

616-022.7-022.3(614.71)-032(611.2)-078

BIOLOGICKÝ TEST NA UMĚLE OSLABENÝCH ZVÍŘATECH A MOŽNOSTI JEHO POUŽITÍ KE SPECIFICKÉ DETEKCI INFEKČNÍCH AEROSOLŮ*)

Major ScC. MUDr. Jiří FRANĚK

V systému protiepidemického zabezpečení vojsk má prvořadý význam ochrana proti infekcím, které se šíří vzduchem. Vyplývá to z některých zvláštností vzdušného mechanismu přenosu. Patří k nim především to, že aerogenní cestou se může šířit mimo tzv. kapénkové infekce i celá řada dalších, mezi nimi i vysoce nebezpečné, jako mor, anthrax, tularémie, brucelosa, malleus a melliodosa, ornithosy, žlutá zimnice a jiné. Přitom inhalační mechanismus infikování je vysoce efektivní. Jak ukázaly experimentální práce např. s *B. anthracis*, aerogenní infekce je asi 1000krát nebezpečnější než alimentární infekce (J. Barnes, 1948). Podobné výsledky byly získány v různých pracích s botulinickým toxinem. Tento toxin je při proniknutí do organismu inhalační cestou asi stejně nebezpečný jako při podkožní aplikaci. Ve srovnání s přirozeným alimentárním mechanismem se nebezpečí intoxikace zvyšuje několik tisíckrát (L. Fothergill, 1958; A. Jakovlev, 1958). Konečně význam vzdušného způsobu šíření infekce je zvyšován i neobyčejnou jednoduchostí tohoto přenosu a universálností vzduchu jako faktoru přenosu. Proto právě tímto způsobem mohou být postiženy v krátkém časovém úseku velké kolektivy. A proto také k infekčním aerosolům opakovaně obrací pozornost američtí specialisté pro přípravu bakteriologické války. (T. Rosebury, 1949; A. Wedum, 1956; L. Fothergill, 1958).

Účinnost protiepidemických opatření závisí zejména při umělém použití infekčních aerosolů

na včasné detekci infekčního agens ve vzduchu. Úkol takové detekce je ovšem velmi obtížný. Jak vyplývá z uvedených zvláštností aerogenního přenosu, metody detekce musí splňovat několik velmi důležitých požadavků. Především musí umožnit zjištění přítomnosti celé řady vysoce patogenních zárodků (baktérií, rickettsií i virů) a také botulinického toxinu ve vyšetřovaném vzorku. Protože aerogenní způsob infikování je neobyčejně účinný, mohou být z epidemiologického hlediska nebezpečná i malá kvanta zárodků a toxinu. Proto druhou vlastností metod specifické detekce musí být vysoká citlivost. A konečně třetím požadavkem je samozřejmě rychlost vyšetření.

Otázky spojené s detekcí infekčních aerosolů se tedy dotýkají dvou základních problémů: především je třeba získat dostatečně velké vzorky vzduchu, při maximální zachytivosti částic menších než 5 mikron (které jsou nejnebezpečnější fází aerosolů). Jak známo tento úkol je dnes vcelku úspěšně řešen např. použitím rozpustných želatinových filtrů nebo některých aparátů typu impingerů. Za druhé je nutno vypracovat vysoce citlivou a rychlou metodu bakteriologické diagnostiky s co nejširším diagnostickým rozsahem, což bylo úkolem i naší experimentální práce.

Její těžiště bylo v rozpracování zrychlené diagnostické metody s použitím uměle oslabených zvířat. K zeslabení obranných mechanismů byl používán kortison. Ve srovnání s druhými soudobými způsoby zvyšování vnímavosti k infekci, jakým je např. ozáření rtg. paprsky nebo aplikace zymosanu, kortison nejlépe vyhovoval

*) Předběžné sdělení, přednesené na konferenci VLVDU v říjnu 1959.

z několika důvodů. Především jde o továrně vyráběný preparát, poměrně standardní a v našich podmínkách dosažitelný. A za druhé, díky rozsáhlému použití kortisonu v klinické praxi a velké pozornosti, která mu byla v posledních letech věnována v experimentální medicíně, byl tento hormon všestranně prozkoumán. Při studiu komplikací, které mohou vzniknout při jeho léčebném použití, bylo v pokusech s různými zárodky na různých laboratorních zvířatech opakovaně dokázáno, že kortison v určitých dávkách podstatně snižuje resistenci organismu. Byly dostatečně podrobně objasněny mechanismy jeho účinku a také patologicko-anatomické a patologicko-fysiologické změny nastávající pod jeho vlivem v organismu. Tím vším byly vytvořeny předpoklady pro použití kortisonu k vypracování praktické diagnostické metody, což bylo ovšem spojeno s vyjasněním řady nových specifických otázek. K nim patří zjištění podmínek zabezpečujících maximální účinnost kortisonu jak na zvýšení vnímavosti zvířat k infekci, tak na zrychlení infekčního procesu. Dále je to otázka změn v dynamice rozmnožování patogeních mikrobů v oslabeném organismu, zejména v počátečním období rozvoje infekce. Další otázkou je zachování specifičnosti klinického a patologicko-anatomického obrazu u zeslabených infikovaných zvířat. A konečně podstatný význam pro ocenění praktické použitelnosti metody má sledování komplikací, které mohou vzniknout při práci na oslabených zvířatech.

Metody

Práce byla provedena na bílých myších o váze 16–18 g (jednak z farmy Tábor — kmen „H“, jednak z chovu Vojenské lékařské akademie v Leningradě). V hlavních pokusech byla zvířata infikována kmenem *Klebsiella pneumoniae*, patogenním pro bílé myši, který sloužil k vyvolání modelové vysoce nebezpečné infekce. V jednotlivých pokusech byly myši infikovány kmeny *Past. pestis* a *B. anthracis* z živých vakcín sovětské výroby. Jak známo, tyto živé vakcíny zachovávají částečně patogennost pro laboratorní zvířata. Konečně část pokusů byla provedena s botulinickým toxinem typu A.

Hormon, kortison acetát belgické výroby, byl aplikován v různých dávkách, pravidelně podkožně.

Koncentrace bakteriálních suspenzí byla měřena srovnáním s optickými standardy pro výrobu vakcín a ověřována kontrolními výsevy na agarové půdy.

Příčina smrti byla u všech oslabených zvířat prověřována bakteriologickým vyšetřením orgánů.

Výsledky

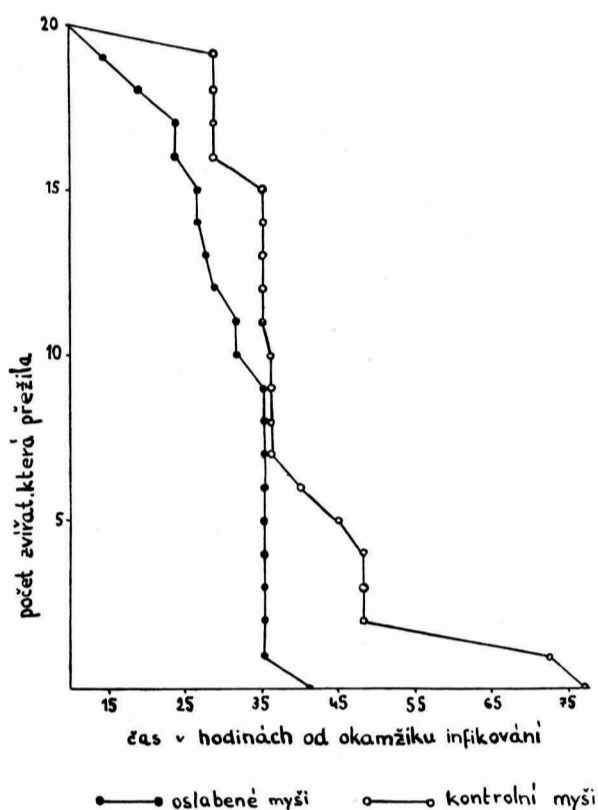
Pokusy potvrdily z literatury známé údaje o tom, že aplikace kortisonu podstatně zvyšuje vnímavost zvířat k infekci. Tuto obecnou představu o účinku hormonu se podařilo upřesnit

tím, že byla sledována kvantitativní stránka otázky, tj. závislost účinku kortisonu nejen na dávkování samého preparátu, ale i na velikosti infekční dávky mikrobů. Poslední faktor má podstatný význam. Jestliže totiž oslabené myši infikujeme dávkou absolutně letální pro normální myši, pak průběh infekčního procesu zvířat v obou skupinách se liší jen nepatrně (obr. 1). Se snížením infekční dávky vzrůstá význam oslabení. Zatím co ve skupinách kontrolních myši postupně narůstá počet zvířat, která přežívají, u oslabených pozorujeme stále vysoké procento uhynulých. Přitom rychlost průběhu infekce se u oslabených zvířat nezmenšuje buď vůbec, nebo jen nepatrně (obr. 2).

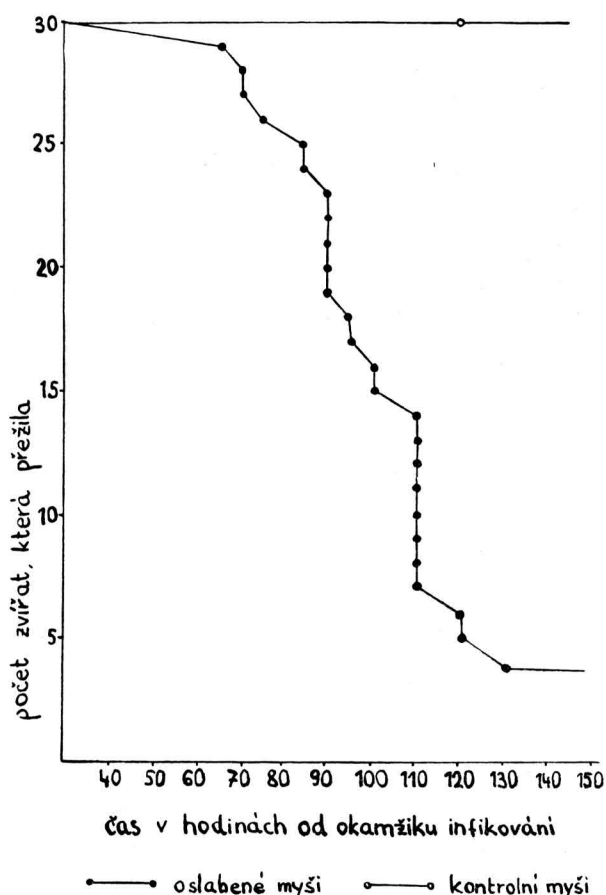
Tyto výsledky se zákonitě opakovaly v různých pokusech nezávisle na tom, zda byly myši infikovány kmenem *Klebs. pneumoniae*, *Past. pestis*, *B. anthracis* nebo botulinickým toxinem.

Ve všech pokusech byla zvířata oslabena předem vytitrovanou dávkou kortisonu, zabezpečující jeho optimální efekt. Byla to dávka 11,5 mg, aplikovaná po částech postupně 48, 24 a asi 1 hodinu před infikováním.

Umělé oslabení kortisonem tedy může mít podstatný význam v těch případech, kdy vyšetřovaný materiál obsahuje minimální množství hledaných patogenních zárodků; přitom se uplatní především účinek na zvýšení vnímavosti k infekci. Pokud jde o zrychlení infekčního procesu, není tak velké, aby stačilo požadavkům kladeným na metody specifické detekce.



Obr. 1. Účinek kortisonu na průběh experimentální infekce, vyvolané u bílých myši aplikací absolutně letální dávky *Klebsiella pneumoniae*



Obr. 2. Účinek kortisonu na průběh experimentální infekce, vyvolané u bílých myši aplikací subletální dávky *Klebsiella pneumoniae*

Pro vlastní zrychlení diagnostiky může mít daleko větší význam účinek kortisonu na dynamiku rozmnožování patogenních mikrobů v organismu oslabených zvířat. Ukázalo se totiž, že je u nich podstatně zkráceno počáteční období latence v rozvoji infekce. Daleko dříve než u normálních zvířat začíná intenzivní rozmnožování mikrobů v některých orgánech (zejména ve slezině) a velmi brzy nastupuje generalisace infekčního procesu, která se projevuje masivní bakteriémií. V pokusech s kmenem *Klebs. pneumoniae* v dávce asi 10 000krát menší než LD₅₀ pro normální zvířata, aplikované podkožně, byla generalisace opakovaně dokázána u více než poloviny pokusných zvířat ke konci prvního dne po infikování a u všech do 48 hodin.

U kontrolních zvířat byla bakteriémie nacházena až v premortálním stadiu, tj. i po infikování dávkami podstatně vyššími, ne dříve než ke konci 3. až 4. dne.

Jak ukázaly později pokusy pracovníků Proti-morového ústavu v Rostově na Donu, stejné změny v dynamice rozmnožování nastupují u zvířat infikovaných vysoce virulentními kmeny *Past. pestis* a *Past. tularensis*. V obou případech je možné u oslabených zvířat mikroskopicky dokázat masivní rozmnožení mikrobů v orgánech už asi za 14 až 18 hodin po infikování jednotlivými mikrobi. Přitom oslabená zvířata hynou poměrně pozdě, po několika dnech, v zhruba stejných intervalech jako kontrolní. Tyto

pokusy, provedené v laboratoři prof. Droževkiny, plně potvrzují reálnost využití časné generalisace infekce u oslabených zvířat k rychlé diagnostice.

Použitím uměle oslabených zvířat se v takovém případě dosáhne především rychlého a přitom selektivního pomnožení vysoce patogenních zárodků. Banální saprofytní mikroby v množství, která přicházejí v úvahu ve vzorcích z prostředí, jsou totiž i oslabeným organismem rychle ničeny a nerozmnožují se v něm. Kromě toho patogenní mikroby, které se mohou v prostředí nacházet v netypických formách (např. jako spory nebo jako lyofilisovaný materiál), pasáží na zvířeti nabývají pravidelně typických vlastností. Účinnost biologické zkoušky je tak spojována především s vlastností, která má pro epidemiologa rozhodující význam, totiž s patogenitou.

V provedené práci bylo hlavním úkolem vypracovat způsob použití oslabených zvířat. Otázka rychlé identifikace zárodku v organismu nebyla vlastním úkolem práce. Proto jsme se omezili na použití obyčejné mikroskopie, v některých případech doplněné metodou zrcadlových otisků podle Bermana. Při této metodě se orgánové řezy otisknou na agarovou půdu a po 3 až 4 hod. kultivace se provede „zrcadlový“ otisk z této půdy na podložní skličko. Specifičnost nálezů byla ve všech případech ověřována kultivací orgánových suspenzí nebo hemokultur. Pro účely rychlé diagnostiky by bylo jistě nejvýhodnější použití fluorescenčních sér. Na tomto úkolu se nyní pracuje.

Praktická použitelnost oslabených zvířat závisí dále na zachování specifičnosti klinického a patologicko-anatomického obrazu. Námi používané modelové infekce nebyly zcela vhodné pro sledování této otázky. Některá pozorování je však přesto možno uvést.

V pokusech s botulinickým toxinem byl typický obraz parés zachován úplně. Pokud jde o použité bakteriální infekce, je pro ně vcelku charakteristický obraz hemorrhagické sepse. U oslabených zvířat byly příznaky (hemorrhagie v uzlinách, injekce podkožních cév apod.) všeobecně slaběji vyjádřeny. Zcela chyběla septická reakce sleziny, která byla naopak silně atrofická, zmenšená. Na druhé straně takové příznaky, jako tvorba huspeninového ascitu u myši, infikovaných intraperitoneálně zárodky anthraxu nebo tvorba drobných šedobílých nekrotických ložisek ve slezině po infikování *Past. pestis*, byly u oslabených zvířat pozorovány zcela pravidelně v charakteristické formě. S názory některých autorů, že se v oslabeném organismu infekce šíří zcela volně, bez jakýchkoli obranných reakcí ze strany organismu a tedy i bez typických klinických a anatomických příznaků, nemůžeme souhlasit. I když anatomické změny skutečně jsou, díky potlačení zánětlivých reakcí, vyjádřeny slaběji, jejich charakter je vcelku zachován. Mimoto masivní nahromadění patogenních mikrobů v krvi a orgánech, dosahující zcela neobvyklého stupně, bakteriologickou diagnostiku naopak velmi usnadňuje.

Konečně poslední otázkou spojenou s použitím

oslabených zvířat je charakter a frekvence komplikací vzniklých v důsledku celkového snížení resistance organismu.

Především kortison v dávkách nutných pro dostatečné zvýšení vnímavosti k infekci má toxický účinek. Jeho projevem je smrt části pokusných zvířat, počínaje 5. až 7. dnem od aplikace hormonu. Podle velikosti dávky kortisonu po 10 dnech hyne až 50 % oslabených zvířat.

Tato komplikace nevádí praktickému použití oslabených zvířat při splnění dvou základních předpokladů práce s nimi: za prvé je nutné mít vždycky zvířata čerstvě připravená kortisonem, a za druhé sama smrt pokusných zvířat nemůže být rozhodujícím diagnostickým příznakem; diagnosa musí být v každém případě potvrzena izolací kultury. Výjimkou je jen diagnosa botulotoxinu, kdy klinický obraz je natolik jasný a jednoznačný, že příčinu smrti není nutné dále ověřovat.

Dále asi u 30 z více než 1000 oslabených zvířat, použitých v našich pokusech, došlo k porušení sterility vnitřních orgánů a krve v důsledku rozmnožení banální střevní mikroflóry. Tato komplikace, často zdůrazňovaná v literatuře, se tedy vyskytuje v méně než 3 % a nemůže být vážnou překážkou.

Nejzávažnější je podle našich výsledků účinek oslabení kortisonem na aktivaci latentní infekce. Setkali jsme se s ním ve třech pokusech. Ve dvou šlo o latentní infekci způsobenou *S. newport*, v jednom byla vyvolána *S. typhi murium*. Ve všech případech už během 1. dne po aplikaci kortisonu došlo k intenzivnímu rozmnožení salmonel v orgánech, přičemž vlastní experimentální infekce se rozvíjela velmi slabě, v některých případech byla zcela potlačena. Po-

kus sanovat myši s latentní infekcí podáváním in vitro vysoce účinných antibiotik byl naprosto bezúspěšný.

Práce se zvířaty z prověřeného kontrolovaného a naprosto zdravého chovu je tedy poslední základní podmínkou jejich úspěšného použití.

Závěry

Biologický test na bílých myších uměle oslabených kortisonem dovoluje detekci minimálních kvant mikrobů druhu *Past. pestis*, *B. anthracis*, *Klebs. pneumoniae* a také botulinického toxinu během 12–24 hodin. Pokud jde o bakteriální infekce, nejefektivnějším způsobem použití oslabených zvířat je využití změn v dynamice rozmnožování patogenních mikrobů, zejména rychlého nástupu generalisace infekce, provázené masivní bakteriemií.

Hlavními přednostmi této metody je její vysoká citlivost, poměrně široký diagnostický rozsah, a to, že je založena na využití z epidemiologického hlediska nejdůležitější vlastnosti infekčního agens — vysoké patogenity. Pro tyto své vlastnosti je metoda vhodná zejména k detekci infekčních aerosolů.

Základním předpokladem úspěšného použití oslabených zvířat k rychlé diagnostice je práce se zvířaty z kontrolovaného zdravého chovu.

Písemnictví

1. Barnes, J. M.: Brit. J. Exp. Path. 1947, 28:385–394.
2. Fothergill, L. D.: Military Med., 1958, 123:16–22.
3. Fothergill, L. D.: Bact. Rev., 1957, 21:249–251.
4. Jakovlev, A. M.: Disertace, Leningrad 1958.
5. Roseburg, T.: Peace or pestilence, New York 1949.
6. Wedum, A. G.: JAMA, 1956, 162:34–37.
7. Droževkina, M. S.: ústní sdělení, 1959.