

356.33:616.2-022.78-036.11

**NĚKTERÉ ZKUŠENOSTI Z KOMPLEXNÍHO STUDIA ETIOLOGIE AKUTNÍCH RESPIRAČNÍCH INFEKČÍ**

R. BENDA, L. DANEŠ, F. REHN, M. HEJZLAR a J. DANEŠOVÁ,

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie a Dětská klinika lékařské fakulty hygienické, Praha

V roce 1960 jsme vytvořili pracovní skupinu, která měla studovat etiologii akutních respiračních infekcí komplexním způsobem, podobně jako se o to pokoušejí jiní pracovníci (Birkum-Petersen — ústní sdělení 1959, Hamre a spol. 1961\*). Základním popudem pro naši práci bylo získat metodologické zkušenosti, a to především na úseku virologie.

Konkrétním úkolem bylo prověřit současné možnosti etiologického objasnění infekčních onemocnění dýchadel. Ve třech sděleních, která osvětlují současně též jednotlivé dílčí záměry, jsou popsány nejdůležitější výsledky našeho studia (Danešová a spol., Daneš a spol., — v tisku 1962). Vyplýval z nich závěr, že prakticky nelze použít k odhalení etiologie klinických diferenciatně diagnostických vodítek. Etiologie byla objasněna za pomoci komplexního vyšetřování ve více než 52 % kazuistických res-

piračních infekcí hospitalizovaných dětí. Při vyšetřování kolektivu dětí mateřské školky, sledovaného od listopadu do března 1960/61, byly odhaleny některé manifestní, hlavně však nemainfestní infekce, většinou virového původu. Pomocí sérologických metod bylo možno zjistit promoření dětí i vojáků, a to proti relativně širokému spektru virových nákaz. Považovali jsme za správné všechny tyto výsledky nerozměňovat podrobnými údaji metodickými. V předkládaném sdělení chceme právě z tohoto hlediska uvedené práce doplnit a pokusíme se o shrnutí získaných zkušeností — s ohledem na to, že je tak možno usnadnit zdravotnickým pracovištím vlastní laboratorní práci i orientaci při hodnocení výsledků.

**Použité vyšetřovací metody****1. Metody bakteriologické:**

K pokusům o zachycení bakteriálních patogenů byly zpracovávány výtěry z nosu i krku (mandlí) na tampónech. Kultivace byly zakládány zpravidla paralelně (na mikro-

\*) Na mikrobiologickém kongresu v Montrealu 1962 podal nejširší zprávu Mogabgab.

biologické katedře LFH a ve VLVDÚ v Praze), a to zvláště z výtěru nosu i krku. Bakteriologické vyšetření na pracovišti VLVDÚ se provádělo na této sestavě půd: krevní agar, stafylokokové medium 110, Bordetova půda, Claubergova půda, Sabouraudův agar, Endova půda a pomnožovací sérový bujón. K subkultivacím a izolačním pokusům byl používán krevní agar s natrium azidem, Phenol Red Carbohydrate Medium 1—8 Difco a Euton Agar BBL. K identifikaci byla užita skupinová séra streptokoková firmy Wellcome, typová séra streptokoková ÚEM, Diphtherie-Antitoxin-Trockenstreifen Behringwerke, disky Optochin BBL, bacitracin-glukózoové papírky, skupinové sérum Klebsiella pneumoniae Wellcome. Citlivost vůči antibiotikům byla stanovena pomocí papírových disků, a to Bacto Unidiscs Difco a Bacto Sensitivity Discs Difco. Všechny zachycené pyogenní stafylokoky byly testovány kromě toho na přítomnost koagulázy, fosfatázy a na schopnost fermentace manitu, popřípadě ještě na patogenitu pro myš. U *Corynebact. dif.* byla testována toxicita pro morče.

Vyšetření některých případů, u nichž byly zachyceny streptokoky a stafylokoky i některé další mikroby, bylo doplněno výsledky sérologickými. V dvojicích sér pacientů byly zjišťovány titry antistreptolysinu O (ASLO) (Behringwerke Lab. 1958), popřípadě ještě antihyázy (Raška a spol. 1958). U některých sér byly určovány hladiny antistafylolysinu (ASTL) (Raška a spol. 1958). S vybranými kmeny jiných druhů, např. *Hemophilus influenzae*, *Hemophilus paraptus* a *Klebsiella pneumoniae*, byly určovány v dvojicích sér homologní aglutininy; použita metoda podle Behringwerke (Behringwerke Lab. 1957).

## 2. Metody izolace virových původců:

K izolačním pokusům byl převážně použit materiál z nosních a hltanových výtěrů nemocných. U pacientů s dg. zánět plic byl zpracováván navíc krevní koláč.

Tampóny po provedení výtěrů byly vnořeny do 4 ml media ve zkumavce (Parkerův roztok s 5 % králíčího inaktivovaného séra s antibiotiky — buď s penicilínem a streptomycinem po 200 j./ml, nebo s kanamycin sulfátem po 50 j./ml); po odlomení tampónů byly zkumavky zazačkovány, rychle odvezeny do laboratoře a uloženy při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Před zpracováním byla tekutina rozmrazena, vatové tampóny vymačkány ve třetí misce a tekutiny z obou výtěrů smíchány, event. rovněž s nosohltanovým výplachem, který byl navíc prováděn hlavně na počátku práce. Smíchaná tekutina byla vždy rozdělována na dvě části, aby nebylo nutno materiál k izolačním pokusům opakovaně rozmrazovat. Z krevních koláčů byla připravována 10% suspenze ve fyziologickém roztoku, materiál byl centrifugován a po přidání antibiotik očkován.

Každým materiálem z výtěrů byla očkována kuřecí embrya intraamnioticky a na chorioalantois, opičí ledvinové buňky, HeLa buňky, novorozené sající myšky a myši váhy 10—13 g; suspenze z krevních koláčů byly inokulovány morčatům. Předpokládali jsme, že výběr systémů pro izolační pokusy zabezpečí možnost zachycení většiny virových původců, přicházejících v úvahu pro naše studium.

Provedení izolačních pokusů na virus chřipky se nelíší v podrobnostech od předpisů mezinárodní konvence (WHO 1953). (Potvrzení chřipky u izolátů, vyšetřovaných hemaglutinačně inhibičním testem s protichřipkovými prototypovými séry, platilo jako vyloučení parotitidy.)

Izolační pokusy na opičích ledvinových buňkách byly zaměřeny na prvním místě k zachycení virů skupiny Parainfluenza a dále pak kmenů ze skupiny enterálních virů, popřípadě též adenovirů a jiných. Před očkováním jsme kultury prohlíželi na morfologickou čistotu a vždy jsme prováděli kontrolní hemadsorpční test; používali jsme 0,5 % morčí krvinky, na jednu kulturu jsme dávali 0,2 ml, inkubovali jsme při  $+4^{\circ}\text{C}$  15 minut a pak prohlíželi pod mikroskopem, bez opláchnutí i po šetrném výplachu sterilním PBS. S kulturami po očkování primomateriálem jsme nakládali v podstatě podle Chanockových prací (Chanock 1956, Chanock a spol. 1958, 1959, Johnson a spol. 1960). Zásadně jsme prováděli dvě slepé pasáže v intervalu 8 dní po naočkování kultur nebo později; k pasáží byly použity u každého materiálu 2 celé kultury po zmrazení a rozmrazení.

HeLa buňky sloužily především k zachycení adenovirů. Subpasáže (2. a 3.) byly prováděny po dvojnásobném zmra-

zení a rozmrazení celých kultur, držných co nejdéle, jak to dovolila kvalita kontrol. Obvykle se nedařilo držet buňky déle než 8—10 dní. V ostatních detailech jsme se řídili všeobecně přijatými předpisy (WHO 1959). Kultury jsme nebarvili.

Izolační pokusy na sajících myškách byly zaměřeny především na zachycení virů ze skupiny Coxsackie, popřípadě též viru herpetického a ornitózy. Zvířata byla očkována intracerebrálně a současně podkožně do skapulárního tuku a slepá pasáž byla prováděna se směsí suspenze mozku a trupu zvířat smrcených většinou 8. den. Do suspenze byla přidávána směs antibiotik (penicilín a streptomycin po 100 j./ml, kanamycin po 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , event. i amphotericin B po 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Práce s kuřecími zárodky, očkovanými na chorioalantois, měly doplňující význam a byly zaměřeny k herpesu. Slepá pasáž byla prováděna obvykle 4. den po kontrole bakteriální sterility vyňaté a prohlédnuté blány. Doplňující význam jsme přikládali rovněž pokusům s myši váhy 10 až 13 g, očkovanými intracerebrálně. Zvířata jsme nepitvali pro slepé pasáže ani pro zhotovení otisků orgánů.

Suspenze z krevního koláče — pokud byly dělány u některých diagnóz — jsme očkovali intraperitoneálně dvěma morčatům, jimž byla po 15 dní měřena teplota a 30. dne byla vykrváčena a pitvána (k získání sleziny na slepou pasáž a séra na reakci vazby komplementu s antigenem Q-horečky).

## 3. Sérologické metody s virovými antigeny:

Odběry krve na sérologická vyšetření byly prováděny u nemocných dětí ihned po přijetí na kliniku v akutní fázi a pak přibližně za 3 týdny, u dětí ze školkového kolektivu 3× za sebou v intervalech asi dvouměsíčních. Odběry krve u vojáků byly provedeny jednorázově. Séra byla po oddělení od krevního koláče inaktivována (30 min. při  $56^{\circ}\text{C}$ ), rozplněna do aglutinačních zkumavek na více dílů po malých objemech a uložena do zpracování při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Vyšetření dvojic nebo trojic sér od jednotlivých osob bylo prováděno vždy simultánně.

Vazba komplementu (KFR) byla vždy dělána v celkovém objemu 0,5 ml s použitím 2 jedn. antigenu, 2 jedn. komplementu a 2 jedn. hemolysinu. Do reakce byly zařazeny kontroly antikomplementarity a řada s kontrolním antigenem. Vazba byla inkubována se všemi antigeny při  $37^{\circ}\text{C}$  kromě s LCM, kde se reakce uskutečňovala při  $+4^{\circ}\text{C}$ . Odečítalo se podle průběhu hemolýzy v kontrolách. Titry protiláték jsou uváděny jako iniciální ředění séra od 1:8.

Chřipkové antigeny a antigen z viru Sendai, jakož i antigen kontrolní dodávala chřipková centrála v Praze (ÚEM). Ostatní preparáty byly vlastní proveniencí. Adenovirový antigen představoval inaktivovaný materiál smíchaný s kultur HeLa buněk, infikovaných typem 1,3 a 7 (Grayston a spol. 1958, Daneš 1958). Antigen C. burneti byl připravován éterovou extrakcí žlutkových vaků infikovaných kmenem Henzerling (ÚEM Praha) metodou podle Babudieriho (1953). Ornitózoový skupinový antigen jsme připravovali s použitím kmene P 89 (Pasteurův ústav, Paříž) metodou podle Volkerta a Christensena (1955). Antigen LCM byl získán ze slezin myši infikovaných kmenem WE (ÚSOL Praha) metodou podle Smadela a spol. (1939). Shodně byly připraveny i příslušné kontrolní antigeny.

Všechny preparáty byly před použitím do vazby titrovány proti standardním pozitivním sérum. Jako kontrolní sérum k adenovirovému antigenu sloužilo lidské rekonvalescentní sérum, k antigenu ornitózovému a LCM morčí imunní sérum, k antigenu Q-horečky morčí rekonvalescentní sérum. Kontrolní séra chřipková viz níže v kapitole o HIT.

Hemaglutinačně inhibiční testy (HIT) byly prováděny obvyklou metodou v celkovém objemu 1 ml, za použití 4 hemaglutinačních jednotek. Směs jednotlivých ředění séra (počínaje 1:8) a antigenu byla ponechána 30 minut při pokojové teplotě a pak přidána suspenze 0,4 % kuřecíchrvinek ve fosfátovém pufovaném fyziologickém roztoku (pH 7,2). Jako antigenů bylo používáno u všech typů chřipky a viru Sendai infikované alantoidní tekutiny, u kmenů parainfluenza 1 (HA2) a parainfluenza 2 (CA)

infekčního media buněčných kultur opičích ledvin. U chřipkových virů (A, A1, A2, B) byla reakce uskutečňována při pokojové teplotě, u kmenů parainfluenzy v lednici při +4 °C. Výsledky byly odečítány podle sedimentace krviček v kontrolách a jsou udávány jako konečná ředění vyšetřovaného séra. Ve všech vyšetřeních byly nespecifické inhibitory sér odstraňovány pomocí KIO<sub>4</sub> metodou doporučenou Gorbunovovou a spol. (1959).

Ke kontrole kvality antigenů pro HIT a k identifikaci izolátů byla použita tato séra: proti chřipce A, A1 a A2 rekonvalescentní séra fretčí, proti chřipce B a viru Sendai imunní séra krys, proti HA2 (parainfluenza 1) a CA (parainfluenza 2) imunní séra králíci; tato poslední nám byla poskytnuta prof. Wesslénem z Upsally.

V práci byly trvale používány tyto kmeny: chřipka A-PR8, A2-Singapur, B-Jihlava 1959 z chřipkové centrály v Praze; chřipka A1-Rh od dr. Fraňkové z VÚHEM; parainfluenza-Sendai z chřipkové centrály v Praze; parainfluenza-HA2 (kmen 222) od dr. Birkum-Petersena z Kodaně; parainfluenza-CA od prof. Wessléna z Upsally.

Neutralizačními testy (NT) byly prokazovány protilátky proti jednotlivým typům adenovirů, REO virů, viru Coe a ECHO viru. První etapu vyšetření představoval síťový test, v němž byla vždy vyšetřena séra titračně v ředěních 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40 a 1 : 80 s příslušným antigenem. Viry byly předem titrovány a pro NT bylo používáno takové ředění, které dávalo asi 100 TKID 50 v 0,1 ml při třídním pozorování. (Prakticky šlo u adenovirů o ředění základních suspenzí z tkáňových kultur asi na 1 : 2 až 1 : 10, podobně u virů REO a Coe; u virů skupiny ECHO zpravidla 1 : 1000 nebo 1 : 10000.)

Ve vlastním NT bylo míšeno stejnými díly různě ředěné sérum s příslušným ředěním viru. Směs byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě a pak z ní bylo přidáváno po 0,2 ml do zkumavek s narostlým povlakem buněčné kultury. Celkový objem tekutiny ve zkumavce činil 1 ml. Pokusy s adenoviry a virem Coe byly prováděny na buňkách HeLa, s ECHO a REO virem na kulturách z opičích ledvinových buněk. Při vyšetření každé skupiny sér byly vždy zařazovány kontroly kvality neinfikovaných kultur a kontroly cytopatogenity použitých ředění infekčních tekutin. Za pozitivní neutralizační aktivitu séra byla považována zábrana cytopatického jevu, která přetrvávala aspoň o 1 den déle degeneraci buněk v kontrole aktivity viru.

Kmeny adenovirů použité v práci (typ 1 až 7, 7a, 8, 10 až 17 a 19) nám byly předány dr. Syřůčkem z ÚEM v Praze. Kmeny ECHO virů (typ 8, 11 a 20) byly poskytnuty naší laboratoři dr. Vonkou z ÚSOL v Praze, kmeny REO virů (typ 1, 2 a 3) dr. Schuhovou z ÚEM, virus Coe rovněž dr. Syřůčkem.

Kontrolní imunní séra proti všem virovým prototypům užitým v NT jsme připravovali intraperitoneální imunizací králíků šesti injekcemi po 2 ml viru z tkáňových kultur v týdenních intervalech. Séra dosahovala průměrně titru 1 : 256 (iniciální ředění). Ani v ředění 1 : 4 neměla cytotoxický efekt a nejevila zkřížené mezitypové reakce.

### Shrnutí některých výsledků a metodické zkušenosti

#### 1. Zkušenosti z bakteriologického vyšetřování

Z výtěrů od 64 nemocných dětí (hospitalizovaných nebo onemocnělých ve školce) byly nejčastěji zachyceny *Streptococcus pyogenes* skup. A a *Stafylococcus pyogenes aureus* (ve 20 a 26 %). (U stafylokoků jsou započítány pouze ty kmeny, jejichž biochemické vlastnosti svědčí pro patogenitu.) Signifikantní vzestup titru ASLO byl zaznamenán při vyšetření 7 pacientů 3X a hladiny antihyázy ukázaly vzestup při vyšetření 3 pacientů 2X (u obou pozitivních na antihyázu byl pozitivní vzestup titru ASLO). Signifikantní vzestup titrů ASTL byl zaznamenán pouze v jedné dvojici vyšetřovaných sér ze sed-

mi. Z ostatních významějších mikrobů byl 1X izolován *Diplococcus pneumoniae* v M fázi, 1X *Hemophilus pertussis*, 3X *Hemophilus influenzae* s jedním vzestupem homologních aglutininů, 1X *Hemophilus parapertussis* bez aglutininů v sérech pacienta, 1X *Klebsiella pneumoniae* se 4násobným vzestupem aglutininů, 1X *Corynebacterium diphtheriae* nepatogenní pro morče. Kromě toho *Candida albicans* 2X ve větším množství.

Ze zkušeností jako celku jsme učinili závěr, že ze zachycených mikrobů měly přímý podíl na etiologii respiračních onemocnění dětí vedle streptokoků ojedinelé též pyogenní stafylokok, pneumokok M, H. *influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* a samozřejmě též původce pertusse. Značnou měrou umožnily tyto závěry výsledky sérologických vyšetření. U řady individuálních onemocnění jsme přisoudili bakteriální etiologii vedlejší význam (streptokoky, stafylokoky, smíšená bakteriální flóra aj.). Do značné míry jsme se při tom řídili kvantitativním hodnocením nálezu bakteriální kultivace. Toto hledisko bylo použito rovněž při posuzování etiologické významnosti *Candida albicans*.

#### 2. Zkušenosti z pokusů o izolaci virových původců.

Z celkového počtu 77 výchozích materiálů od nemocných dětí bylo zachyceno 14 virových kmenů (tj. asi 18 % pozitivních nálezů). 5X byl izolován virus chřipky A2, 1X neurčený hemadsorpční virus (pravděpodobně skupiny Parainfluenza), 2X adenovirus (typ 5 a 7), 1X virus Cocksackie B typ 4, 1X virus Cocksackie skupiny A, 4X virus herpetický. Chřipkové kmeny byly izolovány na kuřecích embryích a nepodařilo se je paralelně zachytit na opičích ledvinových buňkách. Hemadsorpční virus byl zachycen na opičích ledvinových buňkách v 1. pasáži a ve dvojici sér příslušného pacienta byl s ním prokázán více než 4násobný vzestup HI protilátek; v pozdějších pasážích na opičích ledvinových buňkách byl však vytěsněn kontaminujícím neurčeným opičím virem s hemadsorpčními vlastnostmi. Oba izolované kmeny adenovirů jsou z HeLa buněk a typ 7 byl paralelně prokázán rovněž na opičích ledvinových buňkách. Virus Cocksackie B4 byl zjištěn paralelně v opičích ledvinových buňkách a sajících myškách. Všechny 4 herpetické kmeny byly zachyceny na HeLa buňkách (3 z nich paralelně na sajících myškách, ale pouze 1 na opičích ledvinových buňkách a 1 na chorioalantois kuřecího zárodku).

Ačkoli náš materiál je nečetný, souhlasí zkušenosti z izolačních pokusů s chřipkou A2 s některými údaji z literatury o nižší citlivosti opičích ledvinových buněk než kuřecích embryí (WHO 1959). Počet 5 izolovaných kmenů chřipky A2 je relativně vysoký ve srovnání s celkovým počtem 6 infekcí, které byly prokázány jako chřipka A2 i s pomocí sérologického vyšet-

řování. Nález souhlasí se zkušenostmi Wesslénovými (osobní sdělení 1960).

Malý byl však v našich pokusech záchyt adenovirových kmenů, ve srovnání s celkovým počtem 12 signifikantních vzestupů protilátek s jednotlivými typy adenovirů v odpovídající sestavě sér hospitalizovaných dětí. Jedním z faktorů, které malý záchyt mohly podmiňovat, je skutečnost, že se nám nedařilo udržet HeLa buňky v pokuse déle než 8, nejvýše 10 dní. Příčinou může být jak složení udržovacího media (stejný díl Parkerova a Earleova roztoku se 3 % telecího séra a s antibiotiky), tak sama kvalita používané linie buněk. (Podle zkušeností Marhoulových — osobní sdělení 1960 — lze udržet kvalitní HeLa buňky po 14 dní v přítomnosti media, jehož základem je Eagleův roztok.) Důsledkem předčasné nespecifické degenerece HeLa buněk v našich pokusech bylo, že průměrná doba pozorování kultur očkovaných materiálem od nemocných během 3 prováděných pasáží byla 24 — 26 dní místo požadovaných aspoň 30 (WHO 1959). Druhým z faktorů by mohla být skutečnost, že velká část vyšetřovaných dětí byla přijata k hospitalizaci pro bronchopneumonii v době, kdy případy samy už většinou nejsou čerstvá onemocnění. A konečně třetí příčinou mohlo být, že jsme vyšetřovali pouze výtěry a ne též stolice nemocných. Vyšetřování stolic by však bezpochyby zkomplikovalo celou situaci záchytem enterovirů, jichž počet by mohl být značný a zatížil by neúměrně pracovní kapacitu laboratoře.

Vzhledem k sérologickým nálezům s virem Sendai (Danešová a spol., Daneš a spol., v tisku 1962) je s podivem, že se nám nepodařilo zachytit kmeny antigenně příbuzné s virem parainfluenzy typu 1 (byl izolován pouze jeden kmen neurčeného hemadsorpčního viru). Jednou z vážných příčin může být celkově špatná kvalita dodávaných opičích ledvinových buněk a pak i nedostatečná zkušenost, nejen naše, ale všeobecná. Dokladem toho jsou naše nálezy relativně časté kontaminace opičích kultur opičími viry. Během roku 1960 a 1961 jsme zachytili totiž řadu kontaminantů, které nevyvolávají v buňkách zřejmý cytopatický efekt, ale jejich přítomnost a množení lze prokázat hemadsorpčním testem s morčím erytrocyty. Zachycená hemadsorpční agens byla orientačně studována a rozdělena podle antigenních vlastností na dvě větší skupiny s 5 a 9 kmeny (prototypy OKL a 059). Podrobnější zkušenosti z této problematiky budou uvedeny v jiném sdělení. V každém případě je možno zdůraznit už na tomto místě, že při izolačních pokusech na opičích ledvinových buňkách je správné vyšetřovat hemadsorpčním testem velký počet kontrolních neinokulovaných zkumavkových kultur (asi 20 ze 100) nejen před očkovaním buněk, ale i při každém intervalu, kdy se k očkovaným kulturám přidávají za účelem průkazů lidských myxovirů erytrocyty.

Zajímavou, i když okrajovou otázkou jsou izolace herpetických kmenů. Počet 4 izolátů z cel-

kového počtu 77 výchozích materiálů je vysoký, avšak je v soulase se zkušenostmi z ojedinělých zpráv jiných pracovníků, např. Hamre a spol. [1961] a dříve už Birkum-Petersena [osobní sdělení 1959], který podobným způsobem vyšetřoval podobný soubor pacientů jako my v případě hospitalizovaných dětí. Nečekanou byla pro nás skutečnost, že kuřecí embrya při očkování na chorioalantois i opičí ledvinové buňky jsou málo citlivé ve srovnání např. s HeLa buňkami nebo s novorozenci myškami.

Z všeobecných zkušeností je účelné zmínit se ještě o toxickém vlivu primomateriálu na buňky a o problematice bakteriální a plísňové sterility během izolačních pokusů. Ze 77 vyšetřovaných výtěrů mělo 16 (tj. asi 20 %) částečný nebo úplný toxický vliv na HeLa buňky; z těchto 16 působilo toxicky 6 také na opičí ledvinové buňky (tj. více než 7 % celkového počtu). Při kontrole byly uvedené výchozí materiály shledány sterilními (bakterie a plísňové organismy). Nestерilních primomateriálů bylo z celkového počtu 14, tj. dalších asi 18 % (z toho 9 materiálů bylo kontaminováno plísněmi nebo kvasinkami). Nejčastěji se projevovала kontaminace v kuřecích embryích a v buněčných kulturách.

Uvedené skutečnosti citelně komplikovaly organizaci práce laboratoře. K odhalení toxického vlivu primomateriálů na buňky bylo nutné prohlížet kultury za 24 hod. po očkování a při opakování 1. pasáže vyměňovat za 2 — 6 hodin medium. Tím jsme se vyhnuli zbytečnému pasážování falešně pozitivních tekutin. Otázky kontaminace bakteriemi jsme vyřešili změnou antibiotik. Místo penicilínu a streptomycinu jsme do media pro tampóny přidávali kanamycin sulfát; později jsme kanamycin přidávali — vedle penicilínu a streptomycinu — také do udržovacích medií pro zkumavkové kultury. S plísňovými organismy byla větší obtíž. Často bylo třeba výchozí materiál k izolačním pokusům centrifugovat, k supernatantu pak přidávat amphotericin (20 j./ml) a tento prostředek přidávat pak ještě do media kultur. Přesto se nedařilo ve všech případech plísňové kontaminaci kultivačních systémů primomateriálem zabránit.

Všeobecně je možno říci, že k zvětšení pravděpodobnosti záchytu (širší spektrum původců) by stoupaly nároky na laboratoř až neúměrně. Např. by bylo třeba očkovat — vzhledem k zachycení respiračního syncytiálního viru — buněčné kultury před zmrazením odebraného materiálu (Beem a spol. 1961). K zachycení některých dalších agens by bylo třeba barvení opičích ledvinových buněk, nebo by se musela podstatně zvýšit jejich kvalita a podobně. Na druhé straně svědčí některé naše zkušenosti pro to, že by mohl být zkrácen počet systémů, na nichž provádíme izolaci původců. Nečtetně se vyskytující náznaky Q-horečkou, ornitózou aj. by bylo možno mezi jednotlivými onemocněními prokazovat pouze na podkladě sérologického vyšetření. Vzhledem k možnosti spolehlivé detekce

| Antigen                       | Procento<br>pozitivních sérologických nálezů |                                         |
|-------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------|
|                               | v souborech sér<br>dětí (2× po 50)           | v souboru sér<br>vojáků<br>(220 vzorků) |
| Chřipka A<br>(KFR)            | 8,4                                          | 76,3                                    |
| Chřipka B<br>(KFR)            | 9,4                                          | 58,1                                    |
| Adenoviry<br>(KFR)            | 26,9                                         | 54,1                                    |
| Parainfluenza<br>Sendai (KFR) | 33,8                                         | 60,0                                    |
| Parainfluenza<br>HA2 (HIT)    | 10,1                                         | 4,0                                     |
| Parainfluenza<br>CA (HIT)     | 13,0                                         | 10,9                                    |

herpesu na HeLa buňkách by bylo možné po-  
minout očkování na chorioalantois kuřecího  
embrya, takže by pak stačily tyto systémy: ku-  
řecí embryo intraamnioticky, opičí ledvinové  
buňky, HeLa buňky a sající myšky.

### 3. Zkušenosti ze sérologického vyšetřování s virovými antigeny.

Vzhledem k tomu, že výsledky sérologického  
vyšetřování s virovými antigeny jsou podrobně  
popsány v předcházejících pracích (Danešová  
a spol., Daneš a spol., Rehn a spol. — v tisku  
1962), omezíme se v této kapitole pouze na shr-  
nutí a porovnání nejpodstatnějších pozorování.

Sérologický průzkum prováděný s antigeny  
chřipky (A a B), parainfluenzy (HA2, Sendai,  
CA), adenovirů, ECHO virů (typy 8, 11, 20), REO  
virů (typy 1, 2, 3), viru Coe, ornitózy, LCM a pů-  
vodce Q-horečky ukázal, že v rámci studovaných  
souborů mají zásadní význam viry chřipky (ze-  
jména u dospělých), z parainfluenzy viru Sendai  
a z ostatních adenoviry (viz níže tabulka). Na-  
proti tomu zcela minimální byly nálezy u LCM,  
Q-horečky a REO virů.

Studium protilátkového promoření, prováděné  
u dětí a vojáků, nabízí porovnání výsledků zís-  
kaných u obou souborů (viz tabulka shora).  
U chřipky A i B je s podivem, jak malé procen-  
to dětí vykazuje anamnestický styk s chřipko-  
vým antigenem proti velkému množství pozitiv-  
ních nálezů u dospělých. U viru Sendai nejsou  
již rozdíly tak podstatné a ještě vyrovnanější  
jsou hladiny HI protilátek u viru CA. Překva-  
pivě vysoké procento promoření dětí i dos-  
pělých virem Sendai nese s sebou závažné otázky  
týkající se problému specifčnosti získaných ná-  
lezů ve vztahu k viru HA2, s nímž je Sendai anti-  
genně příbuzný, a k parotitidě. Z hlediska toho-  
to problému je možno analyzovat výsledky vy-  
šetření párových sér u 67 hospitalizovaných dětí,  
u nichž byl více než 4násobný vzestup KF pro-  
tilátek proti viru Sendai zaznamenán 6x a 10x  
u dvojic nebo trojic sér dětí ze školky. Para-  
lelně provedený HIT s virem HA2 byl u všech  
vzorků negativní a je tedy možno se domnívat,

že získané nálezy jsou specificky vztaženy k vi-  
ru Sendai. V jakém poměru jsou KF titry s anti-  
genem Sendai k parotitidě, nemůžeme objek-  
tivně zhodnotit, protože vyšetření nemohlo být  
ani dodatečně provedeno pro nedostatek jednot-  
livých dětských sér. Protože během studia res-  
piračních nákaz u dětí — jmenovitě ve škol-  
ce — probíhala epidemie parotitidy a spalniček,  
není vyloučeno, že nálezy protilátek Sendai,  
alespoň některé, jsou výrazem heterologní od-  
povědi organismu na antigenní podnět paroti-  
tickým virem. Pro takový závěr by svědčily ná-  
lezy Janscá a Simona (1961) i starší práce Gar-  
dnera (1957, 1960) a de Meio s Walkerem  
(1957).

Zkušenosti získané při sérologické diagnosti-  
ce parainfluenzových infekcí se dotýkají i pro-  
blému volby metod pro průkaz protilátek. Sou-  
díme, že je třeba dát přednost HI testu — přes  
nutnost odstraňovat ve zkoumaných sérech  
nespecifické inhibitory — poněvadž je to reakce  
specifičtější než KFR; to je při složitosti anti-  
genní skladby ve skupině lidských myxovirů  
zvláště důležité, zejména jde-li o určení etiolo-  
gie onemocnění. Druhým, neméně významným  
důvodem je podstatně vyšší citlivost HIT proti  
KFR u parainfluenzy typu 1 (HA2), jak to zdů-  
razňují výsledky práce Ždanova a Bukrinské  
(1959) i Chanocka a spol. (1960).

Vyšetřování sér pomocí NT umožnilo získat  
některé zajímavé výsledky vztahující se k pro-  
mořenosti populace adenoviry, REO a ECHO  
viry. Nejčastěji byly pozitivní nálezy zjišťovány  
proti adenovirům tzv. neepidemických typů (1,  
2,5) a převážně šlo o nízké titry, svědčící buď  
o nevýrazném nebo již dávno prodělaném anti-  
genním podnětu. Nálezy protilátek proti celé  
řadě adenovirových typů byly v sérech běžné  
a často se vyskytovaly proti více typům u téhož  
jedince (i u dětí). Proti jiným než tzv. latent-  
ním typům adenovirů se objevovaly protilátky  
v nízkých i vysokých titrech rovnoměrněji. Ná-  
lezy titrů protilátek k adenoviru typu 8 — ně-  
kdy i vysokých nebo dokonce se vzestupem  
v druhém séru — bez současného průkazu spo-  
jení s očním onemocněním ukazují, že adeno-  
virus typu 8 může vyvolávat buď také jinou sym-  
ptomatologii než oční, nebo vyvolává nemani-  
festní nákazy. Nález protilátek proti adenovirům  
typu 15,19, proti viru Coe a REO 1 je u nás za-  
znamenán po prvé, avšak svědčí o pravděpo-  
dobném malém rozšíření těchto původců v naší  
populaci.

Signifikantní vzestup neutralizačních protilá-  
tek proti adenovirům byl v obou souborech dět-  
ských sér (67 párů sér hospitalizovaných dětí  
a 50 dvojic, resp. trojic sér dětí ze školky) zjiš-  
těn celkem 19x, tj. v 16,2 %; z toho typ 2 1x,  
typ 4 1x, typ 5 4x, typ 7 6x, typ 7a 2x,  
typ 8 3x, typ 10 1x, a typ 13 1x. Nejméně  
v sedmi případech jde s největší pravděpodob-  
ností o průkaz klinicky nemanifestní infekce.  
Signifikantní vzestup KF protilátek proti ade-  
novirům však byl zaznamenán pouze 8x, z toho

6X paralelně s neutralizačními protilátkami, 2X bez nálezu neutralizačních protilátek. Konfrontace výsledků KFR a NT ukazují tedy častěji nesouhlas. Vzestup KF protilátek bez průkazu protilátek neutralizačních může svědčit o účasti některého typu adenoviru, s nímž nebyl NT proveden. V opačném případě je vysvětlení obtížnější. Některé případy vedou k podezření, že KF protilátky se netvoří pravidelně, jde-li o nákazu některým tzv. latentním virem nebo o nákazu přidruženou-vedlejší při onemocnění vyvolaném jiným původcem. Že naše zkušenosti nejsou ojedinělé, svědčí i výsledky v ÚEM Praha (Soběslavský — osobní sdělení 1961). K podrobnému rozboru otázky je třeba nashromáždit více materiálu.

Je možno shrnout, že sérologické metody s virovými antigeny měly v naší práci mnohem větší podíl na objasnění etiologie respiračních onemocnění než izolační pokusy. Podmínkou pro jejich správné využití je nutnost mít k dispozici kvalitní antigeny a zvláště pak i kontrolní imunní séra. Je správné dávat přednost technikám specifickým před méně specifickými nebo skupinovými, pokud to dovoluje kapacita laboratoře.

### Diskuse a závěry

Rozsah práce při studiu etiologie a epidemiologie akutních respiračních nákaz je určen zaměřením a cílem. Náročné a přitom relativně nejméně úspěšné co do výsledků je objasňování etiologie jednotlivých respiračních onemocnění, která jsou bez epidemické souvislosti. Při rozhodování o etiologii u těchto případů (dětí) jsme se drželi běžných kritérií, tj. především jsme se opírali o kultivační nález (záchyt mikroorganismů) a o průkaz signifikantního vzestupu specifických protilátek k známým antigenům. Zejména při izolaci původců s méně vyhraněnou patogenitou pro člověka bylo nutno vždy doplňovat výsledky o vyšetření na homologní protilátky. K odlišení bakteriální a virové etiologie nebylo možno použít výsledků vyšetření krevního obrazu nemocných, jak doporučuje pro některé případy skupinová diskuse v USA (Mc Dermott a spol. 1961), ani klinického hodnocení efektu podaných antibiotik.

Jen u části úspěšně objasněných případů jsme mohli učinit jistou etiologickou diagnózu. U většiny ostatních je nutno považovat etiologický závěr pouze za pravděpodobný. V případech, kde laboratorní nálezy svědčily pro dvojí nebo vícečetnou etiologii, jsme se snažili analýzou všech dat z vyšetřování určit základního (hlavního) a přidruženého (vedlejšího) původce. Při rozhodování u všech těchto uvedených onemocnění jsme brali v úvahu patogenitu toho kterého původce pro člověka a protilátky v obou sérech jsme hodnotili nejen z toho hlediska, kolikrát stouply v titru, ale posuzovali jsme i absolutní výši titrů v séru z akutní fáze a rekonvalescence. Kromě toho jsme zvláště hodnotili celý průběh onemocnění.

Některým pozitivním nálezům jsme přisuzovali vždy pouze vedlejší nebo žádnou etiologickou významnost. Konkrétně se to týká:

- a) některých kultivačních nálezů bakteriologických (viz výše)
- b) některých pozitivních nálezů sérologického vyšetřování, pokud vzestup protilátek dosahoval pouze k hodnotám pod hranice specifické signifikance (zvláště obezřetně jsme posuzovali výsledky s virem Sendai — viz výše)
- c) izolací virů ze skupiny Cocksackie (zvláště skupiny A)
- d) izolací herpetického viru

Jak bylo uvedeno v úvodu práce, nerozpoznali jsme etiologicky téměř polovinu respiračních onemocnění. Jednou z příčin — mimo jiné — je skutečnost, že jsme nevyčerpali (lépe řečeno nemohli vyčerpát) všechny současné možnosti laboratorních vyšetření. V souboru metod nebylo zařazeno např. vyšetřování na některé nově vyčleněné viry (virus respiračně syncytiální, virus SA, Rhinoviry aj.); zjevným nedostatkem je zkrácení vyšetřování s Eatonovým agens a s virem parotitidy. Úplná kompletizace vyšetřovacích metod však je v našich podmínkách zatím nedosažitelná. Kromě toho by si vyžadovala větší skupiny pracovníků. Je oprávněné soudit, že i pak by zůstalo značné procento případů neobjasněných. Jednak proto, že dosud nejsou poznána všechna etiologická agens respiračních infekcí, jednak proto, že se v patogenetickém mechanismu vzniku respiračních infekcí zřejmě uplatňují i jiné faktory, jako je např. reaktivita organismu a podobně (Danešová a spol., v tisku 1962).

Ve své práci jsme se rovněž pokusili studovat akutní respirační infekce v uzavřeném dětském kolektivu. Provedli jsme opakované odběry krve na promořenost k virovým nákazám a sledovali jsme nemocnost a vyšetřovali všechna jednotlivá onemocnění (kromě zjevných spalniček a příušnic). Rozbor podrobností tohoto studia nezapadá do poslání předkládaného sdělení. Lze pouze shrnout, že tento způsob práce — s použitím komplexního vyšetřování etiologie — je ještě náročnější, než je tomu u studia etiologie jednotlivých infekcí. Za předpokladu dobré organizace, na niž je činěn největší nárok, přináší však velmi cenné výsledky, které se znásobují délkou doby, po kterou je kolektiv sledován. Z metodologických zkušeností je třeba upozornit na to, že musíme velmi uvážlivě volit základní spektrum vyšetření a pak prohlubovat podle situace o další doplňkové metody, aby byla postihnuta do podrobností celá složitost epidemického procesu.

Všechny tyto uvedené závěry se týkají dětské populace. Je zřejmé, že při komplexním studiu respiračních infekcí u dospělých by bylo třeba modifikovat soubor vyšetřovacích metod a možná i některá hlediska hodnocení výsledků a rozhodování o etiologii. Mimo práce z jiných labo-

ratoří tomu rovněž nasvědčují naše výsledky, získané při studiu promořenosti vojáků k virovým infekcím (Rehn a spol., 1962).

### Souhrn

V práci je pojednáno o metodologických zkušenostech z komplexního studia etiologie akutních respiračních nákaz. Je popsána do značných podrobností pracovní technika mikrobiologického vyšetřování materiálu. Použité metody jsou zhodnoceny vzhledem k některým výsledkům a je porovnán — zvláště u vyšetřování virologického — jejich význam a podíl při objasňování etiologie. Závěrem jsou shrnuty zkušenosti týkající se problematiky rozhodování etiologie z výsledků a je provedeno zhodnocení použití komplexního vyšetřování ve výzkumu akutních respiračních infekcí.

### Резюме

В работе рассмотрены методологические вопросы комплексного изучения этиологии острых инфекций дыхательных путей. Весьма детально описана техника микробиологического исследования материала. Проведена оценка примененных методов с учетом некоторых достигнутых результатов. Далее автор сравнивает друг с другом все эти методы — в особенности те которые применяются в вирусологии — и указывает значение и удельный вес каждого из них при объяснении этиологии упомянутых заболеваний. И наконец, в статье рассмотрен вопрос, в какой степени можно делать заключение об этиологии заболевания на основании полученных результатов и проведена оценка применения комплексного исследования при изучении острых инфекций дыхательных путей.

### Summary

The methods used in a complex study of the aetiology of acute infections of the respiratory

system are reported. The technique of the microbiological investigation of the material is presented in detail. The used methods — particularly the virological — are evaluated as to their value in clarifying the aetiology of the disease. Finally experiences regarding the determination of the aetiology are summarized and the value of a complex examination in acute respiratory infections is assessed.

### Písemnictví

- Babudieri, B. (1953) Bull. WHO 19: 193.  
 Beem, M., Wright, F. H., Hamre, D., Egerer, R., Oehme, M. (1960) New Engl. J. Med. 263: 523.  
 Behringswerke Lab. (1957), Reagenzien der Behringswerke, ihre praktische Anwendung im sero-bakteriologischen Laboratorium. I. Beiheft zu „Laboratoriums-Blätter“, 38.  
 Behringswerke Lab. (1958) dtto II., 103.  
 Daneš, L., (1958) Čs. EMI VII: 226.  
 Daneš, L., Rehn, F., Danešová, J., Hejzlar, M., Benda, R., Činát, J. (v tisku 1962) Čs. pediatrické listy.  
 Danešová, J., Hejzlar, M., Benda, R., Rehn, F., Daneš, L., Činát, J. (v tisku 1962) Čs. pediatrické listy.  
 De Meo, J. L., Walker, D. L. (1957) J. Immunol. 78: 465.  
 Gardner, P. S. (1957) Brit. med. J. 1: 1143i.  
 Gardner, P. S. (1960) J. Hyg. (Cambr.) 58: 283.  
 Gorbunova, A. S., Stachanova, V. M., Ložkina, A. N., Olli, V. D. (1959). Vopr. virusol. No 6: 750.  
 Grayston, J. T., Laskof, J. C., Loosli, C. G., Johnston, P. B. (1958) J. Infect. Dis. 103: 93.  
 Hamre, D., Laskof, J. C., Marshall, J. A., Cassidy, J. E., Smith, M., Bennet, C. R. (1961) Amer. Rev. Respirat. Dis. 83: 38.  
 Chanock, R. M. (1958) J. Exper. Med. 104: 555.  
 Chanock, R. M., Parrott, R. H., Cook, K., Andrews, B. E., Bell, J. A., Reichelderfer, T., Kapikian, A. Z., Mastrota, F. M., Huebner, R. J. (1958) New Engl. J. Med. 258: 207.  
 Chanock, R. M., Vargosko, A., Luckey, A., Cook, M. K., Kapikian, A. Z., Reichelderfer, T., Parrott, R. H. (1959) J. A. M. A. 169: 548.  
 Chanock, R. M., Wong, D. C., Huebner, R. J., Bell, J. A. (1960) J. Publ. Health 50: 1858.  
 Jancsó, A., Simon, M. (1961) Acta microbiol. Ac. Sc. Hung. VIII: 321.  
 Johnson, K. M., Chanock, R. M., Cook, M. K., Huebner, R. J. (1960) Amer. J. Hyg. 71: 81.  
 McDermott, W., Rogers, D. E., Kilbourne, E. D., Rose, H. M. (1960) Panel Meeting. Bull. N. Y. Acad. Med. 36: Nr 1, pp 54.  
 Raška, K., a spol. (1958) Mikrobiologické vyšetřovací metody, SZN, Praha, 225 a 269.  
 Rehn, F., Daneš, L., Činát, J. (1962) Vojenské zdravotnické listy XXXI : 150.  
 Smedel, J. E., Baird, R. D., Wall, M. J. (1939). Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 40: 71, a J. Exper. Med. 70: 53.  
 Volkert, M., Christensen, P. M. (1955). Acta pathol. et microbiol. scand. 32: 211.  
 World Health Org. Techn. Rep. Ser. (1953) 64: 15.  
 World Health Org. Techn. Rep. Ser. (1959) 170: pp 59.  
 Zdanov, V. M., Bukrinskaja, A. G. (1959). Vopr. virusol. No 5: 624.