základě poznatků, získaných hlavně elektroforeticky, možno říci, že během immunisace v celku dochází ke snižování albuminů a zvyšování globulinů, při čemž vznikající protilátky jsou převážně vázány na frakci gamma-globulinovou. U viru slintavky a kulhavky se tímto problémem zabýval P. Wehmeyer (1960). Jeho výsledky se však omezují pouze na 21. den po vakcinaci, takže zachycují pouze malý výsek celého immunisačního pochodu. Podle tohoto autora se změna v koncentraci albuminů u skotu 3 týdny po vakcinaci pohybuje od —0,67 do +0,89%.

Nás však v souvislosti se sledováním Brdičkovy filtrátové reakce (viď I. část) a sledováním celkových bílkovin sera také zajímalo, jak se chovají albuminy a globuliny (především gamma-globuliny) přímo po infekci živým virem a po následující vakcinaci, poněvadž jsme po infekci předpokládali mnohem silnější odraz v chování bílkovinných frakcí než po vakcinaci, kdy nastává pomalé uvolňování antigenu a tím i pomalá reakce těla. Chtěli jsme také zjistit, kdy vlastně počíná pokles albuminů a zda tento souvisí se zvyšovaním gamma-globulinů.

Cílem celé práce bylo osvětlení dynamiky immunitní odpovědi organismu na vniklý antigen. V této části pak si chceme povšimnout chování albuminů při immunisačních pochodech v organismu zvířat, určených k výrobě hyperimmunního sera proti viru slintavky a kulhavky.

Materiál a metodika

Pracovali jsme s tímtéž materiálem, jak uvedeno ve zprávě předešlé (I). Z velké skupiny volů, určených k výrobě hyperimunního sera proti viru slintavky a kulhavky, bylo vybráno 12 dosud slintavku neprodělavších kusů. Krev byla odebírána do sterilních nádob a serum uchováno jednak v lednici při 1—3° C, jednak v mrazícím pultě při —30° C. Vzorky krve byly odebírány několik dní (4., 2. a 1. den) před infekcí, aby mohlo být zachyceno kolísání normálních hodnot.

Infekce byla kontaktní Vallée „A" typem a 23 dní potom provedena vakcinace Vallée „O" typem.

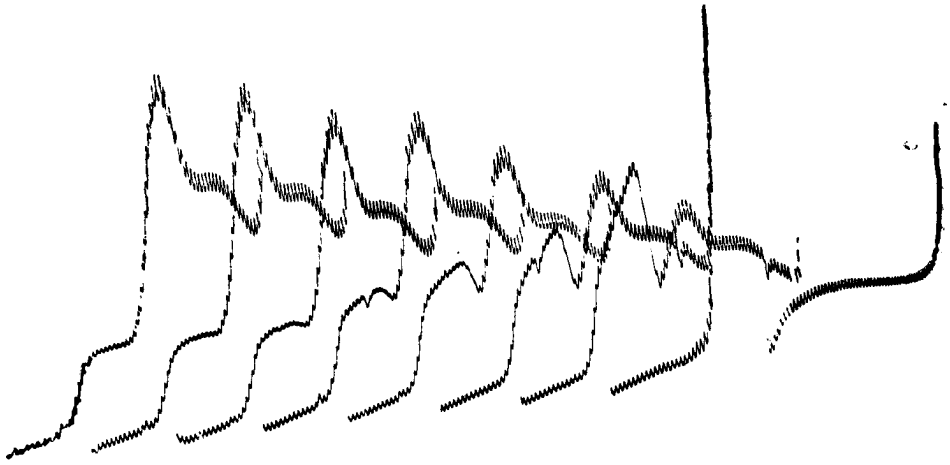
K polarografickému sledování albuminů jsme použili vlastní metodiky: K 1 ml při pokojové teplotě vytemperovaného sera se přidá 1 ml destilované vody a 2 ml stejně teplého ammoniumsulfátu. Vzniklá sraženina se od-

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

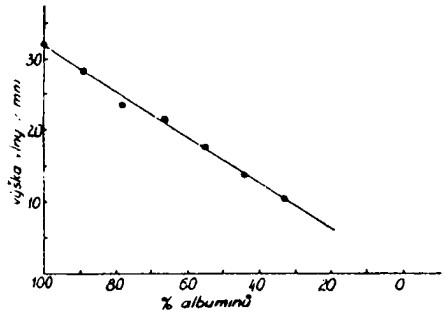
Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

filtruje modrou páskou; 0,5 ml filtrátu se zředí na 5 ml vodou. K 0,4 ml tohoto zředěného roztoku albuminů se přidá 3,6 ml Brdičkovy kobaltité soluce (0,001 mol chlorid hexamokobaltitý v 0,1 n NH_4Cl a 1 n NH_3) a polarografuje se v otevřené nádobce se rtutí na dně od 0,8 V při citlivosti 1/150 a 4 V akumulátoru.

Abychom mohli posoudit očekávanou klesající tendenci albuminů, sestavili jsme si kalibrační křivku (obr. 1a a 1b).



Obr. 1 a. Polarogram, znázorňující závislost výšky vlny na koncentraci albuminů v daném rozmezí. Citl. 1/150; 4 V akum.



Obr. 1 b. Kalibrační křivka albuminů.

První křivka na obr. 1a značí průměrnou křivku albuminů před infekcí. Ostatní křivky pak znázorňují postupně ředěné albuminy vychozí, a to tak, že každá další křivka znamená obsah albuminů o 11% nižší než předcházející. Poslední křivka značí polarografickou vlnu pouhé Brdičkovy soluce, kde místo albuminů byla přidána destilovaná voda. Změřením výšek vln dostaneme závislost mezi výškou vlny a koncentrací albuminů, která je zachycena v grafu na obr. 1b. Vidíme, že průběh kalibrační křivky je v mezích uvažované koncentrace lineární.

Můžeme si tedy na základě změřené výšky vlny vypočítat procento albuminů vzhledem k obsahu albuminů u zvířete před infekcí, rovnajícím

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

se 100%. Vypočítaná procenta albuminů byla občas kontrolována biuretovou metodou.

Tuto kalibrační křivku jsme zhotovili u každého sera zvláště, takže jsme mohli velmi snadno sledovat relativní obsah albuminů během immunisace.

Výsledky

Původně jsme zpracovávali každé serum hned po odběru, později jsme se však uchýlili ke zpracovávání více vzorků najednou. Dosáhli jsme nejen těchže hodnot, ale výsledky byly zpravidla lépe reprodukovatelné, protože společné jejich zpracování za stejných podmínek vyloučilo nebo uvedlo na stejnou míru případné experimentální chyby.

Výsledky, získané systematickým průzkumem ser po dobu 60 dní po infekci, jsou z části uvedeny v tabulce 1. K prvnímu znatelnému poklesu hladiny albuminů dochází 5. dne po infekci. 6. dne jsme zjistili u všech ser již pouze 85—90% původní hladiny. Odtud pokles stále pokračuje až do 16. až 19. dne po infekci, kdy jsme zjistili minimální koncentraci albuminů, t. j. 63—75% původního množství. Hladina albuminů se pak pomalu zvyšuje a u mnoha sledovaných ser má vakcinace odlišným typem, provedená 23. dne po infekci, pouze malý vliv na navrácení se původní hladiny albuminů. (Obnovení původní koncentrace přichází u zvířete č. 69 již 36. dne po infekci, t. j. 13. den po vakcinaci.) U většiny zvířat se však hladina albuminů zvyšuje velmi pomalu. Tak 31. den po infekci, t. j. 8. den po vakcinaci, činí koncentrace albuminů pouze 71—78%. 40. den po infekci, t. j. 17. den po vakcinaci se pohybuje kolem 90%. Původní koncentrace však u většiny ser nebylo dosaženo ani na konci pokusného období, t. j. 60 dní po infekci, neboli 37 dní po vakcinaci. U zvířete č. 67 dokonce 60 dní po infekci činí hladina albuminů stále pouze 77%. Zdá se, že v tomto případě se vliv vakcinace i infekce projevil nejvíce. (Tomu nasvědčují i serologické reakce a stanovení titru dotyčného sera.)

Zcela odlišně se chovalo zvíře č. 6, které bylo před infekcí již vakcinováno. Po infekci dochází ke snižování hladiny albuminů rovněž 5. dne, ale snižování je tu velmi nepatrné a dosahuje 17.—19. dne po infekci jen asi 88%. Tento nález se shoduje se sledováním Brdičkovy filtrátové reakce u tohoto zvířete, která rovněž vykazovala naprosto odlišný průběh.

Grafické vyjádření chování hladiny albuminů během imunisace po infekci Vallée „A" typem a následující vakcinaci Vallée „O" typem je znázorněno na obr. 2 u zvířete č. 8, které vykazuje průměrný a plynulý průběh

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Tabulka 1

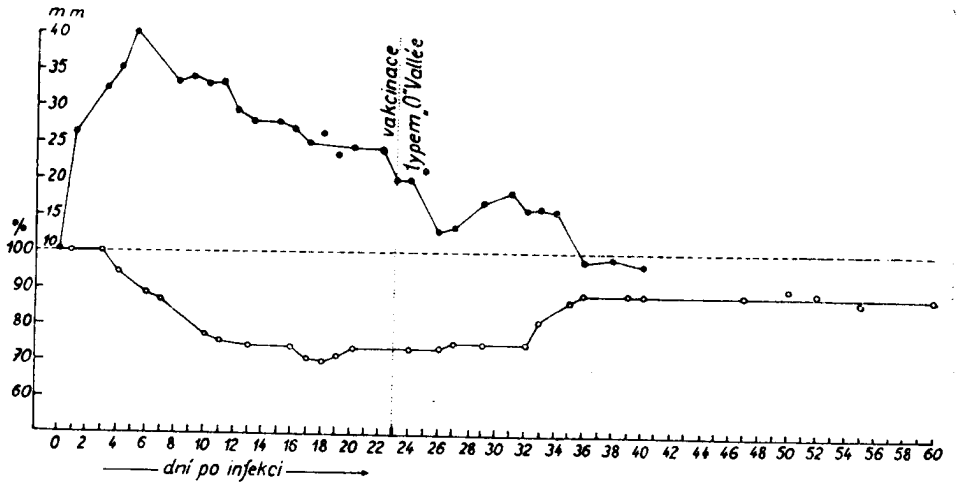
Polarografické sledování albuminů u ser během immunisace proti viru slintavky a kulhavky

Dní po infekci	Zvíře č. 69		8		27		66		67	
	Výška vlny mm	% alb.	Výška vlny mm	% alb.	Výška vlny mm	% alb.	Výška vlny mm	% alb.	Výška vlny mm	% alb.
0	40,5	100	38	100	40,5	100	38	100	38	100
1	40,5		38		40		36		38	
3	39		38		40		38		39	
4	40		36	95	—		—		38	
5	38	94	35,5		39	96	33	87	36	95
6	36	88	34	89	35,5	87	31,5	84	35,5	93
7	36		33	87	35,5		31		31,5	84
9	33,5	82	—		33	80	—		31	82
10	—		29,5	77	—		29	76	—	
12	33		29		33		28,5		29	76
13	31,5	76	28	74	—		26,5	70	29	
15	30,5	74	30,5		31,5		23,5	62	—	
16	30,5		28	74	30,5		23		27	71
17	29	70	27	71	29	70	23	60	25	67
18	29,5		26,5	70	28	67	25	67	24	63
19	29		27		28		26,5	70	24	
20	—		28	74	—		—		24	
21	32	78	—		28		29		26,5	70
24	34		28		29	70	—		27	
26	—		28		—		28	74	28,5	
27	33	80	29	76	30,5	74	—		28	74
29	33		29		30		28		30,5	
31	36	88	29		31		27		29	76
32	—		29		33	80	—		—	
33	38	93	31	82	33		30,5	80	29	76
35	38		33	87	33,5		30		29	
36	41	100	34	89	34	83	33,5	87	30,5	80
37	39,5		34		—		—		31	
39	40,5		34		34,5		36		—	
40	—		34,5		—		37		29	76
41	41		—		35		33	87	—	
47	40		34		34		34		29	
50	39		35,5		36	87	35	91	29,5	
52	—		35	91	—		—		29	
55	42		33		38,5	95	36	93	28	
60	40,5		34		38		36		29	

albuminové křivky. Pro porovnání je uvedena také křivka Brdičkovy filtrátové reakce u albuminů u téhož zvířete, aby byl lépe vystižen její naprosto odlišný průběh od křivky, znázorňující celkovou koncentraci albuminů.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2



Obr. 2. Chování albuminové frakce sera zvířete č. 8 během 60 dní po infekci. Hřejší křivka značí průběh Brdičkovy filtrátové reakce u albuminů u téhož zvířete. (U Brdičkovy reakce na pořadnici udána výška druhé vlny v mm, ualbuminů výška vlny přepočtena na procenta.)

Souhrn

Stanoven polarografický způsob sledování albuminové frakce sera během immunisace proti viru slintavky a kulhavky.

Během immunisace proti Vallée „A" typu viru slinavky a kulhavky dochází k poklesu albuminů již 5. dne po infekci a dosahuje maxima 16.—19. dne po infekci, kdy koncentrace albuminů činí 65—72% původního množství. Chování hladiny albuminů po následující vakcinaci Vallée „O" typem není již tak výrazné a k dalšímu poklesu nedochází. Ke konci pokusného období, t. j. 60 dní po infekci, činí koncentrace albuminů průměrně 90% původního množství.

III. POLAROGRAFICKÉ SLEDOVÁNÍ GAMMA-GLOBULINŮ

V předchozích sděleních jsme se zabývali sledováním Brdičkovy reakce a hladiny albuminů během immunisace proti viru slintavky a kulhavky. Další cíl naší práce byl pokus o sledování gamma-globulinové frakce, která je nejvýraznějším činitelem immunisačního procesu. Dosavadní způsob sledování hladiny gamma-globulinů bylo stanovení elektroforetické, buď Tiseliovým aparátem nebo elektroforesou na papíře. Abychom však mohli provádět seriová vyšetření tak velkého množství materiálu, pokusili jsme se o nový rychlejší způsob vyhodnocování gamma-globulinové frakce. Vyšli jsme při tom ze 2 českých metod, které nám dávaly předpoklad jedno-

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

duché a rychlé isolace gamma-globulinů. Vlastní stanovení gamma-globulinů jsme se pokusili provádět polarograficky.

Sledováním γ-globulinů a tím imunitní odpovědi v hovězích serech po infekci virem slintavky a kulhavky se zabýval P. Wehmeyer (1950). Jeho elektroforetická šetření však v sobě zahrňují pouze několik málo pokusných dat z doby před vakcinací a 3 neděle po ní. Uvádí, že zvýšení obsahu gamma-globulinů 3 neděle po vakcinaci se pohybuje mezi od —0,12 do +1,33%. Velmi podobným vyšetřením hovězích ser před, během i po infekci virem slintavky a kulhavky se zabývali ve výzkumném ústavu v Pirbrightu Bradish, Brooksby a Henderson (1952). V jejich práci, která nám je bohužel nedostupná, bylo provedeno přes 700 analys ser od 80 kusů skotu. Litujeme, že nemůžeme provést srovnání výsledků anglických autorů s výsledky našich, jiným způsobem a nezávisle konaných pokusů.

Materiál

Použito téhož materiálu jako v předchozích sděleních. Rovněž postup při odběru krve a uchovávání sera byl tentýž. Infekce jako předtím byla kontaktní Vallée „A" typem a 23 dní na to byla zvířata vakcinována Vallée „O" typem.

Metodika

K isolaci gamma-globulinů jsme použili dvojí metodiky: metody, udávané J. Hořejším (1952) a natrium sulfátové metody tak, jak ji popisuje A. Heyrovský a J. Sochorová (1953). Zprvu jsme zpracovávali sera rivanolovou metodou Hořejšího, která ač se zdála dávat obdobné výsledky jako metoda natrium sulfátová, byla provozně nevýhodnější, takže jsme později pracovali pouze metodou druhou.

Do centrifugační zkumavky se napipetuje 0,5 ml zkoušeného sera přidá se 9,5 ml 15,5% natrium sulfátu, opatrně promíchá a nechá se stát v thermostatu při 37° C 2—3 hodiny, na čež se vypadlý gamma-globulin odcentrifuguje.

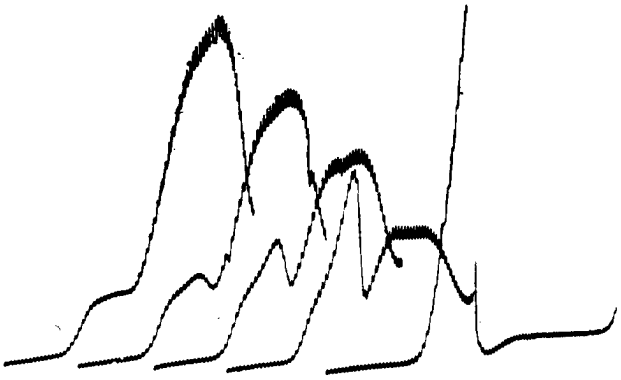
Vlastní stanovení gamma-globulinů jsme prováděli polarograficky: odcentrifugovaný gamma-globulin jsme rozpustili v 10 ml n/100 NaOH. Odtud 1 ml jsme doplnili na 5 ml fysiologickým roztokem. K 0,4 ml tohoto zředěného roztoku gamma-globulinů jsme přidali 3,6 ml Brdičkovy kobaltité soluce (0,001 mol chlorid hexamokobaltitý v 0,1 n NH_4Cl a 1 n NH_3) a polarografovali od 0,8 V při citlivosti 1/150 a 4 V akumulátoru.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

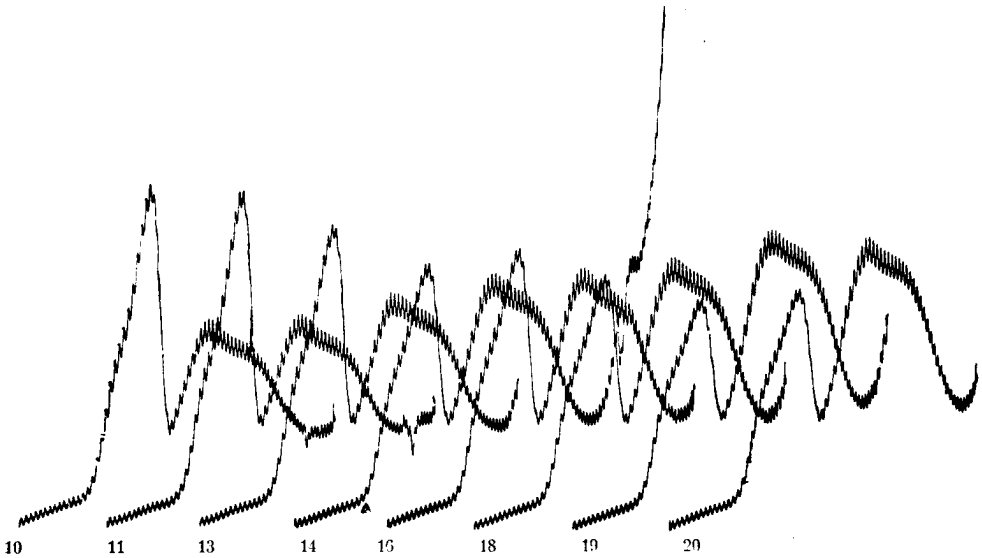
Hodnocení jsme prováděli podle kalibrační křivky, kterou jsme zhotovili pro každé serum zvláště (obr. 1).

Jak z obr. 1 vyplývá, v mezích zkoušené koncentrace je vztah mezi koncentrací gamma-globulinu a výškou vlny (byla měřena vždy výška druhé vlny) lineární. Křivka č. 1 na obr. 1 značí polarografickou křivku gamma-globulinů zvířete č. 67 těsně před infekcí. Křivka č. 2 představuje dvojnásobné, křivka č. 3 trojnásobné a křivka č. 4 čtyrnásobné množství gamma-globulinů. Křivka č. 5 pak značí polarografickou křivku prázdného roztoku, kde místo bílkovin byla přidána voda.



Obr. 1. Kalibrační křivka, znázorňující závislos výšky vlny na koncentraci gamma-globulinu v daném rozmezí. Citl. 1/150; 4 V akum.

Podobně jako u albuminů (viz předchozí sdělení), tedy i zde si můžeme přepočítat výšku vlny na procenta a získat tím přibližný relativní obsah gamma-globulinů ve zkoušených serech během imunisace vzhledem k ob-



Obr. 2. Polarografické záznamy gamma-globulinové dvojvlny u sera zvířete č. 27 při různych odběrech po infekci. (Čísla u jednotlivých křivek značí počet dní po infekci.)

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

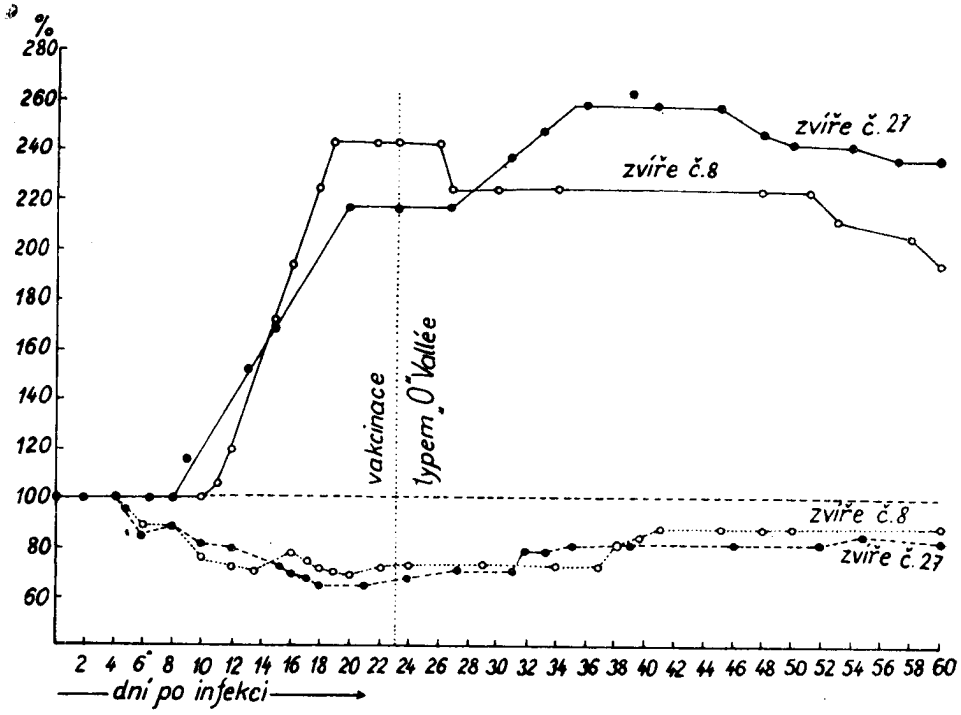
Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

sahu gamma-globulinů v seru zvířete před infekcí, rovnajícímu se 100%.

Tímto způsobem jsme zpracovávali denně 60—70 vzorků sera, při čemž bylo celkem zpracováno 530 vzorků u 12 zvířat. Ukázka několika stanovení je uvedena na obr. 2, kde je zachycen prudký vzestup hladiny gamma-globulinů od 10. do 20. dne po infekci.

Výsledky

Immunitní odpověď skotů na infekci virem slintavky a kulhavky je v chování gamma-globulinové frakce velmi výrazná. Nepřihlížíme-li k tomu, že hladina globulinů u zvířat před infekci značně kolísá a vycházíme-li z předpokladu, že normální hodnota gamma-globulinů u zvířete těsně před infekcí je rovna 100%, pak můžeme zaznamenat první vzestup 8.—11. dne



Obr. 3. Chování gamma-globulinové frakce sera u zvířete č. 27 a č. 8 během 60 dní po infekci v porovnání s albuminovou frakcí u těchže zvířat. Výška vlny přepočítána na procento bílkovin. ——— gamma-globulinová frakce sera; ——— albuminová frakce sera.

po infekci. Hladina v dalších 10 dnech velmi prudce stoupá a dosahuje maxima 18.—19. dne po infekci, na čež zůstává po určitou dobu konstantní. To vlastně odpovídá době, kdy je již zvíře immunní a která je v literatuře udávána jako 3. neděle po infekci. V této době, t. j. 23. dne po infekci,

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Tabulka 1

Dní po infekci (vakcinaci)	Zvíře č. 8		27		66		67		69	
	Výška vlny	% γ-glob.	Výška vlny	% γ-glob.	Výška vlny	% γ-glob.	Výška vlny	% γ-glob.	Výška vlny	% γ-glob.
0	26		20,5	100	26		24	100	23	100
1	26,5		20,5		—		22		22	
3	25,5		23,5		28	100	26		25	
4	25,5		21		27		23		23	
5	26		19,5		25		23,5		24	
6	23,5		22		29		24		23	
8	25		21		28		23,5		22	
9	25,5	100	23	113	29		24		26	
10	24		22	110	31	117	25		22	
11	26,5		23,5		35		26,5	113	23	
12	28,5	119	28,5	146	33	128	28,5	128	25	113
13	26,5		32	170	—		35	169	27	125
15	37	175	—		33,5		37	181	29	138
16	41	200	32,5		41		33		28	
17	42	206	—		39,5	164	38		32	156
18	46	230	—		39		42	212	33	
19	49	250	36	190	41	178	42		30	
20	49		41	223	—		37		35	175
22	49		41		44	200	42		36	181
23 (0)	50		41		45		40	200	37	
24 (1)	49		43		49		40		37	
25 (2)	47		40		39		40		35	
26 (3)	49	250	36		44	200	51	269	36	
27 (4)	46	230	42		43		51		36	
29 (6)	46		39		47	217	54	288	36	181
31 (8)	44		45	250	50	236	48	250	31	
32 (9)	45		42		48		60	325	28	
33(10)	48		47	262	50		—		34	168
34(11)	46	230	49	275	—		60		34	
36(13)	46		46		50		62	337	36	181
37(14)	47	236	51		49	230	52	275	37	
38(15)	42		48		45		50	262	33	162
39(16)	46	230	49	275	49	230	45	231	32	156
40(17)	42		48	269	49	230	45		32	
41(18)	44		48		44	200	44	226	33	162
45(22)	46	230	47		43	193	42		33	
47(24)	47	236	48	269	43		44	226	32	
48(25)	47		44		43		44		33	
51(28)	46	230	45	250	—		46		35	175
53(30)	44	219	45		44		42	212	35	
55(32)	43	213	46		40		44		32	
58(35)	40		46		41	180	41		36	181
60(37)	41	200	45	250	41	180	42	212	36	181

jsme prováděli vakcinaci Vallée „O" typem. Zjistili jsme tu zajímavý zjev: část zvířat reagovala na vakcinaci odlišným typem v tom smyslu, že asi 3.—6. den po vakcinaci došlo k dalšímu zvýšení hladiny gamma-globulinů,

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2
dosahujícího maxima 9.—13. dne po vakcinaci a dříve či později se vracejícího na hodnotu před vakcinací, kdežto u druhé skupiny vakcinace neměla prakticky žádného vlivu na pohyb hladiny gamma-globulinů, ba dokonce v té době docházelo k částečnému snížení. To se nápadně shoduje s nálezy P. Wehmeyera (1950), který v některých případech zjistil po vakcinaci hodnoty gamma-globulinů nižší než před vakcinací a v jiných případech opět značně vyšší. Část typických výsledků je uvedena v tab. 1.

Na tab. 1 je v mnohých případech udáno vedle výšky vlny i procento gamma-globulinů, které jsme odvodili na základě kalibrační křivky. Získali jsme tím možnost porovnání zvýšení hladiny gamma-globulinů se snížením albuminů Učinili jsme tak na obr. 3.

Diskuse

Obranná reakce těla zvířete proti vzniknuvší nákaze virem slintavky a kulhavky se nejvíce odráží v chování gamma-globulinů. Pokud jsme oprávněni na základě změřené výšky globulinové vlny stanovit i relativní obsah gamma-globulinů v procentech, zjišťujeme, že vzestup hladiny gamma-globulinů, který počíná 8.—11. dne a dosahuje maxima asi 3 neděle po infekci, činí 190—230% (vztaženo k obsahu gamma-globulinů těsně před infekcí, rovnajícím se 100%). Pokud má pak vakcinace vliv na další vzestup gamma-globulinové hladiny, docházíme v době 29—32 dní po infekci, t. j. 6—9 dní po vakcinaci, k hodnotám 240—320%. Tento mohutný vzestup gamma-globulinové hladiny si lze vysvětlit urychlenou tvorbou protilátek, které jsou zpravidla gamma-globulinové povahy. Je však třeba zjistit, zda stoupající obsah gamma-globulinů je přímo úměrný obsahu protilátek. K tomu nám může sloužit průběh sero-neutralisační reakce, sledované u těchže zvířat a během téhož období i průběh nepřímého komplement-fixačního testu za použití gamma-globulinové frakce místo sera. Pokusy v tomto směru probíhají a budou shrnuty v dalším sdělení.

Souhrn

Sledováno chování hladiny gamma-globulinů během immunisace proti viru slintavky a kulhavky. Gamma-globuliny, vysolené 15,5% natrium sulfátem, byly stanoveny polarograficky.

Vzestup gamma-globulinové hladiny počíná 8.—11. dne po infekci a dosahuje maxima asi 3 neděle po infekci. Následující vakcinace odlišným typem, provedená 23 dní po infekci, u části zvířat nemá značnějšího vlivu na další pohyb gamma-globulinové hladiny. U ostatních zvířat způsobuje

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

další vzrůst, dosahující maxima 29—32 dní po infekci, t. j. 6—9 dní po vakcinaci.

Immunisace sledována po 60 dní po infekci u 12 zvířat a provedeno celkem 530 stanovení gamma-globulinů.

8. VIII. 1953

Bioveta, n. p.,
Terezín

LITERATURA

I

Berman J., Polák B., 1950: Čas. lék. čes. 89, 195.
Crossley M. L. a spol., 1941: J. Lab. Clin. Med. 27, 213.
Müller O. H., 1950: Fed. Proc. 9, č. 1.

II

Wehmeyer P., 1950: Revue d'Immunol. 14, 57.

III

Bradish, Brooksby, Henderson: cit. dle I. A. Galloway; 1952: Brit. Agric. Bull., 5/20.
Heyrovský A., Sochorová J., 1953: Čas. lék. čes. 92, 619.
Hořejší J., 1952: Čas. lék. čes. 91, 704.
Wehmeyer P., 1950: Revue d'Immunol. 14, 57.

G. PETR, R. DOMBEK

REKONVALESCENTNÍ A HYPERIMMUNNÍ HOVĚZÍ SERA U SLINTAVKY A KULHAVKY

IV. SLEDOVÁNÍ CELKOVÝCH SEROVÝCH BÍLKOVIN

Při polarografickém zpracování bílkovinných složek krvního sera během immunisace proti viru slintavky a kulhavky v předchozích sděleních jsme se zabývali (G. Petr, J. Boháč) sledováním Brdičkovy reakce, hladiny albuminů a hladiny gamma-globulinů. K doplnění otázky, týkající se reakce těla na vniknuvší antigen, nám zbývalo vyřešit chování celkových bílkovin sera během immunisace.

Polarograficky jsme tento problém zpracovávat nechtěli, abychom nedošli k mylným závěrům. Je známo, že albuminy dávají pri stejné koncentraci vyšší vlnu než globuliny. Tak K. Gawalowski a B. A. Gosman (1932) udávají poměr výšky vlny albuminů ke globulinům 48:28, J. Homolka (1953) opět 45,5:20. Protože, jak jsme se přesvědčili, obě složky

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

během immunisace velmi silně kolísají, považovali jsme za málo slibné užít polarografické metody ke sledování celkových bílkovin sera během immunisačního procesu. Uchýlili jsme se tedy ke známé Cu-sulfátové metodě stanovení bílkovin v krevním seru.

Podobným problémem se zabýval P. Wehmeyer (1949), který však určoval hladinu serových bílkovin před vakcinací různým typem viru slintavky a kulhavky a 3 neděle po ní. Uvádí, že 3 neděle po vakcinaci se zvyšuje hladina serových bílkovin o 0,33 až 0,76% podle množství injikovaných ml vakciny.

Materiál a methody

Materiálu jsme použili téhož jako v předchozích sděleních. Ke stanovení obsahu serových bílkovin jsme použili Cu-sulfátové metody tak, jak ji popisují E. Reith (1949) a P. P. Astanin (1951). Tato metoda, dávající uspokojující výsledky (H. Major, 1951), je velmi jednoduchá, nevyžaduje žádných přístrojů a je při tom velmi rychlá, takže se dá zpracovat denně více než 100 vzorků.

Výsledky

Na pohyb celkových serových bílkovin během immunisace proti viru slintavky a kulhavky můžeme usoudit již podle chování hladiny albuminů a gamma-globulinů.

Na tab. 1 uvedené výsledky naznačují, že k poklesu serových bílkovin dochází zpravidla 5.—7. den po infekci, tedy shodně s albuminy. Pokles trvá až do 10.—15. dne po infekci, na čež nastává opětné stoupání. Je to lehce pochopitelné, přihlédneme-li k chování albuminů a gamma-globulinů. Ač pokles albuminů stále trvá, gamma-globuliny, které počínají stoupat, stoupají mnohem rychleji, takže křivka serových bílkovin má tendenci stoupající. V době, kdy je již zvíře proti infekci virem slintavky a kulhavky immunní, t. j. asi 3 neděle po infekci, a kdy se gamma-globuliny ustalují na určité hodnotě, nastává i stagnace hladiny serových bílkovin. Podobně je tomu i v pozdějším stadiu pokusu, takže vlastně hladina serových bílkovin je nadále v závislosti na kocentraci gamma-globulinů. Proto i u těch zvířat, kde po vakcinaci dochází k dalšímu vzrůstu gamma-globulinů, zvyšuje se i hladina serových bílkovin (v době nejvyššího vzrůstu gamma-globulinů činí hladina serových bílkovin až 118% původní koncentrace) a u těch zvířat, kde vakcinace nemá prakticky žádného vlivu na pohyb

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

SBORNÍK
ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

Separátní výtisk

ČSAZV

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

SBORNÍK ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
VETERINÁRNÍ MEDICINA ROČNÍK XXIX - 1956 - ČÍSLO 4

Myxomatosa. Isolace a kultivace virusu

Миксоматоз. Изоляция и культивирование вируса

Myxomatosis — Isolation and Cultivation of Its Virus

Die Myxomatose. Isolation und Züchtung des Virus.

MVDr Rudolf HUBÍK, prom. vet. lékař Eduard JIRAN
Bioveta, n. p., Terezín

Došlo dne 13. 1. 1956

Rychlé rozšiřování myxomatosy v evropských zemích vyvolává vzrůstající zájem veterinárních odborníků o toto onemocnění. Dokumentuje to stále větší počet prací, které se zabývají problémy této choroby.

U nás na myxomatosu upozornil v r. 1953 Nižňanský (16). Kraus (14) objasnil v témže roce problémy diagnostiky, šíření a prevence této nákazy, což bylo uplatněno ve vyhlášce ministerstva zemědělství č. 59 z r. 1954 a její první výskyt zaznamenali Blažek a Král (2) v r. 1954.

Holmes (12) zařazuje původce myxomatosy do čeledě *Borreliotaceae*, rodu *Molitor*. Je to skupina virusů, které vyvolávají choroby s charakteristickou proliferací tkáně bez tvorby vesikul a pustul. Zástupci tohoto rodu byli zjištěni u člověka, skotu, psů, drůbeže a králíků. Králíky postihuje *Molitor gingivalis* (původce orální papilomatosy), *Molitor sylvilagi* (původce papilomatosy) a *Molitor myxomae* (původce myxomatosy), který je označován jako klasický myxomový virus.

Fenner (7) zařazuje virus myxomu a virus fibromu do skupiny neštovičných virusů, od nichž se podle jeho údajů liší jenom citlivostí k ethyletheru.

Gratzl (11) označuje myxomatosu za nejnebezpečnější formu ze tří infekčních králičích nádorů (infekční papilom, fibrom a myxom).

Na virus myxomatosy jsou velmi citliví evropští domácí a divocí králíci z rodu *Oryctolagus*, u nichž vzniká generalisované onemocnění s vysokou mortalitou (až 99,5 %). Původním hostitelem a přirozeným reservoárem virusu je však americký divoký králík, rodu *Sylvilagus*, u něhož myxomatosa probíhá jako chronické onemocnění [Aragao, (cit. podle 11), Bergey (12), Gratzl (11) a j.].

Polní zajíc, *Lepus europeus*, byl do nedávna pokládán za refrakterního. Již ve Francii byly však zjištěny případy onemocnění zajíců a zdařily se též umělé infekce. Podle Gratzla (11) nepůsobí zatím myxomatosa u zajíců větší počet uhynutí než asi 1 %.

Kromě králíků není citlivé žádné jiné laboratorní zvíře. Thiery (cit. podle 11) se pokusil infikovat ssající bílé myšky a morčata, a to i s použitím folikulinu, progesteronu a kortisonu; nedosáhl však nikdy positivních výsledků.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

V poslední době se zdařilo seriově pasážovat virus v mozku jednodenních bílých myšek. Avšak ani po 30 pasážích virus nezískal pathogenitu pro bílé myšky, ale udržel si původní virulenci pro králíky (Andrewes, Harisijades 1955, 1).

Člověk je pro virus myxomatosy nevnímavý. Jsou popisovány jen záněty spojivek, uváděné v souvislosti s virusem myxomatosy [Ramon (19), Bergey (12) a j.].

Přenos nemoci není dosud objasněn do všech podrobností. Fenner, Woodroofe (10) zdůrazňují vysokou infekciositu virusu a poukazují na to, že k smrtelnému onemocnění králíků stačí již jediná částečka virusu. Kontaktní infekce, kterou lze však prokázat až ve stadiu generalisace, není výhradným způsobem přenosu.

Velký význam je připisován zvláště hmyzu. Mnozí autoři, jako Bull, Ratcliffe a Edgar (4), Aragao (cit. podle 11), Button (cit. podle 11) a j. tvrdí, že nelze očekávat epizootické rozšíření myxomatosy bez pomoci hmyzu. Přenos se děje čistě mechanickou kontaminací sosáků virusem z kožních změn [Fenner, Woodroofe (10)]. V úvahu přichází dále ptactvo a též člověk jakožto možný pasivní rozšiřovatel. Rovněž i infikovaným krmivem lze nemoc přenést.

Po infekci proniká virus z místa inokulace do regionální mízní uzliny. Malé množství virusu lze v ní prokázat již za 48 hodin p. i. Za dalších 24 hodin nebo i dříve se virus nalézá ve většině orgánů a na krevních buňkách. V krevní plasmě nebyl virus nikdy prokázán [Fenner, Woodroofe (10), Houlihan a McLawson (cit. podle 21)]. V nosním sekretu je virus nejdříve za 72 hodin, a to jen v nevelké koncentraci. Výkaly a močí se virus nevylučuje [Houlihan a McLawson (cit. podle 21)]. V nádorových změnách na hlavě, genitáliích a jinde je virus přítomen ve velkém množství.

Elementární tělíska virusu myxomu se velikostí, tvarem i vnitřní stavbou podobají virusu vakciny [Fenner (7), Bang, Balls, Jansen (cit. podle 7)]. Elektronovým mikroskopem byla stanovena jejich velikost na 286 × 233 mμ [Ruska a Kausche, Farrant a Fenner (7)].

Virus lze konservovat zmražením, vysušením a 50% glycerinem (Jacotot a Vallée cit. podle 11). Nekonservovaná celá krev v pasteurových pipetách zůstává infekční po 40 dní, oxalátová krev po 50 dní. Při teplotě 8—10° C vydrží nejméně 3 měsíce.

Virus prochází Berkefeldovým filtrem *V* a *N*, neprochází filtrem Chamberlandovým L_5 a L_7. Není schopen aglutinovat červené krvinky (Fenner, 7).

Virus lze pěstovat v tkáňových kulturách a na kuřecích a kachních embryích (Haagen, DuDscheng-Hsing, 1938 a mnoho jiných). Množí se nejlépe, je-li embryo inkubováno při teplotě 35° C a je-li ochlazeno po dobu 18 hodin před inokulací nebo po ní na teplotu 25° C.

Fenner, Marschal a Woodroofe (9) zjistili, že australští králíci, kteří se uzdravili z myxomatosy, mají v krvi protilátky, které lze prokázat vazbou komplementu a neutralisačním testem po dobu více než 18 měsíců po uzdravení. Signifikantní vzestup neutralisačních protilátek se objevuje desátý den *p. i.* a stoupá až do 14. dne. Komplementfixační protilátky se objevují kolem 11. dne *p. i.* a stoupají do vysokého titru až do 28. dne. Titr neutralisačních protilátek se po dlouhou dobu téměř nemění, zatím co titr komplementfixačních protilátek nejprve prudce klesá a pak zůstává po dlouhou dobu na stejné výši.

U zvířat, která nepřežijí infekci, se začínají vytvářet neutralisační protilátky těsně před smrtí a komplementfixační protilátky se nevytvářejí vůbec (Fenner).

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Fenner uvádí, že myxomový virus je antigenní komplex, který má nejméně 2 solubilní antigeny. Mnozí autoři prokázali, že existují vztahy mezi virusem myxomu a virusem fibromu. Berry a Dedrick (1936, cit. podle 13) dokazují, že to jsou pouze varianty jednoho virusu.

Virus fibromu byl isolován z bílého amerického králíka *(Sylvilagus)* jako kmen lišící se od typického virusu myxomu. Byl důkladně studován a bylo zjištěno, že existuje typický kmen (OA) a zánětlivý subkmen (IA), který je antigenně podobný, ale má větší tendenci vyvolávat generalisaci procesu. Virus fibromu nepůsobí smrtelné onemocnění domácích králíků jako virus myxomatosy, neobjevuje se v krvi, není kontagiosní a nešíří se spontánně mezi domácími králíky. Způsob rozšiřování mezi divokými králíky není znám. Hurst (13) prokázal, že jak myxomatosa, tak i fibromatosa je v raném stadiu generalisovanou infekcí a liší se od myxomatosy hlavně tím, že nemá zřetelnou tendenci k napadení *CNS*. Titr virusu není u fibromatosy nikdy tak vysoký jako v odpovídajícím materiálu u klasického myxomu.

Po infekci králíků fibromatosou vzniká velmi rychle částečná odolnost vůči virusu myxomu. Sera králíků uzdravených z myxomatosy mají neutralisační protilátky jak proti myxomu, tak i proti fibromu (Shope, 20). Při serologickém srovnání se virus fibromu liší tím, že nemá antigenní frakci, která vyvolává tvorbu antimyxomových neutralisačních protilátek (Ledingham, 15).

Aktivní imunitu proti myxomu je schopen vyvolat jenom typický virus fibromu, a to jen asi u ⅔ naočkovaných králíků, zatím co avirulentní kmeny fibromu jsou neúčinné (Sideri a spol., 22).

Vlastní práce

V srpnu minulého roku se objevila v našem okrese myxomatosa u divokých i domácích králíků. Přes veškerá opatření byla zavlečena i do našeho ústavního chovu (pravděpodobně krmivem nebo hmyzem). Využili jsme této příležitosti k tomu, abychom si zachytili virus myxomatosy pro naši ústavní sbírku virusových kmenů a abychom si zjistili možnosti isolace a kultivace virusu. Dále jsme si chtěli ověřit metodiky, které by byly použitelné pro přesnou virologickou diagnostiku této nákazy.

Materiál a metodika

Výchozí materiál jsme získali ze spontánně onemocnělého králíka, kterého jsme sledovali od prvních příznaků nemoci. K pokusům o isolaci virusu bylo použito jednak výplachů konjunktiválního vaku, které byly prováděny 0,5 *ml* sterilního fysiologického roztoku, a jednak infiltrované podkožní tkáně, plic a varlat, odebraných těsně po uhynutí králíka.

Tento materiál byl zmražen v mrazicím pultu při —35° C. Před očkováním byly orgány jednotlivě rozetřeny se skelným pískem, pak opět zmraženy a rozmraženy, znovu rozetřeny a připravena 10% suspense ve fysiologickém roztoku, která byla pak krátce odstředěna při 1500 obr./min.

Po přidání příslušného množství antibiotik se takto připravený materiál naočkoval obvyklou metodikou na chorioallantoidní blány dvanáctidenních kuřecích embryí v dávce 0,05 *ml*. Po inokulaci byla vejce ponechána 18 hodin při teplotě 25° C a poté byla dále inkubována po 3 dny při teplotě 35° C. Pak byly chorioallantoidní blány odebrány, posouzen jejich vzhled na černé podložce

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

a buď ihned dále pasážovány nebo uloženy do mrazicího pultu. Pro další pasáž se z chorioallantoidních blan připravovaly suspense obdobným způsobem jako z orgánů. Do fysiologického roztoku pro přípravu suspensí jsme přidávali 10—50 % normálního králičího sera (event. 10 % normálního koňského sera). Z každé suspense byla vždy provedena kontrola čistoty na obvyklých bakteriologických půdách a před vlastní inokulací do vajec byla přidávána antibiotika (800 j. penicilinu a 25—50 *mg* streptomycinu na 1 *ml* suspense).

Filtrace virusu byla provedena skleněným jenským filtrem G5 Mitte o přibližné porositě 1,2 μ. Suspense byly před filtrací odstředěny 15 min. při 3000 obr./min. Po přefiltrování byl materiál naočkován na chorioallantoidní blány kuřecích embryí a výsledek byl srovnán s nefiltrovaným kontrolním materiálem.

Titrace virusu. Pro titraci isolovaného virusu jsme použili metodiky počítání foků na chorioallantoidních blanách kuřecích embryí. Tato metoda byla použita i pro jiné druhy virusů (vakcinia, herpes, ektromelie, inf. laryngotracheitis, drůbeží neštovice a j.), u nichž se často osvědčila lépe než jiné titrační metody.

Beveridge a Burnet (3) usuzují, že každý fokus na chorioallantoidní bláně vznikl z jedné virusové částečky. Z toho však nevyplývá, že by počet vytvořených foků zcela odpovídal absolutnímu počtu virusových částic inokulovaných na chorioallantoidní blánu. Při očkování dochází totiž k určitým nevyhnutelným ztrátám, neboť jen některé virusové částice mají možnost infikovat vnímavou buňku a dát vznik viditelnému foku.

K správnému hodnocení titrací je třeba určitých zkušeností, nutných k rozlišení specifity vytvořených změn. Je mnohdy těžko rozhodnout, zda ložiskové zakalení blány je nebo není specifické, a při vzniku sekundárních foků je často velmi obtížné nebo i zcela nemožné určit počet primárních změn. Podle Beveridge a Burneta má každý specifický fokus 3 charakteristické vlastnosti: 1. kulatý tvar, 2. výraznější střed, který je někdy nahrazen nekrotickým kráterem a 3. zakalené okolí následkem nahromadění zánětlivých buněk v mesodermu. Všechny lese, které mají alespoň 2 tyto znaky, se pokládají za specifické. Primární foky bývají též obvykle větší než sekundární, ale může tomu být i opačně. Vyskytují se dále i případy, kdy počet foků je neobvykle nízký; to bývá zvláště tehdy, kdy ve středu inokulační plochy se vytvoří velká nespecifická změna (po inokulaci materiálu). Foky jsou buď abnormálně malé a v nepatrném počtu, nebo se vůbec nezjistí viritelné změny [t. zv. nereagující, necitlivé blány — Burnet, Faris (6)].

Potíže při rozlišování foků vznikají hlavně u virusů, které vytvářejí poměrně malé foky na chorioallantoidních blanách, což platí právě pro myxomatosu (dále též pro ektromelii, looping-ill a j.). Abychom získali určité znalosti o titrovaném virusu, seznámili jsme se nejprve s tvarem a rozložením foků na chorioallantoidních blanách a s technikou rozlišování specifických a nespecifických změn. Předcházela tedy vlastní titraci řada předběžných pokusů s odečítáním a hodnocením různě změněných blan.

Při inokulaci virusu pro titraci jsme postupovali obdobným způsobem jako při jeho kultivaci. Materiál k titraci byl naředěn fysiologickým roztokem s 10% normálního králičího sera a jednotlivá ředění byla naočkována v dávce 0,05 *ml* na chorioallantoidní blány dvanáctidenních kuřecích embryí; pro každé ředění bylo použito 3—6 vajec. Po třídenní inkubaci při 35° C byly membrány odstřiženy několik *mm* vně inokulačního prostoru a po opláchnutí fysiologickým roztokem rozprostřeny v Petriho miskách pomocí skleněné tyčinky. Odečítání jsme prováděli na černém podkladě.

Na základě získaných osobních zkušeností jsme rozdělili chorioallantoidní blány z jednoho ředění do skupiny, kde se změny vyskytovaly v přiměřeném

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

počtu a byly dobře rozlišitelné, a do skupiny, kde z různých důvodů nebylo možno přesně stanovit počet primárních foků. Počet v této skupině se stanovil dvojnásobkem primárních foků, pokud je bylo možno určit.

Ze získaných hodnot z jednotlivých blan se stanovil průměr a vypočetlo se množství virových částic v 1 *ml*. Konečný titr virusu se pak vypočetl z průměru všech použitých ředění a vyjádřil se záporným logaritmem.

Abychom se vyhnuli osobním chybám při počítání změn, prováděli hodnocení všech blan vždy dva pracovníci nezávisle na sobě. Z výsledků dvojího počítání (viz titrace virusu ze 13. embryonální pasáže) vyplynulo, že osobní faktory nebyly rozhodující a rozdíly byly vcelku jen nepatrné, takže při vyjádření titru virusu jsou bez většího významu.

Titrace na králících. Pro omezený počet králíků jsme provedli pouze orientační titraci virusu. Příslušné ředění virusu jsme aplikovali intradermálně do oholené kůže králíka. Vytvořené změny v kůži jsme měřili dotykovým měřítkem od 3. dne *p. i.* až do doby, kdy se projevily první příznaky generalisace (6.—7. den). Tuto titraci jsme provedli jen pro přibližné srovnání s výsledky titrace virusu na kuřecích embryích. Pro přesnou titraci by bylo potřebí většího počtu králíků a velkého množství vpichů.

Neutralisace virusu. Pokusy o neutralisaci isolovaného virusu byly provedeny s králičími sery. Serum M I bylo získáno z králíka těsně před jeho uhynutím po akutním průběhu myxomatosy. Druhé serum jsme získali z králíka č. 124 L, který jediný přežil akutní vzplanutí nákazy v ústavním chovu, ačkoliv byl v jedné kleci s králíkem, který uhynul na myxomatosu. Byl vykrven za 26 dní po uhynutí společně chovaného králíka, jelikož se dostavila postupující silná kachexie a hrozilo jeho uhynutí. Sera byla uchovávána v mrazicím pultu při —35° C.

Neutralisace virusu byla prováděna na chorioallantoidních blanách dvanáctidenních kuřecích embryí. Virus byl použit ze 13. embryonální pasáže a naředěn fysiologickým roztokem na 10^{-2} —10^{-6}. 0,5 *ml* neředěného sera, inaktivovaného 30 minut při 56° C, se smíchalo s 0,5 *ml* příslušného ředění virusu. Tato směs se ponechala 30 minut při pokojové teplotě a pak byla naočkována v dávce 0,05 *ml* na chorioallantoidní blány kuřecích embryí (4—6 vajec na jedno ředění). Jako kontroly jsme použili normálního inaktivovaného králičího sera. Po třídenní inkubaci při teplotě 35° C jsme odebrali membrány a spočítali foky stejným způsobem jako při titraci virusu.

Podle počtu změn v jednotlivých ředěních byl stanoven titr virusu s imunním serem a se serem kontrolním. Stupeň neutralisace jsme pak vyjádřili procentem redukce počtu foků s imunním serem proti počtu se serem kontrolním (podle Fennera a spol. 9, 10).

Komplementfixační test.*) Vazba komplementu byla provedena se serem králíka č. 124 L. Jako antigen byla použita 10% suspense chorioallantoidních blan z 9. embryonální pasáže virusu. Suspense byla odstřeďována 30 minut při 3000 obr./min. a supernatant čištěn mletou křemelinou (podle Palaciose a Rodrigueze, 18). Takto připravený antigen nevykazoval antikomplementárních účinků. Ke komplementfixačnímu testu bylo serum inaktivováno po 30 minut při 56° C. Serum se titrovalo od ředění 1 : 10. Komplement byl použit v množství 1 jednotky, krvinky v pracovním ředění 2,5 % (t. j. aktuální ředění 0,5 %). Dávky jednotlivých ingrediencí byly 0,2 *ml*. Reakce probíhaly ve vodní lázni 37° C po 20 minut. První odečítání bylo provedeno ihned, druhé po 12 hodinách.

*) Komplementfixační test provedl a zpracoval MVDr Jiří Boháč ze zdejšího ústavu.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Výsledky práce

K vlastní isolaci původce nákazy na kuřecích embryích jsme použili materiálu, o němž jsme předpokládali, že bude obsahovat největší množství virusu (jak je uvedeno v metodice).

První konjunktivální výplach jsme provedli v době, kdy se objevily počáteční klinické příznaky. Třetí den od začátku choroby, kdy byl klinický obraz již plně rozvinut, jsme provedli druhý výplach a poslední až po uhynutí králíka koncem téhož dne. Každý tento materiál byl inokulován po preparaci antibiotiky do 4 embryí. Ve všech případech došlo v této první pasáži k vytvoření makroskopicky zřetelných změn na chorioallantoidních blanách. Tyto změny se projevovaly jako bělavé foky, lese, velikosti špendlíkové hlavičky i větší, prominující, rozseté difusně po celé bláně. Průměrný počet uzlíků u blan infikovaných prvním a třetím výplachem byl 5—10. Mnohem četnější změny byly na membránách infikovaných výplachem z druhého odběru. Chorioallantoidy byly v tomto případě posety nesčetným množstvím difusně rozptýlených solitárních foků (obr. č. 1, 2, 3).

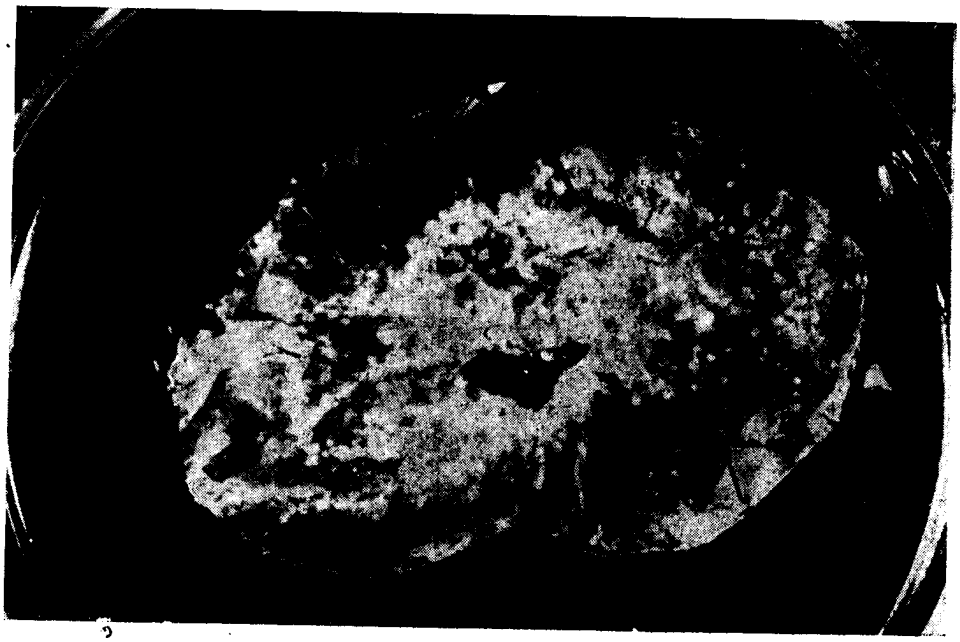
Dále jsme k isolaci použili varlata s rosolovitým infiltrátem, změněnou část podkožní tkáně z hlavy králíka a plíce. Suspense z těchto tkání jsme naočkovali vždy do 4 kuřecích embryí. I v těchto pokusech došlo k vytvoření podobných změn. Počet foků byl však zřetelně menší, než kolik se jich vytvořilo po infekci konjunktiválními výplachy. Průměrný počet byl 5—8 na jedné bláně.

Obr. 1—3: Chorioallantoidní blány kuřecích embryí po infekci virusem myxomatosy. (Foto S. Štros.)

Рис. 1.—3. Хориоаллантоидные пленки куриных зародышей после инфекции вирусом миксоматоза.

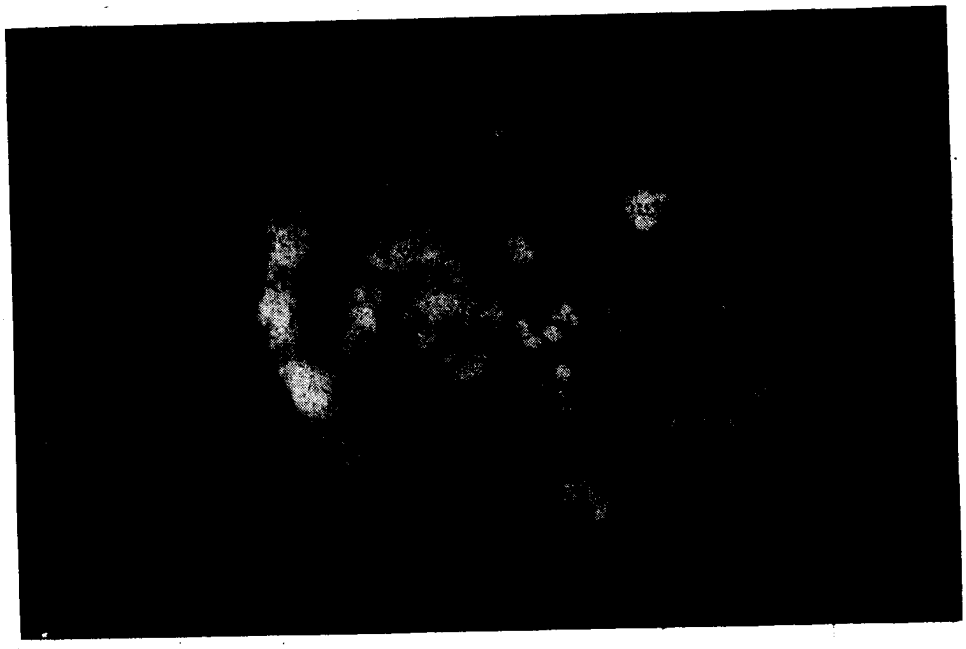
Ilus. 1—3. Chorioallantoid membranes of chicken embryo after infection with the virus of myxomatosis. (Photo by S. Štros.)

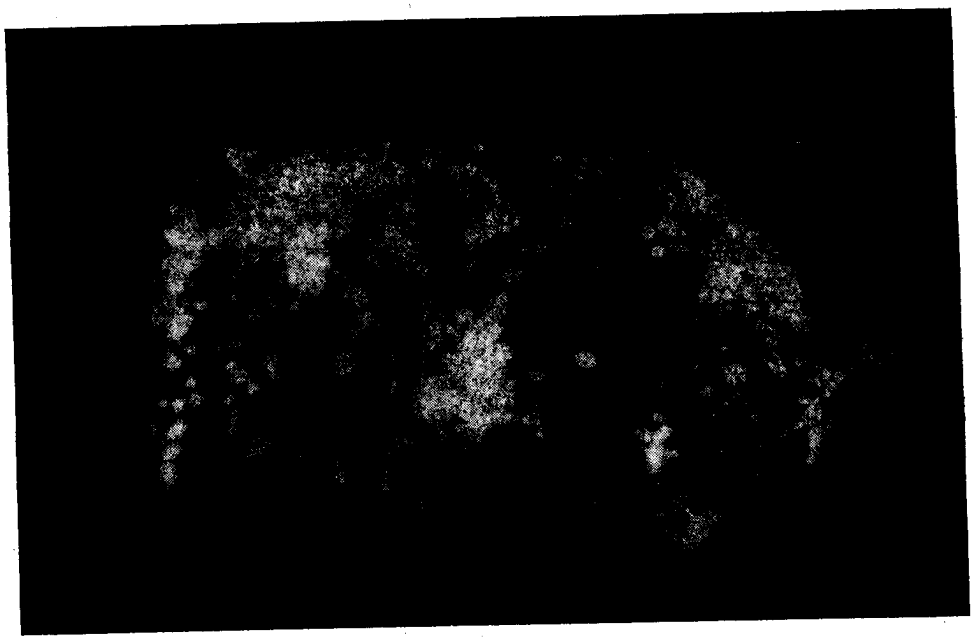
Abb. 1—3. Chorioallantoid-Membranen von Hühnerembryonen nach der Infektion mi dem Myxomatose-Virus. (Photo S. Štros.)



Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2





Z této první pasáže jsme vybrali typicky změněné blány a provedli jsme zdařilou druhou a ihned po ní třetí pasáž.

Identifikace virusu. Abychom se přesvědčili o specifitě vyvolaných změn, infikovali jsme 2 králíky 10% suspensí chorioallantoidních blan ze 3. embryonální pasáže. Jednoho králíka jsme očkovali podkožně dávkou 1 *ml* a druhého intravenosně dávkou 0,5 *ml* suspense. Oba králíci onemocněli po 4denní inkubaci.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Prvními příznaky byly záněty spojivek spojené s postupujícím zduřením víček. Serosní výtok z očí se brzy změnil v hlenohnisavý, který později zalepil celou štěrbinu oční. Zduření víček se stále zvětšovalo a od 3. dne trvání choroby došlo k typickému zduření celé hlavy. Současně se objevily otoky v krajině anální a na pohlavních orgánech. Okolo ušních boltců, na nohách a na trupu se vytvořily v podkoží nádorové změny různé velikosti. Den před uhynutím se projevily pohybové poruchy, králíci se neudrželi na nohou a posléze zůstali ležet na boku. K uhynutí došlo za maximálního napnutí končetin a opisthotonu. Králík, naočkovaný intravenosně, uhynul za 9 dní a králík naočkovaný podkožně za 11 dní *p. i.*

Po uhynutí byly zjištěny nádorové změny v podkoží, edémy kolem očí, anu a genitalií. Tyto změny neměly odezvu na vnitřních orgánech, které u obou králíků byly bez pathologicko-anatomického nálezu. Histologické vyšetření*) kůže z víček a perianální krajiny prokázalo nádorovou myxomatosní infiltraci škáry. Nádorové atypie byly nalezeny též v epithelových složkách, přiléhajících ke škáře (na př. v epithelu spojivky a v adnexálních orgánech kožních). Nádorová infiltrace byla zjištěna též v nadvarleti a ve varleti, v menší míře též v kosterním svalstvu a v peritoneu z blízkého okolí chámovodu. V ostatních orgánech nebyly histologicky zjištěny podstatnější změny. *CNS* nebyl vyšetřován.

Z těchto králíků jsme provedli zpětnou isolaci virusu na chorioallantoidní blány kuřecích embryí, kde se vytvořily analogické změny jako při isolaci z původního materiálu.

K dalšímu podložení specifity isolovaného virusu jsme provedli virusneutralisační a komplementfixační testy se sery myxomatosních králíků.

Tab. 1. Neutralisace isolovaného virusu se sery myxomatosních králíků.
Табл. 1. Нейтрализация изолированного вируса с сыворотками миксоматозных кроликов.
Table 1. Neutralization of isolated virus with serum of myxomatose rabbits.
Tabelle 1. Neutralisation des isolierten Viruses mit den Seren myxomatoser Kaninchen.

Serum	Ředění virusu	Počet foků na jednotlivých blanách				Průměr	Výsledek
124 L	10^{-2}	25	25	27	M	25,6	Průměrný počet virusových částic v 1 ml: 1,950.250 Titr virusu: $10^{-6,29}$
	10^{-3}	7	12	M	M	9,5	
	10^{-4}	2	4	2	M	2,6	
	10^{-5}	2	2	0	2	1,5	
	10^{-6}	0	0	1	M	0,3	
M I	10^{-2}	35	88	84	M	69	Průměrný počet virusových částic v ml: 3,299.300 Titr virusu: $10^{-6,5}$
	10^{-3}	8	6	12	14	10	
	10^{-4}	6	5	4	8	5,8	
	10^{-5}	0	1	2	2	1,2	
	10^{-6}	2	0	0	M	0,6	
Kontrolní serum	10^{-2}	160	200	180	M	180	Průměrný počet virusových částic v 1 ml: 35,738.400 Titr virusu: $10^{-7,5}$
	10^{-3}	75	145	175	M	131,6	
	10^{-4}	8	36	43	27	38,5	
	10^{-5}	12	12	M	M	12	
	10^{-6}	7	5	10	M	7,3	

M = embryo předčasně uhynulo.

*) Histologická vyšetřování nám prováděl doc. MUDr Blahoslav Bednář, I. P. A. ústav lék. fakulty KU Praha.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Obr. 4—5: Neutralisace virusu se serem myxomatosního králíka. (Vlevo: virus + + kontrolní serum, vpravo: virus + imunní serum.) (Foto S. Štros.)

Рис. 4.—5. Нейтрализация вируса с сывороткой миксоматозного кролика. (Влево: вирус + контрольная сыворотка; вправо: вирус + иммунная сыворотка)

Illus. 4—5. Neutralization of virus on myxomatose serum of rabbit. (At left virus with control serum, at right virus with immune serum.) (Photo by S. Štros.)

Abb. 4—5. Neutralisation des Viruses mit dem Serum eines myxomatosen Kaninchens. (Links: Virus + Kontrolserum, rechts: Virus + immunes Serum).

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Protože jsme neměli k disposici standardní myxomové antiserum, museli jsme použít sera králíků, u nichž jsme mohli předpokládat přítomnost protilátek. Bylo to serum M I, odebrané těsně před uhynutím králíka, kdy podle F e n n e r a a s p o l. již mohou být v seru v malém množství neutralisační protilátky, a serum králíka č. 124 L, který přežil o 26 dní ostatní ústavní králíky, ačkoliv byl s nimi v těsném kontaktu a jistě přišel do styku s virusem. Abychom se vyvarovali event. nespecifických výsledků, nasazovali jsme velmi pečlivě plný počet kontrol s normálním králičím serem ve všech ředěních virusu.

Výsledky neutralisačních testů s těmito sery uvádíme v tabulkách.

Titr virusu s normálním králičím serem je $10^{-7,5}$, se serem králíka č. 124 L $10^{-6,29}$ a se serem M I $10^{-6,5}$. Průměrná redukce počtu foků v ředěních 10^{-2} — 10^{-6} je u sera č. 124 L 94,6 % a se serem M I 90,8 %. Z výsledků vyplývá specifický účinek obou ser z myxomatosních králíků na isolovaný virus.

Se serem 124 L byla provedena též komplementfixační reakce s antigenem z positivních chorioallantoidních blan kuřecích embryí. Útlum hemolysy se projevil sice jen do ředění sera 1 : 20, avšak ve srovnání s kontrolami lze hodnotit tento výsledek jako positivní.

Isolované infekční agens vyvolává u králíků onemocnění shodné se spontánní myxomatosou, je specificky neutralisováno rekonvalescentním serem z myxomatosního králíka, se kterým též dává specifický útlum při komplementfixační reakci, a vytváří na chorioallantoidních blanách kuřecích embryí změny, shodné s popisem pro virus myxomatosy. Na základě toho soudíme, že je lze identifikovat jako virus myxomatosy.

Kultivace virusu. Abychom si udrželi isolovaný kmen, propracovali jsme seriovou kultivaci tohoto virusu. Zatím co v primoisolaci jsme zjišťovali velký počet solitárních foků, difusně rozptýlených po celé bláně, počet lesí se v dalších pasážích zmenšoval, event. docházelo ke slití foků ve středu blány. Objevovaly se i blány bez makroskopických změn a k dosažení positivních výsledků bylo zapotřebí očkovat stále větší počet kuřecích embryí.

Na základě několika srovnávacích pokusů jsme začali používat pro přípravu suspense fysiologického roztoku s 10—50 % normálního králičího sera, inaktivovaného 30 minut při 56° C. Dosáhli jsme tak mnohem intensivnějšího pomnožení virusu, což se projevilo vytvořením mnohočetných, prominujících foků, rozptýlených po celé bláně.

Jako nejvýhodnější pro pomnožení virusu se ukázala inkubace vajec po tři dny při teplotě 35° C. Ochlazování embryí na 25° C po dobu 18 hodin po inokulaci nebo i před ní (jak uvádí B e r g e y) je vhodné při isolaci virusu. U adaptovaného virusu se ochlazení ukázalo bez podstatného vlivu na sílu pomnožení. Pro jednotlivé pasáže je nejvýhodnější očkovat embrya suspensí chorioallantoidních blan v ředění 10^{-2} — 10^{-3} inokulační dávkou 0,05 *ml*. Takovéto pasážování neklade pak žádné technické obtíže a virus lze velmi snadno pomnožovat ve značném množství.

Změny vyvolávané virusem myxomatosy na chorioallantoidní bláně jsou makroskopicky velmi nápadné, jak je patrné z fotografií. Histologickým vyšetřením bylo zjištěno, že změny postihují jednak povrchový epithel, jednak mesenchym. V povrchovém epithelu dochází k degenerativním změnám, až k nekrose a k exulceraci, jež je sledována význačnou celulární exsudací. V mesenchymu jsou místy pod intaktním epithelem ložiska silně proliferujících embryonálních fibrocytů s příměsí leukocytů. Změny nejsou zcela pravidelně rozloženy, takže obraz od místa k místu značně kolísá.

Titrace virusu myxomatosy. Výsledky titrace virusu na chorioallantoidních blanách kuřecích zárodků uvádíme v tabulkách.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Tab. 2. Titrace virusu ze 3. embryonální pasáže.
Табл. 2. Титрование вируса из 3-го эмбрионального пассажа.
Table 2. Titration of virus from the 3rd embryonal passage.
Tabelle 2. Titration des Virus der 3. embryonalen Serie.

Ředění virusu	Počet foků na jednotlivých blanách				Průměr	Výsledek
10^{-3}	6	12	M	M	9	Průměrný počet virusových částic v 1 ml: 3,060.000 Titr virusu: $10^{-6,48}$
10^{-4}	4	M	6	M	5	
10^{-5}	3	4	M	1	4	

M = embryo předčasně uhynulé

Tab. 3. Titrace virusu ze 13. embryonální pasáže.
Табл. 3. Титрование вируса из 13-го эмбрионального пассажа.
Table 3. Titration of virus from the 13th embryonal passage.
Tabelle 3. Titration des Virus der 13. embryonalen Serie.

Ředění virusu	Počty foků na jednotlivých blanách								Průměr H.	Průměr J.
	Počty H.				Počty J.					
10^{-2}	240	120	160	M	120	120	140	M	173	126
10^{-3}	95	18	M	M	58	20	M	M	56,5	39
10^{-4}	24	4	M	16	22	2	M	9	14,6	11
10^{-5}	6	1	6	M	6	0	6	M	4,3	4

Průměrný počet virusových částic v 1 ml: 3,149.150 (H)
2,808.300 (J).
Celkový průměr: 2,978.725
Výsledný titr virusu: $10^{-6,47}$

Tab. 4. Titrace virusu ze 14. embryonální pasáže.
Табл. 4. Титрование вируса из 14-го эмбрионального пассажа.
Table 4. Titration of virus from the 14th embryonal passage.
Tabelle 4. Titration des Virus der 14. embryonalen Serie.

Ředění virusu	Počet foků na jednotlivých blanách				Průměr	Výsledek
10^{-2}	120	160	100	M	126,6	Průměrný počet virusových částic v 1 ml: 17,543.840 Titr virusu: $10^{-7,24}$
10^{-3}	120	60	100	M	93,3	
10^{-4}	2	16	26	28	18	
10^{-5}	10	12	11	M	11	
10^{-6}	4	5	0	M	3	

Pro ověření správnosti titrace virusu na kuřecích embryích jsme provedli orientační titraci na králících. Přibližný titr virusu ze 3. embryonální pasáže byl více než 10^{-6}, z 9. i 10. pasáže přibližně 10^{-7}. Přesný titr jsme neurčili vzhledem k malému počtu králíků a malému počtu provedených vpichů.

Filtrace virusu. Přefiltrovali jsme přes jenský skleněný filtr G 5 Mitte o porositě přibližně 1,2 μ 10% suspense z varlat myxomatosního králíka a z chorioallantoidních blan z 9. embryonální pasáže. Přefiltrovaný materiál jsme pak

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

naočkovali na blány kuřecích embryí. Přibližný počet virusových částeček v 1 *ml* výchozí suspense z tkáně varlat byl cca 32.000. Po filtraci klesl na cca 1.250 v 1 *ml*, t. j. zadržení asi 96,1 % virusu. Ze suspense z chorioallantoidních blan bylo při filtraci zadrženo ve filtru asi 84,4 % obsahu virusu (před filtrací přibližně 266.000 virusových částic v 1 *ml* a po filtraci cca 41.600).

Souhrn výsledků

Zdařila se nám isolace virusu myxomatosy ze spontánně onemocnělého králíka. Virus vyvolává na chorioallantoidních blanách kuřecích embryí makroskopicky patrné změny v podobě bělavých uzlíčků, foků velikosti špendlíkové hlavičky i větších, prominujících, které se vytvářejí difusně po celé ploše blány. Již v primoisolaci se vytvořilo velké množství makroskopických změn, což svědčí o snadné adaptabilitě virusu na kuřecí embrya. Isolace byla úspěšná z konjunktiválních výplachů, dále z varlat, plic a z infiltrované podkožní tkáně uhynulého králíka.

Isolovaný virus jsme identifikovali na základě biologického pokusu na králících a pomocí virusneutralisačních a komplementfixačních testů se sery králíků, kteří prodělali myxomatosu.

Ověřili jsme si možnost seriových pasáží virusu na kuřecích embryích. Pro přípravu virusových suspensí je žádoucí přidávat do ředidla normální králičí nebo koňské serum, za jehož přítomnosti se virus velmi dobře množí.

Histologickým vyšetřením chorioallantoidních blan bylo prokázáno, že virus vyvolává změny jednak v povrchovém epithelu, jednak v mesenchymu. Změny v epithelu jsou degenerativního až nekrotického rázu. V mesenchymu vznikají ložiska proliferujících embryonálních fibrocytů.

Virus pasážovaný na kuřecích embryích jsme kvantitativně vytitrovali. Prokázali jsme, že se množí až do titru $10^{-7,5}$ a že množství virusu zůstává během 14 pasáží celkem na stejné, poměrně značné výši s mírně stoupající tendencí.

Filtrací virusu přes jenský filtr G 5 mitte jsme prokázali, že virus je při filtraci ve velkém procentu zadržován ve filtru, takže tento způsob čištění virusového materiálu není vhodný pro isolaci, event. pasážování virusu.

Práce sledovala zachycení a kultivaci virusu myxomatosy. Ukázalo se, že možnosti přesné virologické diagnostiky této nákazy pomocí přímé isolace virusu a jeho identifikace jsou poměrně bez větších technických potíží. Výsledky kultivačních pokusů jsou předpokladem pro eventuální zavedení výroby očkovací látky proti této nákaze.

Serologické metody jsme použili pouze v nejnutnějším rozsahu pro identifikaci virusu. Lze se však právem domnívat, že jak virusneutralisace, tak i komplementfixace jsou pro myxomatosu dobře použitelné a po detailnějším propracování těchto metod se mohou stát rychlou a spolehlivu diagnostickou metodou.

Zůstává dalším úkolem výzkumu objasnit důkladně otázku rozložení virusu v nemocném organismu, zjistit způsoby vylučování a přenášení virusu. Je třeba dále propracovat serologickou odezvu v napadeném zvířeti a zaměřit se na studium antigenní struktury virusu myxomatosy a na jeho vztah k virusu fibromu, zvláště pokud by šlo o využití posledně jmenovaného pro prevenci této nákazy.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Závěr

1. Isolovali jsme virus myxomatosy na chorioallantoidních blanách kuřecích embryí.

2. Virus jsme identifikovali biologickým pokusem, virusneutralisačním a komplementfixačním testem.

3. Provedli jsme úspěšně seriovou kultivaci tohoto virusu na kuřecích embryích.

4. Pasážovaný virus byl vytitrován na chorioallantoidních blanách kuřecích embryí.

Literatura

1. Andrewes, Harisijades: Propagation of Myxoma Virus in One-day Old Mice. Brit. J. Exp. Path., 36, 1955, 18—21. — 2. Blažek, Král: První výskyt myxomatosy v ČSR. Veterinářství, IV, 1954, 357—358. — 3. Beveridge W. I. B., Burnet F. M.: The Cultivation of Viruses and Rickettsiase in the Chick Embryo. London, 1951, Med. Res. Council. — 4. Bull, Ratcliffe, Edgar: Myxomatosis. Its Use in the Control of Rabbit Populations in Australia. XVth Int. Vet. Congr. Proceedings, I, 1953, 396—399. — 5. Burnet: Immunological Studies with the Virus of Infectious Laryngo-tracheitis of Fowls Using the Developing Egg Technique. J. Exp. Med. 63, 1936, 685—701. — 6. Burnet, Faris: The Technique of Quantitative Chorioallantoic Virus Titration. J. Bact., 44, 1942, 241—248. — 7. Fenner: Classification of Myxoma and Fibroma Viruses. Nature, 171, 1953, 562—563. — 8. Fenner: Changes in the Mortality-rate due to Myxomatosis in the Australian Wild Rabbit. Nature, 172, 1953, 228—230. — 9. Fenner, Marshall, Woodroofe: Studies in the Epidemiology of Infectious Myxomatosis of Rabbits. J. Hyg. Camb. 51, 1955, 225—244. — 10. Fenner, Woodroofe: The Pathogenesis of Infectious Myxomatosis. Brit. J. Exp. Path., 34, 1953, 400—411. — 11. Gratzl: Die infektiöse Myxomatose der Nagetiere. Wiener tzt. Monatschr., 40, 1953, 705—715. — 12. Holmes: Filterable Viruses. Genus Molitor. Bergeys Manual of Det. Bact., 1952, 1241—1247. — 13. Hurst: Myxoma and the Shope Fibroma. III. Miscellaneous Observations Bearing on the Relationship between Myxoma, Neuromyxoma and Fibroma Viruses. Brit. J. Exp. Path., 18, 1937, 23—30. — 14. Kraus: Myxomatosa králíků a zajíců. Dosud nepublikováno. — 15. Ledingham: Studies on the Serological Inter-Relationships of the Rabbit Viruses, Myxomatosis (Sanarelli, 1898), and Fibroma (Shope, 1932). Brit. J. Exp. Path., 18, 1937, 436—449. — 16. Nižňánský: Myxomatóza králíkov. Veterinářství, III, 1953, 275—276. — 17. Nižňánský: Poznámky k hospodársky a zdravotnícky závažným nákazám zajačej zveri na Slovensku. Vet. čas. III, 1954, 223—231. — 18. Palacios, Rodriguez: L'epreuve de déviation du complement dans l'étude des virus aphteux. Bull. OIE, 31, 1949, 75—84. — 19. Ramon: De la myxomatose du Lapin et du Lièvre; considération épidemiologiques et immunologiques. C. R. Acad. Sci. 237, 1953, 1049—1052. — 20. Shope: Infectious Fibroma of Rabbits. III. The Serial Transmission of Virus Myxomatosum in Cottontail Rabbits and Cross-Immunity Tests with the Fibroma Virus. J. Exp. Med., 63, 1936, 33—42. — 21. Schoop: Die Myxomatose. DTW, 61, 1954, 285—287. — 22. Sideri, Harrisson, Ambrus M., Ambrus J.: The Immunological Relationship of Myxoma and Fibroma Viruses. JAVMA, 121, 1952, 300—301. — 23. Vyhláška ministerstva zemědělství ze dne 16. III. 1954 o ochraně králíků a zajíců před myxomatosou a o jejím zdolávání.

Миксоматоз. Изоляция и культивирование вируса

1. Изоляция вируса миксоматоза была проведена на хориоаллантоидных пленках куриных зародышей.

2. Вирус был идентифицирован биологическим путем, а именно тестом, нейтрализирующим вирус и фиксирующим комплемент.

3. Успешное культивирование этого вируса в сериях было проведено на куриных зародыщах.

4. Пассажированный вирус был вьтитрован на хориоаллантоидных пленках куринных зародышей.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Myxomatosis — Isolation and Cultivation of Its Virus

1. We isolated the virus of myxomatosis on the chorioallantoid membranes of chicken embryos.

2. We identified the virus by a biological test, a virus-neutralization test and a complement-fixation test.

3. We successfully carried out serial cultivation of this virus on chicken embryos.

4. The passaged virus has been titred out on the chorioallantoid membranes of chicken embryos.

Die Myxomatose. Isolation und Züchtung des Virus.

1. Das Virus der Myxomatose wurde auf Chorioallantois-Membranen von Hühnerembryonen isoliert.

2. Es wurde mittels eines biologischen Versuches und des Virus-Neutralisations- und Komplementfixations-Testes identifiziert.

3. Es wurde eine erfolgreiche Serienzüchtung des Virus auf Hühnerembryonen durchgeführt.

4. Die Titration des Virus wurde auf Chorioallantois-Membranen von Hühnerembryonen erfolgreich vorgenommen.

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

VETERINÁRSKY ČASOPIS

SLOVENSKEJ AKADÉMIE VIED

ROČNÍK III, ČÍSLO 2—3
1954

SEPARÁTNY VÝTLAČOK

VYDÁVA
VYDAVATEĽSTVO SLOVENSKEJ AKADÉMIE VIED
BRATISLAVA

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

další vzrůst, dosahující maxima 29—32 dní po infekci, t. j. 6—9 dní po vakcinaci.

Immunisace sledována po 60 dní po infekci u 12 zvířat a provedeno celkem 530 stanovení gamma-globulinů.

8. VIII. 1953

Bioveta, n. p.,
Terezín

LITERATURA

I

Berman J., Polák B., 1950: Čas. lék. čes. 89, 195.
Crossley M. L. a spol., 1941: J. Lab. Clin. Med. 27, 213.
Müller O. H., 1950: Fed. Proc. 9, č. 1.

II

Wehmeyer P., 1950: Revue d'Immunol. 14, 57.

III

Bradish, Brooksby, Henderson: cit. dle I. A. Galloway; 1952: Brit. Agric. Bull., 5/20.
Heyrovský A., Sochorová J., 1953: Čas. lék. čes. 92, 619.
Hořejší J., 1952: Čas. lék. čes. 91, 704.
Wehmeyer P., 1950: Revue d'Immunol. 14, 57.

G. PETR, R. DOMBEK

REKONVALESCENTNÍ A HYPERIMMUNNÍ HOVĚZÍ SERA U SLINTAVKY A KULHAVKY

IV. SLEDOVÁNÍ CELKOVÝCH SEROVÝCH BÍLKOVIN

Při polarografickém zpracování bílkovinných složek krvního sera během immunisace proti viru slintavky a kulhavky v předchozích sděleních jsme se zabývali (G. Petr, J. Boháč) sledováním Brdičkovy reakce, hladiny albuminů a hladiny gamma-globulinů. K doplnění otázky, týkající se reakce těla na vniknuvší antigen, nám zbývalo vyřešit chování celkových bílkovin sera během immunisace.

Polarograficky jsme tento problém zpracovávat nechtěli, abychom nedošli k mylným závěrům. Je známo, že albuminy dávají pri stejné koncentraci vyšší vlnu než globuliny. Tak K. Gawalowski a B. A. Gosman (1932) udávají poměr výšky vlny albuminů ke globulinům 48:28, J. Homolka (1953) opět 45,5:20. Protože, jak jsme se přesvědčili, obě složky

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

během immunisace velmi silně kolísají, považovali jsme za málo slibné užít polarografické metody ke sledování celkových bílkovin sera během immunisačního procesu. Uchýlili jsme se tedy ke známé Cu-sulfátové metodě stanovení bílkovin v krevním seru.

Podobným problémem se zabýval P. Wehmeyer (1949), který však určoval hladinu serových bílkovin před vakcinací různým typem viru slintavky a kulhavky a 3 neděle po ní. Uvádí, že 3 neděle po vakcinaci se zvyšuje hladina serových bílkovin o 0,33 až 0,76% podle množství injikovaných ml vakciny.

Materiál a methody

Materiálu jsme použili téhož jako v předchozích sděleních. Ke stanovení obsahu serových bílkovin jsme použili Cu-sulfátové metody tak, jak ji popisují E. Reith (1949) a P. P. Astanin (1951). Tato metoda, dávající uspokojující výsledky (H. Major, 1951), je velmi jednoduchá, nevyžaduje žádných přístrojů a je při tom velmi rychlá, takže se dá zpracovat denně více než 100 vzorků.

Výsledky

Na pohyb celkových serových bílkovin během immunisace proti viru slintavky a kulhavky můžeme usoudit již podle chování hladiny albuminů a gamma-globulinů.

Na tab. 1 uvedené výsledky naznačují, že k poklesu serových bílkovin dochází zpravidla 5.—7. den po infekci, tedy shodně s albuminy. Pokles trvá až do 10.—15. dne po infekci, na čež nastává opětné stoupání. Je to lehce pochopitelné, přihlédneme-li k chování albuminů a gamma-globulinů. Ač pokles albuminů stále trvá, gamma-globuliny, které počínají stoupat, stoupají mnohem rychleji, takže křivka serových bílkovin má tendenci stoupající. V době, kdy je již zvíře proti infekci virem slintavky a kulhavky immunní, t. j. asi 3 neděle po infekci, a kdy se gamma-globuliny ustalují na určité hodnotě, nastává i stagnace hladiny serových bílkovin. Podobně je tomu i v pozdějším stadiu pokusu, takže vlastně hladina serových bílkovin je nadále v závislosti na kocentraci gamma-globulinů. Proto i u těch zvířat, kde po vakcinaci dochází k dalšímu vzrůstu gamma-globulinů, zvyšuje se i hladina serových bílkovin (v době nejvyššího vzrůstu gamma-globulinů činí hladina serových bílkovin až 118% původní koncentrace) a u těch zvířat, kde vakcinace nemá prakticky žádného vlivu na pohyb

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

gamma-globulinů, nemění se ani hladina celkových serových bílkovin. Sledování celkových serových bílkovin nám tedy potvrdilo předchozí naše pokusy, týkající se sledování albuminů a gamma-globulinů.

Tabulka 1

Dní po infekci (vakcinaci)	Zvíře č. 8		27		67		69	
	obsah bílk.	%	obsah bílk.	%	obsah bílk.	%	obsah bílk.	%
0	8,0	100	7,31		7,05		7,67	
1	7,95		7,25		6,82		7,45	
3	8,1		7,25		7,13		7,56	
4	8,0		7,2	100	7,05	100	7,75	
5	7,83	98	7,05	97	6,9	98	7,56	100
6	7,83	98	6,9	95	—		7,46	99
8	7,2	90	7,0	96	6,5	92	7,3	98
9	6,67	83	6,9	95	6,27	89	7,45	99
10	6,5	81	6,62	91	6,2	88	7,25	96
11	6,3	79	6,82	94	6,1	87	7,2	95
12	6,67	83	—		6,2	88	7,1	94
13	6,5	81	7,13	98	6,27	89	6,82	90
15	7,75	97	7,3	101	6,27	89	6,86	
16	7,62	95	—		6,2	88	7,1	94
17	8,39		7,35	101	6,47	92	—	
18	8,15	102	—		6,6	93	7,2	95
19	7,75	97	7,3	101	6,56	93	7,2	95
20	7,62	95	7,45	103	6,67	95	7,45	99
22	8,62	108	7,6	105	7,0	99	7,67	101
23	8,77	109	7,83	108	7,13	101	8,08	
24 (1)	9,08	113	8,1	110	7,13	101	7,8	103
25 (2)	8,62	108	8,35	115	6,9	98	7,5	100
26 (3)	8,9	111	7,9	109	6,8	96	7,74	102
27 (4)	8,15		7,83	108	6,9	98	7,7	102
29 (6)	8,4	105	7,75	107	6,97	99	7,62	102
31 (8)	8,5	106	7,83	108	7,05	100	7,8	103
32 (9)	8,53	106	7,62	105	7,45	106	7,2	
33(10)	9,0	111	7,8	108	7,45	110	7,67	102
34(11)	9,38	117	7,8	108	—		7,62	101
36(13)	9,38	117	7,75	107	8,31	118	7,75	103
37(14)	9,08	113	7,92	109	8,0	113	7,62	101
38(15)	8,85	110	7,83	108	7,75	110	7,67	101
39(16)	8,77	109	7,15	99	7,7	109	7,62	101
40(17)	8,4	105	7,45	103	7,7	109	7,7	102
41(18)	8,36	105	7,45	103	7,7	109	7,67	102
45(22)	8,15		7,58	105	7,62	108	7,7	102
47(24)	8,5	106	7,3		7,62	108	7,62	101
48(25)	8,66	108	7,6	105	7,83	111	7,75	103
51(28)	8,4	105	7,7	106	7,62	108	7,25	
53(30)	8,46	106	7,53	104	8,15		7,8	
55(32)	8,4	105	7,7	106	7,45	106	7,65	101
58(35)	8,31	104	8,08	110	7,53	107	7,62	101
60(37)	8,46	106	8,4	116	7,62	108	7,7	102

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Souhrn

Sledován obsah celkových serových bílkovin během immunisace proti viru slintavky a kulhavky.

Zjištěna závislost chování bílkovin sera na chování jejich složek, t. j. albuminů a globulinů. Proto v době maximálního zvýšení gamma-globulinů dosahují i serové bílkoviny maximálních hodnot a činí až 118% původního množství.

3. X. 1953

Bioveta, n. p.,
Terezín

LITERATÚRA

Astanin P. P., 1951: Praktičeskije zaňatija po biochimii, 99.
Gawalowski K., Gosman B. A., 1932: Rozpr. II. tř. čes. Akad. 42, 9.
Homolka J., 1953: Čas. lék. čes. 92, 633.
Major H., 1951: Klin. Wschr. 29, 195.
Reith E., 1949: Süddtsch. Apoth. Ztg. 89, 294.
Urban N., Rive H., 1950: Ärztl. Wschr. 44, 870.
Wehmeyer P., 1949: Revue d'Immunol. 13, 232.

РЕКОНВАЛЕСЦЕНТНЫЕ И ГИПЕРИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ ЯЩУРА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Г. ПЕТР. И. БОГАЧ, Р. ДОМБЕК (I — IV)

В настоящей работе описываются наблюдения над фильтратной реакцией Брдички, альбуминами, гамма-глобулинами и белками вообще в сыворотке крови крупного рогатого скота в течение процесса иммунизации против ящура.

1. Фильтратная реакция Брдички: первый подъем фильтратной волны наступает на 3 день по инфекции, максимума достигает на 6—7 день, а через 3 недели после инфекции наблюдается возвращение к нормальным величинам. Последующая вакцинация другим типом вируса не имеет почти никакого влияния на дальнейшее изменение высоты волны.

2. Падение количества альбумина наступает на 5—7 день по инфекции, а минимума достигает на 16—18 день по инфекции, когда объем альбумина составляет 65—75% его первоначальной концентрации.

3. Повышение количества гамма-глобулина происходит на 8—11 день по инфекции, после чего следует резкий скачок вверх, а по достижении приблизительно через 3 недели по инфекции максимума (уровень гамма-глобулина достигает при этом 190—230% первоначальной концентрации) наступает нормализация уровня.

Последующая вакцинация другим типом вируса вызвала у некоторых из подопытных животных дальнейшее повышение уровня гамма-глобулина, достигшего кульминации на 6 день после вакцинации.

4. Белки сыворотки в целом изменяются в зависимости от колебаний своих составных частей — альбумина и глобулина.

Иммунизация наблюдалась в течение 60 дней после инфекции у 12 подопытных животных и было проведено свыше 500 анализов различных образцов.

Биовета, народное предприятие, Терезин

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

G. PETR, J. BOHÁČ, R. DOMBEK

DIE REKONVALESZENTEN UND HYPERIMMUNEN RINDERSEREN BEI DER MAUL — UND KLAUENSEUCHE

(I—IV)

Es wird die Filtrat-Reaktion Brdličkas, Albumine, Gamma-Globuline, und sämtliche Eiweisskörper in dem Serum des Rindes während der Immunität gegen den Virus der Maul — und Klauenseuche beobachtet.

1. Brdičkas Filtrat - Reaktion: Zum ersten Aufstieg der Filtratwelle kommt es am dritten Tag nach der Infektion, sie erreicht das Maximum am 6.—7. Tag und nach drei Wochen nach der Infektion erreicht sie wieder normale Werte. Die darauffolgende Vakzination mit einem anderen Typ des Virus hat fast gar keinen Einfluss auf die weiteren Veränderungen der Wellenhöhe.

2. Zu einem Rückgang der Albumine kommt es am 5.—7. Tag nach der Infektion und das Minimum erreicht er am 16.—18. Tag nach der Infektion, wenn der Inhalt der Albumine 65—75% der ursprünglichen Konzentration beträgt.

3. Zu einer Erhöhung der Gamma-Globuline kommt es am 8.—11. Tag nach der Infektion, worauf ein heftiger Aufstieg erfolgt und nach dem Erreichen des Höhepunktes, etwa drei Wochen nach der Infektion (die Gamma-Globuline erreichen hier 190—230% der ursprünglichen Konzentration) kommt es zu einer Stabilisierung. Die darauffolgende Vakzination mit einem anderen Typ des Virus hat bei einem Teil der Versuchstiere eine weitere Erhöhung der Gamma-Globuline zur Folge, die den Höhepunkt etwa 6—9 Tage nach der Vakzination erreicht.

4. Sämtliche Eiweisskörper des Serums verhalten sich in Abhängigkeit vom Verhalten iherer Bestandteile, d. h. der Albumine und Globuline. Die Immunisation wurde während 60 Tage nach der Infektion an 12 Tieren beobachtet und es wurden mehr als 500 Analysen verschiedener Muster durchgeführt.

Bioveta, n. p. Terezín

FR. NIŽNÁNSKY, Z. KOPPEL

SALMONELÓZY HOSPODÁRSKYCH ZVIERAT NA SLOVENSKU

O salmonelózach hospodárskych zvierat na Slovensku máme doteraz málo publikácií (Nižnánsky 1944, 1952, Nižnánsky—Hörmann 1952). Z toho dôvodu si o ich rozšírení, zdravotnom a hospodárskom význame najmä do roku 1940 môžeme urobiť len nevýrazný obraz.

Raška už roku 1939 dokumentačne poukázal v obšírnej publikácii na relatívne časté salmonelové onemocnenie ľudí v Čechách a na Morave, vyvolané aj novými typmi salmonel. Zdôraznil komplikovanosť problému a ich prevencie, najmä so zreteľom na úzku súvislosť ľudských infekcií so salmonelami zvierat. Kvôli predídeniu otráv mäsom žiadal:

1. zlepšiť zdravotnú kontrolu produkcie a predaja potravín, hlavne mäsa a mäsových výrobkov,

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2

2. zaviesť systematickú bakteriologickú kontrolu mäsa chorých a núdzovo zabitých zvierat za tesnej spolupráce lekárov, veterinárov, klinikov a bakteriológov.

Správne uzavieral, že hlavne malá záľuba v požívaní polosurového mäsa a nedokonale varených alebo údených výrobkov je príčinou výskytu otráv mäsom.

Keď Sedlák a Solár roku 1948 upozornili na existenciu exotických salmonelóz na našom území, vytýčili sme pátrania po ich zdrojoch.

Sedlák roku 1952 podľa bakteriologických nálezov v posledných rokoch prišiel k záveru, že nápadne stúpol počet salmonelóz, pričom hydina, najmä vajíčka, stali sa hlavným prameňom alimentárnych ľudských nákaz, kým mäso a mäsové výrobky sa uplatňovali v epidemiológii v menšej miere. Preto pre prevenciu ľudských infekcií žiada, aby sa v spoločnom stravovaní nepripravovali pokrmy zo surových kačacích vajec.

V topoľčianskom žrebčíne panoval v rokoch 1924—1931 infekčný potrat kobýl, vyvolaný *S. abortus equi*, ktorý v tomto období zapríčinil 89% abortov z celkového počtu 4,28% kobýl potrativších z rozličných príčin. V rokoch 1932—1944 sa nevyskytlo v tomto žrebčíne ani raz paratýfové zmetanie v 5,42% zmetavších kobýl.

Pred druhou svetovou vojnou boli údajne u ošípaných najmä na južnom Slovensku časté infekcie *S. suipestifer var. Kunzendorf*, a to v osobitnej forme i vo forme kombinovanej s morom, ale nemáme o nich žiadne dokumentačné údaje.

Pri bakteriologickej neobligátnej kontrole mäsa z núdzových zabití v bakteriologickom oddelení Ústavu mesta Bratislavy pre skúmanie potravín živočíšneho pôvodu nezistili podľa Hudecovej štatistiky v rokoch 1937—1941 salmonely ani raz. Tento fakt svedčí pre priaznivú epizootologickú situáciu v salmonelózach za spomenuté obdobie.

Čo sa týka otráv mäsom a mäsovými výrobkami, zapríčinených salmonelami na Slovensku, je opísaná do roku 1940 len endémia v istej rodine na okolí Topoľčian, vyvolaná *S. cholerae suis* pri domácej zabíjačke, ktorá sa skončila smrteľne u 2 osôb.

Sústavne sme pátrali po salmonelózach pri laboratórnom vyšetrovaní infekčného materiálu od roku 1940, t. j. od začiatku činnosti veterinárneho ústavu v Bratislave. Referujeme o skúsenostiach získaných pri diagnostike a tlmení salmonelóz za roky 1940—1. VII. 1953. V spomenutom období boli vykultivované z rôzneho infekčného materiálu zvierat a pri bakteriologickej kontrole mäsa tieto typy salmonel na Slovensku: 1. *S. abortus ovis*, 2. *S. abortus equi*, 3. *S. gallinarum*, 4. *S. cholerae suis*, 5. *S. typhi murium*, 6. salmonely zo skupiny *enteritidis*.

Hudec pri bakteriologickej kontrole mäsa núdzovo zabitých zvierat,

Approved For Release 2008/04/22 : CIA-RDP80T00246A003000230001-2