

ry we wszystkich badaniach wyrażała się odczynem dodatnim. Oceniając indywidualną wrażliwość na tuberkulinę krów grupy A, obserwowano, począwszy od 6. kolejnego badania, u pojedynczych zwierząt obniżenie tej wrażliwości do poziomu odczynu wątpliwego. W ostatniej tuberkulinizacji u 11 krów grupy B obserwowano zmniejszenie odczynowości skóry, przy czym u 2 krów (tabela, Lp. 2 i 4) wynik tuberkulinizacji można było ocenić jako ujemny. U jednej krowy (tabela, Lp. 1) odczyn był 2-krotnie silniejszy, niż w badaniu poprzednim.

O m ó w i e n i e

Wyniki uzyskane w doświadczeniu potwierdzają opinie tych autorów, którzy zwracają uwagę na desensybilizacyjny wpływ częstych tuberkulinizacji bydła gruźliczego. Wprawdzie zjawisko zmiennej wrażliwości na tuberkulinę u bydła gruźliczego nie ma praktycznego znaczenia; bydło, rozpoznane jako gruźlicze, zwykle nie jest ponownie tuberkulinizowane. Należałoby jednak liczyć się z tym zjawiskiem w badaniach, na podstawie których eliminuje się bydło gruźlicze ze stad uzdrawianych.

Wśród krów gruźliczych grupy B, tuberkulinizowanych w odstępach 6-tygodniowych, w 3. kolejnym badaniu stwierdzono obniżenie wrażliwości na tuberkulinę, a w 4. kolejnej tuberkulinizacji, 4 tygodnie później, dwie krowy gruźlicze nie reagowały na tuberkulinę. Czy tuberkulinizacja zwierzęcia zakażonego gruźlicą będącego w okresie przedalergicznym, nie miałaby wpływu na wynik następnej, przeprowadzonej po 4—6 tygodniach? Wyniki przedstawionego doświadczenia nie dają na to odpowiedzi, ale takie pytanie rodzą, oraz przemawiają za unikaniem powtarzania tuberkulinizacji w odstępach 4-tygodniowych.

Autorzy wyrażają serdeczne podziękowanie p. Jerzemu Pieniążkowi, powiatowemu lekarzowi wet. PPRN w Radomiu, za umożliwienie przeprowadzenia doświadczenia.

P i ś m i e n n i c t w o

1. Barboriik R., Hejlicek K., Chromy J.: Sbornik Vysoké Skoly Zemedelské w Brnie, 1962, 3—4, 189—200
2. Izmailow I. A.: ref. Weterinaria, 1958, 8, 56
3. Kisielew W. S.: Weterinaria, 1952, 10, 19—21
4. Klein H.: Monatshefte für Veterinärmedizin, 1960, 2, 47—52
5. Terpstra J. I.: ref. Wiener Tierärztl. Monatsschrift, 1951, 3, 183.

Adres autora: doc. dr Antoni Spryszak, Puławy, Instytut Weterynarii.

TADEUSZ KOBUSIEWICZ, JERZY WIŚNIEWSKI

Mianowanie wirusa pryszczycy *in vivo* w hodowli komórek nerki świni

Z Zakładu Pryszczycy Instytutu Weterynarii
Kierownik: doc. dr TADEUSZ KOBUSIEWICZ

Zarówno w pracach doświadczalnych jak i przy produkcji i kontroli szczepionki przeciwpryszczycowej istnieje potrzeba dokładnego określania ilości wirusa pryszczycy.

Przez wiele lat powszechnie używane do tego celu były świnki morskie, których wrażliwość na wirus pryszczycy stwierdzili Waldmann i Pape (1920 — 11). Zastosowanie świnek morskich utrudniał jednak fakt, że szczepy wirusa pryszczycy zaadaptowane do poszczególnych gatunków zwierząt posiadają silne do nich powinowactwo. Dopóki więc szczep wirusa nie jest zaadaptowany do świnki morskiej, nie może być ona wykorzystana do wykrywania małych ilości wirusa pryszczycy (5).

Drugim zwierzęciem, na którym wykonywane jest często mianowanie wirusa pryszczycy jest bydło. Opracowana przez Hendersona (5) metoda polega na wstrzykiwaniu w śluzówkę języka czterech wzrastających dziesiętnych rozcieńczeń wirusa. Każde rozcieńczenie wstrzykuje się w śluzówkę języka w poprzecznej linii zaczynając od trzonu, w 5 miejscach, w dawce 0,1 ml na jedno uklucie. Wynik miana odczytuje się po 24 godz. po uboju zwierzęcia.

Przypadkowo odkryta przez Skinnera (1951) wielka wrażliwość osesków mysich na wirus pryszczycy została również wykorzystana do mianowania zarazka. Z prac Skinnera (13), Dintera i Wesslena (3) wynika, że miana uzyskane na myszkach są zbliżone do wyników otrzymanych na bydle. Maćkowiak i Lang (9) dają nawet pierwszeństwo oseskom mysim. Ujemną stroną jest zbyt długi okres obserwacji zakażonych osesków, trwający 4—5 dni, jak również obserwowany przez niektórych badaczy (11) kanibalizm.

Wprowadzona w ostatnich latach do badań wirusologicznych technika sztucznej hodowli komórek została wykorzystana również do mianowania wirusa pryszczycy. Metoda oparta jest na wykrywaniu zmian cytopatycznych w komórkach zakażonych przez wirus (Bachrach i wsp. (1), Dinter i Wesslen (3), Guillot (4), Petermann (10), Sellers (12), Horst i wsp. (6), Khera (7), Ubertini i wsp. (14)). Miana otrzymane tą metodą (Dinter i Wesslen (3), Maćkowiak i Lang (9), Kuwert i Hoang (8)) były wyższe od mian wykazanych przy użyciu bydła i osesków mysich.

Materiał i metody

Szczep wirusa pryszczycy. Do mianowania wirusa typu O szczep „Strzelewo” użyto wyciągów z materiału zawierającego wirus przeznaczony do produkcji 11 serii szczepionki. Do mianowania wirusa typu C oprócz wirusa produkcyjnego wykorzystano szczep „Ślubice” i szczep „Choszczno”.

Zwierzęta doświadczalne. Użyto bydła młodego w wieku 1—2 lat, pochodzącego z terenów wolnych od pryszczycy.

Hodowla tkankowa. Do doświadczeń używano jednowarstwowych hodowli komórek nerki świni przygotowanych wg metody ogólnie stosowanej.

Przygotowanie wyciągów i rozcieńczeń. Wyciągi z materiału wirusowego w stosunku 1:16 w fosforanowym płynie buforowym o pH 7,6 stanowiły mieszaninę z czterech kolejnych ekstrakcji uzyskanych przy produkcji szczepionki. W pozostałych badaniach pęcherze rozcierano w mózdzierzu i ekstrahowano wirus przez 1/2 godz. w lodówce, po czym wirowano 15 min. przy 3.000 obr./min. Dziesiętne rozcieńczenia

w postępie 1 log. sporządzano przy użyciu płynu P.B.S. z dodatkiem penicyliny i streptomycyny.

Mianowanie. Mianowanie wykonywano równocześnie na bydło, w hodowli komórek, a w kilku badaniach również na świnkach morskich. Bydło zakażano metodą Hendersona; hodowle komórek zakażano dawką 0,2 ml przygotowanych rozcieńczeń wirusa, używając na każde rozcieńczenie 5 probówek. Wirus dodawano do probówek po uprzedniej zmianie odżywczego płynu utrzymującego, po czym probówki pozostawiano w cieplarni w temperaturze 37°C. Wyniki odczytywano przez 3 kolejne dni, obliczając miano wirusa wg wzoru *Reeda i Muencha* (2). Badanie miana wirusa na świnkach morskich polegało na zakażaniu analogicznymi rozcieńczeniami po 2 świnki morskie przez wstrzyknięcie 0,2 ml badanego wyciągu w patkę.

Wyniki

Zarówno przy porównawczym mianowaniu wirusa typu O, jak również wirusa typu C, miana uzyskane w hodowli komórek były wyższe od mian otrzymanych na bydło. Wartości poszczególnych mian różniły się o 0,1 do 2,8 log. Miano dla typu O było przeciętnie wyższe o 0,9 log., dla typu C o 1,2 log.

Na 21 przeprowadzonych mianowań tylko w jednym przypadku stwierdzono na bydło wyższe miano aniżeli w hodowli tkankowej. Szczegółowe dane są przedstawione w tab. 1 i 2.

Tab. 1. Wyniki mianowania wirusa pryszczycy typu O

L. p.	Seria szczepionki	ID ₅₀ na bydło *)			ID ₅₀ w hod. komórkowej *)	Dodatkowa reakcja św. mors.
		I jał.	II jał.	średnia		
1	0-32 szczep St.	10-7,1	10-7,1	10-7,1	10-6,1	10-4
2	0-33 „ „	10-6,1	10-6,5	10-6,3	10-6,5	10-4
3	0-34 „ „	10-7,2	10-8,1	10-7,6	10-8,2	10-3
4	0-35 „ „	10-7,1	b. zm.)	10-7,1	10-8,2	10-4
5	0-36 „ „	10-6,9	10-7,2	10-7,0	10-7,5	10-5
6	0-43 „ „	10-5,1	b. zm.	10-5,1	10-7,9	—
7	0-44 „ „	10-7,2	10-6,9	10-7,0	10-7,9	—
8	0-45 „ „	10-7,5	b. zm.	10-7,5	10-7,9	—
9	0-46 „ „	10-6,3	10-6,9	10-6,6	10-7,5	—
10	0-52 „ „	10-7,2	10-7,2	10-7,2	10-8,5	—
11	0-53 „ „	10-7,5	10-7,9	10-7,7	10-7,8	—

*) Miano podane w przeliczeniu na 1 ml badanego wyciągu.

b.zm.) Brak pęcherzy po iniekcji.

—) Nie badano.

Z 42 jałówek użytych do mianowania — 5 nie reagowało na wirus wprowadzony, podczas gdy w hodowli komórek stwierdzono wirus w każdym przypadku.

Wyniki otrzymane po 48 godz. po zakażeniu można przyjąć za ostateczne, gdyż odpowiadały na ogół zmianom stwierdzonym po 72 godzinach.

Z przeprowadzonych równocześnie kilku porównawczych mianowań na świnkach morskich wynika, że otrzymane miana były niższe o 2 do 4 log. od mian uzyskanych w hodowli komórek. Wyniki te nie są całkiem miarodajne, gdyż ilość użytych świnek morskich (2 na rozcieńczenie) jest za mała do ścisłego obliczenia.

Dyskusja

Wyniki uzyskane przy porównawczym mianowaniu wirusa pryszczycy na bydło i w hodowli komórek wskazują, że ostatnia metoda jest bardzo czuła i dokładna.

Tab. 2. Wyniki mianowania wirusa pryszczycy typu C

L. p.	Seria szczepionki lub nr pasażu	Ujemny logarytm miana *)			
		ID ₅₀ na bydło			TCID ₅₀ w hod. tkankowej
		jał. I	jał. II	średnia	
1	C-23 szczepionka	10-3,2	10-6,2	10-6,2	10-7,2
2	C-26 „	10-6,8	10-5,9	10-6,4	10-7,3
3	C-30 „	10-5,9	10-6,3	10-6,1	10-7,1
4	C-31 „	b. zm.	10-4,9	10-4,9	10-7,9**)
5	C-Słub. Pas. nr 23/62	10-3,2	10-7,9	10-8,0	10-8,4
6	C-Słub. Pas. nr 2/63	10-7,1	b. nm.	10-7,1	10-7,4
7	C-Słub. Pas. nr 5/63	10-6,3	10-6,2	10-6,2	10-6,5
8	C-Ch. Pas. nr 2/63	10-5,5	10-5,5	10-5,5	10-6,2
9	C-Słub. Pas. nr 16/63	10-6,5	10-7,2	10-6,8	10-7,9
10	C-Słub. Pas. nr 16/8	10-5,5	10-6,1	10-5,8	10-8,4

**) Mianowanie na bydło przeprowadzono w 24 godz. po zakażeniu hodowli komórek.

Mimo selekcji bydła użytego do mianowania stwierdzono u kilku zwierząt brak wrażliwości na wstrzyknięty wirus pryszczycy. Trudno stwierdzić czy niewrażliwość ta była wynikiem przechorowania, czy też ewentualnego, profilaktycznego szczepienia.

Maćkowiak i Lang (9) wspominają również o niedostatecznej wrażliwości bydła, co było powodem nieregularnych wyników mianowania.

Wolno przypuszczać, że przyczyną obniżenia miana na bydło mogło być także wydostanie się na zewnątrz pewnej ilości płynu z wirusem spod śluzówki języka. Dlatego też sposób wykonania iniekcji jest bardzo ważny.

Na korzyść metody mianowania przy użyciu hodowli komórek wskazuje także wzgląd ekonomiczny: posiadanie pomieszczeń oborowych i rzeźnianych staje się zbędne.

Wnioski

1. Miana wirusa pryszczycy otrzymane przy użyciu jednowarstwowych hodowli komórek nerek świni były wyższe od mian otrzymywanych na bydło.

2. Przy mianowaniu wirusa na bydło stwierdzono, że na 42 jałówki użyte, 5 zwierząt było niewrażliwych na dawkę wirusa zawartą w zastrzyku.

3. Metoda mianowania wirusa pryszczycy w jednowarstwowej hodowli komórek nerki świni jest bardzo czuła, dokładna i ekonomiczna.

Piśmiennictwo

1. *Bachrach H. L., Hess W. R., Callis J. J.*: Science 122, 1269—1270, 1955
2. *Baczyński Z.*: Med. Wet. 15, (10) 653—657, 1959
3. *Dinter Z., Wesslen T.*: Bull. Off. Int. Epiz. 49, 87, 1958
4. *Guillot P.*: Ann. Inst. Pasteur 4, 383, 1958
5. *Henderson W. H.*: Agricultural Research Council Report 8, 1949
6. *Horst M. M., Petermann G., Lang R. C. Maćkowiak C.*: Publication 1956—1960 Institut Français de la Fièvre Aphteuse Lyon
7. *Khera M. S.*: Ann. Inst. Pasteur 4, 385, 1958
8. *Kuwert E., Hoang T. N.*: Arch. Exp. Vet. 13, 293
9. *Maćkowiak C., Lang R.*: Publication 1956—1960 Institut Français de la Fièvre Aphteuse Lyon
10. *Petermann H. G.*: Publication Institut Français de la Fièvre Aphteuse 89—93, 1961
11. *Röhler H., Pyl G.*: Handbuch der Virusforschung 4, 379, 1958
12. *Sellers R. F.*: Nature 176, 547—549, 1955
13. *Skinner H.*: Proc. Roy. Soc. Med. 44, 1041, 1951
14. *Ubertini B., Nardelli L., Santero G., Panina G.*: J. Bioch. Microb. Techn. a Eng. 2, 327, 1960

Adres autora: doc. dr Tadeusz Kobusiewicz, Zduńska Wola, ul. Woźna 7.

Кобусевич Т., Висьневски Ю. — **Определение титра вируса ящура in vivo и на культуре почечных клеток.**

Целью определения сравнительного титра ящурного вируса на крупном рогатом скоте и культуре почечных клеток было констатирование, который из этих методов является более чувствительным и точным.

Исследования были проведены с двумя типами вируса: типом О и типом С. Титрование на скоте проведено методом Хендерсона. Учет результатов произведено по истечении 24 часов после убоя.

Клеточную культуру инокулировано в количестве 0,2 мл исследуемых разведений. Учет результатов произведено по истечении 3-х дней. Титр вычислено применяя формулу Реда и Мюнха. Титры, полученные при применении культуры почечных клеток, были выше по сравнению с полученными in vivo, при применении типа О разница составляла в среднем 0,9 Log, при типе С — 1,2 Log.

Констатировано определенную нерегулярность результатов при определении титра на скоте. Среди взятых 42 нетелей — 5 животных не реагировало на количество вируса введенного путем инъекции.

Метод определения титра вируса на культуре почечных клеток оказался более точным и чувствительным, а также более экономическим по сравнению с классическим методом определения титра на языках крупного рогатого скота.

Kobusiewicz T., Wiśniewski J. — **Titration of foot-and-mouth disease virus in vivo and on the kidney tissue culture.**

The purpose of comparative titration of foot-and-mouth disease virus on cattle and on kidney tissue cultures was to determine which of the two methods is more sensitive and more accurate.

The investigations were carried out with the use of the two types of virus: type O and type C. The titration was performed in accordance to the method by Henderson. The results were read after 24 hours following the slaughter. The tissue cultures were inoculated with a dose of 0.2 ml of the examined solutions. The results were taken three days later. The titre was calculated according to the formula of Reed and Muench.

The titres obtained when using the kidney tissue cultures were higher than those obtained on cattle: with type O, the difference was, on average, 0.9 log, and with type C it was 1.2 log. Some irregularity was found in the results of titration made on cattle. Of the 42 heifers used for the experiment, 5 animals did not respond to the virus dose injected into the tongue. The method of the virus titration on the kidney tissue cultures proved to be more accurate and more sensitive, as well as

more economical than the classical method of titration with the use of bovine tongues.

Kobusiewicz T., Wiśniewski J. — **La titration in vivo du virus de la fièvre aphteuse dans une culture de cellules de reins.**

Le but du travail consistait dans une comparaison des titres du virus de la fièvre aphteuse chez les bovins et dans une culture de reins et la définition, laquelle des deux méthodes est plus sensible et exacte.

On employa le type O et le type C. Le titrage chez les bovins fut effectué à l'aide de la méthode de Henderson. Les résultats étaient lus 24 heures après l'abattage. Les cultures des cellules étaient infectées à l'aide d'une dose de 0,2 ml des dilutions du virus investigé. Les résultats étaient lus d'après la formule de Reed et Muench.

Les titres obtenus grâce à l'emploi d'une culture de cellules de rein de porc étaient plus élevés que ceux, obtenus chez le bétail. Chez le type O la différence comportait en moyenne 0,9 log, chez le type C — 1,2 log.

On constata une certaine irrégularité des résultats du titrage chez les bovins. Parmi 42 génisses — 5 ne réagissaient pas à la dose du virus introduit dans la langue. La méthode de titration du virus dans la culture des cellules du rein de porc s'avéra plus exacte et plus sensible de même que plus économique en comparaison avec la méthode classique de titration sur les langues des bovins.

Kobusiewicz T., Wiśniewski J. — **Titrierung des MKS-virus in vivo und in der Nierenzellenkultur beim Schwein.**

Die Arbeit bezweckte den Vergleich des Titers des MKS-virus beim Rind und in der Nierenzellenkultur sowie die Festsetzung welche der beiden Methoden als mehr empfindlich und genau anzusehen ist. Zur Untersuchung gelangte Typus O und Typus C. Die Ergebnisse wurden in 24 Stunden nach der Schlachtung abgelesen. Nierenkulturen sind mit Dosis 0,2 ml der untersuchten Virusverdünnungen infiziert worden. Der Titer wurde nach dem Muster Reed und Muench berechnet, die Rindertitrierung nach der Methode Henderson durchgeführt.

Die bei Anwendung der Nierenzellenkultur des Schweines erhaltenen Titer waren höher als die beim Rind. Beim Typus O machte die Differenz durchschnittlich 0,9 log aus, beim Typus C — 1,2 log. Es wurde eine gewisse Unregelmässigkeit der Titrierung beim Rind beobachtet. Von 42 benützten Färsen — 5 Tiere reagierten nicht auf die auf Zunge eingeführte Virusgabe. Methode der Virustitrierung in der Nierenzellenkultur des Schweines hat sich mehr exakt und empfindlich sowie auch ökonomisch erwiesen im Vergleich mit der klassischen Methode der Titrierung auf Rinderzungen.

JANUSZ WAWRZKIEWICZ

Występowanie przeciwciał przeciwko wirusowi choroby Aujeszky u świń po ich naturalnym przechorowaniu

Z Katedry Mikrobiologii Wydziału Wet. WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr TADEUSZ JASTRZĘBSKI

Pseudowścieklizna, czyli choroba Aujeszky jest ostrym schorzeniem zakaźnym zwierząt ssących, wywołującym ogólne objawy gorączkowe, lub objawy zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego. Niekiedy podczas choroby występuje silny świąd.

Początkowo chorobę tę myłono z wścieklizną lub z ostrymi przypadkami zatruc. Dopiero w 1902 r. Aujeszky — badacz węgierski — stwierdził, że jest to odrębna jednostka chorobowa, a Schmidhoffer

(1910) wykazał, że czynnikiem wywołującym schorzenie jest wirus. Wielkość jego na podstawie badań Reagana i wsp. (1952), którzy obserwowali w mikroskopie elektronowym zawieszinę wirusową otrzymaną z tkanki mózgowej zakażonego królika, została określona na 90—100 m μ . Podobne wyniki otrzymano uprzednio metodą ultrafiltracji (cyt. wg Hagana i Brunera — 1951), przy czym średnica wirusa została oceniona na około 120 m μ . Jednak badania Kapla-