

będzie dalszym przejawem unowocześnienia metod diagnostycznych i zwiększeniem możliwości poznawczych, a jest podyktowana dopiero obecnie aktualizującą się w Polsce sy-

tuacją na odcinku walki z brucelozą, tj. bliską perspektywą likwidacji tej choroby.

Piśmiennictwo, obejmujące 59 pozycji u autora.

Adres autora: doc. dr Jerzy Wiśniowski, Bydgoszcz.

ANTONI TEKLIŃSKI

Wpływ liofilizacji na wartość antygenową szczepionki S-19

Zakład Technologii i Kontroli Leków Weterynaryjnych Instytutu Weterynarii w Warszawie
Kierownik: dr A. TEKLIŃSKI

Ponad 20 lat stosowana jest przemysłowo metoda liofilizacji szczepionek bakteryjnych bądź wirusowych. W ten też sposób przygotowana jest żywa szczepionka przeciw brucelozie krów S-19.

Warunkiem skuteczności tej szczepionki jest odpowiednia koncentracja żywych i antygenowo pełnowartościowych drobnoustrojów. Jak wiadomo, nie zawsze żywotność drobnoustroju świadczy o jego niezmiętej budowie, a tu również o jego wartości antygenowej. Zamrażanie, które jest procesem wstępnym liofilizacji powoduje gwałtowną zmianę struktury fizycznej drobnoustroju. Zależnie od szybkości i temperatury zamrożenia następuje drobno, bądź grubo-kryształkowa krystalizacja wody wchodzącej w skład komórki bakteryjnej. Jest to jednym z powodów mechanicznych uszkodzeń bakterii, często zaś nawet ich śmierci.

Proces odwrotny, wprowadzenia wody do wysuszonego ciała bakteryjnego, jest również niebezpiecznym momentem mającym wpływ na żywotność i właściwości drobnoustroju.

Własności antygenowe komórki bakteryjnej są determinowane przez elementy proteinowe, lipidowe, nukleoproteiny i wielocukry. W procesie liofilizacji, drogą sublimacji, z zamrożonej substancji zostaje odebrana woda. Tym samym następuje gwałtowna zmiana koncentracji soli mineralnych i substancji organicznych składowych ciała bakteryjnego. Zachodzące w tym układzie zmiany fizyko-chemiczne mogą powodować odchylenie we własnościach antygenowych liofilizowanego drobnoustroju.

W pracach dotyczących wpływu niskich temperatur, bądź też liofilizacji na drobnoustroje, zajmowano się głównie ich przeżywalnością, a więc zmianami ilościowymi, a nie jakościowymi.

Nie były dotychczas publikowane prace nad genetyczną opornością bakterii na działanie zamrażania i odtajania, uwzględniające np. zmiany zachodzące w RNA i DNA.

Próby otrzymania trwałych mutantów *Pasteurella multocida* o zmniejszonej, bądź nawet zniesionej zjadliwości, drogą powtarzanych zamrażeń do temp. — 192°, prowadzili bezskutecznie *Andrzejewski* i *Tekliński* (2).

Sprawą niewrażliwości *Escherichia coli* i *Pseudomonas* na działanie zamrażania w temp.

— 196° zajął się *Ashwood-Smith* (3) wykazując, że przeżywalność tych drobnoustrojów, jak również ich wrażliwość na antybiotyki i sulfonamidy pozostała bez zmian w ciągu 18 pasażi.

Znane są prace oceniające wartość immunologiczną liofilizowanej szczepionki S-19, jednak nie jest mi znana praca, której celem byłaby porównawcza ocena wartości antygenowej szczepionki liofilizacyjnej w stosunku do bezkonfliktowo przygotowanej szczepionki płynnej.

Zadaniem niniejszej pracy było wykazanie przy pomocy serologicznych odczynów: zlepnego (aglutynacji) i litycznego (wiązania dopełniacza) ewentualnych różnic między wartościami antygenowymi płynnych i liofilizowanych szczepionek S-19.

Różnice te próbowano stwierdzić na podstawie określenia poziomu wytworzonych przeciwciał swoistych u bydła poddanego działaniu tych bodźców.

Podstawę do oceny stanowiła przeprowadzona porównawczo analiza statystyczna.

Van der Schaaf i *Jaartsveld* (17) przy ocenie porównawczej wartości uodparniającej szczepionki S-19 i L posłużyli się także interpretacją odczynów aglutynacji i wiązania dopełniacza u zwierząt szczepionych. *Seelemann* zaś i *Börger* (20) porównali w tenże sposób szczepionkę adsorbowaną zabita i żywą S-19 wykazując przewagę tej ostatniej.

Wyniki pracy mogą posłużyć do ew. wyjaśnienia niektórych poglądów związanych z brucelozą oraz mogą mieć znaczenie dla ew. skontrolowania stosowanych metod kompleksowego zwalczania brucelozy i ustosunkowania się do otrzymywanych po szczepieniu reakcji serologicznych.

Materiały i metody

Dla doświadczalnych szczepień S-19 wytypowano 24 obory Państwowych Gospodarstw Rolnych na terenie 3 województw: olsztyńskiego, warszawskiego i wrocławskiego. Badania serologiczne były wykonywane w odpowiednich terenowo Wojewódzkich Zakładach Higieny Weterynaryjnej. We wszystkich oborach znajdowało się bydło nizinne czarno-białe, w kondycji hodowlanej naogół dobrej. Stan zdrowotny bydła był rozmaity: w niektórych gospodarstwach występowały ronioenia na tle brucelozy, w kilku znajdowały się krowy gruźlicze, a inne były wręcz izolatorami gruź-

liczymi. Powodowało to eliminację z gospodarstw wielu sztuk objętych doświadczeniem.

Szczepieniami objęto w oborach całe żeńskie pogłowie bydła w wieku powyżej 6 miesięcy, z tym że krowy i jałówki cielne powyżej 6 miesięcy były ze szczepień wyłączone.

W ocenie porównawczej uwzględniono jedynie bydło z ujemnym wynikiem reakcji serologicznych na brucelozę w chwili szczepienia.

Zaszczepiono łącznie 1942 sztuki bydła, w tym młodych zwierząt od 6 miesięcy do pierwszego ocieleńa 869, krów 1073.

W każdym gospodarstwie krowy i jałówki przeznaczone do szczepień podzielono losowo na dwie zbliżone pod względem ilościowym grupy. Pierwsza grupa otrzymała zwykłą, płynną szczepionkę K (kontrolną), Drugą zaś poddano szczepieniu jednym z 4 rodzajów liofilizowanej szczepionki, oznaczonych w zależności od użytego nośnika, literami. Chodziło tu o uzyskanie odpowiedzi, czy na wartość antygenową liofilizowanych szczepionek ma wpływ rodzaj użytych substancji osłaniających drobnoustroje przed ujemnymi wpływami, różnych faz procesu liofilizacyjnego.

Pierwszą z nich był płyn z dodatkiem m. innymi tryptopeptonu (Tp), drugą — tryptopeptonu z grupą redoxonową (TpR), trzecią — płyn z dodatkiem żelatyny (Ż), a czwartą było odłuszczone mleko (M).

Wariant Tp był użyty w 160 i 235 dni po liofilizacji, a koncentracja żywych drobnoustrojów w chwili szczepienia wynosiła w dawce średnio 120×10^8 , tj. 80 i 70% ilości żywych pał. *Brucella* jakie były stwierdzone bezpośrednio po liofilizacji.

Odpowiednie dane dla wariantu TpR w 112 i 170 dni — wynosiły 175 i 126×10^8 , tj. około 100% i 79%, dla — Ż w 87 dni — 163×10^8 , tj. 80%, oraz dla M w 114 dni — 111×10^8 , tj. 76%.

Szczepionki płynne dla grup kontrolnych były sprzedawczymi, seryjnymi szczepionkami użytymi w okresie terminu ich ważności z zachowaniem wymaganej koncentracji żywych drobnoustrojów w dawce co najmniej 80×10^8 .

Badania polegały na porównaniu reakcji serologicznych bydła szczepionego poszczególnymi typami liofilizatów z reakcjami serologicznymi bydła, u którego stosowano szczepionkę płynną.

Przyjęto, że w danym gospodarstwie całe bydło objęte doświadczeniem stanowiło jedną populację. Znajdowało się ono bowiem w tych samych warunkach środowiskowych i pod działaniem tych samych czynników, jak żywienie, warunki sanitarno-higieniczne, klimat, ekspozycja na choroby itp. Analizę porównawczą objęto zatem jedynie wyniki działania różnych antygenów szczepionkowych, jako czynników wywołujących reaktywność serologiczną u bydła szczepionego.

Na podstawie wyników analizy statystycznej wysokość mian, występujących u tych dwóch grup zwierząt, przy założeniu, że osobniki objęte doświadczeniem są elementami jednej populacji (hipoteza H_0), przeprowadzono wnioskowanie o całości badanego pogłowia.

Ocenę wysokości mian serologicznych (odczynów aglutynacji i wiązania dopełniacza) przeprowadzono w 3, 6 i 12 miesięcy po szczepieniu.

Dla porównania wartości tych grup szczepionek zastosowano test zgodności — Kołmogorowa — Smirnowa na poziomie istotności $\alpha = 0,01$. Test ten oparty jest na znalezieniu kresu górnego wartości bezwzględnych różnic dystrybuant empirycznych i porównanie ich z wartością krytyczną z tablic. Pozwala on na wykazanie różnic między najczęściej występującymi wartościami, w naszym przypadku mian serologicznych, po zastosowaniu różnych antygenów szczepionkowych.

Kryterium wyższej wartości antygenowej szczepionki stanowiła wyższa wartość przeciętna mian serolo-

gicznych, na której to podstawie przeprowadzono porównanie.

Przeliczenie wykonano na maszynie matematycznej, mózg elektronowy ZAM-2*

W pracy uwzględniono również obserwacje nad nasileniem i stopniem występowania reakcji ogólnych i miejscowych u bydła szczepionego, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu szczepień na wydajność mleka.

Wyniki

Zestawienie mian aglutynacyjnych i odczynu wiązania dopełniacza u krów i młodzięży w trzy, sześć i dwanaście miesięcy po szczepieniu liofilizowanymi i płynnymi szczepionkami S-19, oraz analiza statystyczna istotności różnic wartości tych mian, zostały wykazane w tabelach: 1, 2.

Z przedstawionych w tabeli 1 danych wynika, że przy poziomie istotności $\alpha = 0,01$ nie dało się wykazać statystycznie istotnych różnic między wartościami mian serologicznych bydła szczepionego szczepionką płynną, a takimi wartościami bydła szczepionego szczepionką liofilizowaną. Na tej podstawie, zgodnie z założeniami pracy należy przyjąć, że nie ma różnic w wartościach antygenowych obu rodzajów badanych szczepionek, ocenionych na podstawie mian serologicznych szczepionego bydła.

Stwierdzenia te wynikają zarówno z oceny opartej na analizie odczynów aglutynacji, jak i wiązania dopełniacza, wykonywanych przez całoroczny okres doświadczenia u szczepionych krów i jałówek.

W jednym tylko przypadku wykazano nieznacznie wyższą wartość antygenową szczepionki liofilizowanej nad równocześnie użytą szczepionką płynną (aglutynacja u krów badanych w 3 miesiące po zastosowaniu szczepionki liofilizowanej w zawieszalniku z mlekiem).

Porównawcza analiza statystyczna mian odczynu zlepnego u krów szczepionych jednym z wariantów (Tp, TpR, Ż, M) liofilizowanej szczepionki S-19, jak również wszystkich mian tych grup łącznie (L) w stosunku do mian sztuk kontrolnych (K), które otrzymały szczepionkę płynną nie wykazała istotnych statystycznie różnic po 3, 6, jak i 12 miesiącach od chwili szczepienia (tab. 1).

Wyjątek stanowi jedynie wariant (M) liofilizatu, który wykazał swoją wyższą wartość nad wariantem kontrolnym (K). Odnosi się to jednak tylko do badania przeprowadzonego w 3 miesiące po szczepieniu.

Analiza statystyczna mian odczynu zlepnego u młodych zwierząt, jak i odczynu wiązania dopełniacza u krów i młodych zwierząt (tab. 2) nie wykazała istotnych różnic przy badaniu w 3, 6 i 12 miesięcy po szczepieniu szczepionkami liofilizowanymi i płynnymi.

* P. mgr Marii Glińskiej z Instytutu Matematycznego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie dziękuję za pomoc w przeprowadzeniu analizy statystycznej otrzymanych wyników.

Jednocześnie składam podziękowanie za wysiłki jakie włożyły w doskonałe przygotowanie akcji terenowej dr Roman Rygiel z Wojewódzkiego Zakładu Weterynarii we Wrocławiu.

Tab. 1. Miana serologiczne u bydła po zastosowaniu szczepionek S-19 liofilizowanych i płynnych oraz statystyczna ocena istotności różnic ich wartości w 3, 6 i 12 miesięcy po szczepieniu.

Lp	Szczepionka	Miesiące po szczepieniu	Miana aglutynacyjne										Liczebność n_i	$Dn_1, n_2 \sqrt{N}$	Istotność różnic dla $\alpha = 0,01$
			0	12,5	25	50	100	200	400	800	1600	3200 do 12800			
1	L	3	30	31	91	133	169	45	13	12	2 ^{x/}	3 ^{x/}	529 krów	+0,4901	—
	P		21	28	75	111	151	51	21	1	1 ^{x/}	3 ^{x/}	463 „		
2	L	6	15	51	116	143	164	29	17	9 ^{3x/}	1	545 „	+0,4972	—	
	P		9	39	93	137	143	26	11	4 ^{3x/}	4 ^{1x/}	466 „			
3	L	12	8	51	109	114	81	10	5		1 ^{x/}	379 „	+1,0477	—	
	P		6	41	88	90	89	13	7	4		338 „			
4	L	3	8	12	60	126	131	33	9	2	1 ^{x/}	382 jał.	+1,5344	—	
	P		10	13	45	76	140	37	13	5 ^{1x/}		339 „			
5	L	6	5	36	88	87	46	3	1			266 „	+0,6280	—	
	P		8	35	89	78	65	2				277 „			
6	L	12	24	30	84	81	51	4	3 ^{1x/}			277 „	+0,3407	—	
	P		19	27	78	57	33	4				238 „			
			Miana wiązania dopełniacza												
7	L	3	285		24	42	32	35	18	10	6 ^{4x/}	3	455 krów	+0,2697	—
	P		250		19	32	30	33	16	5	4 ^{x/}		389 „		
8	L	6	420		36	29	29	9	16	2	2 ^x	2 ^x	545 „	+0,1656	—
	P		361		33	25	20	11	6	6 ^{3x/}	2 ^x	2 ^x	466 „		
9	L	12	320		13	11	24	6	3	2			379 „	+0,3765	—
	P		288		14	8	14	5	4				333 „		
10	L	3	152		59	35	28	23	12	5	1 ^{x/}		315 jał.	+0,8648	—
	P		155		32	26	23	14	18	10	1 ^{x/}	1	280 „		
11	L	6	231		13	10	9	2	1				266 „	+0,6458	—
	P		255		8	3	5	3	2				276 „		
12	L	12	262		5	4	6						277 „	+0,0549	—
	P		225		5	4	4						238 „		

x/ - sztuki znajdujące się w gospodarstwach, w których występują ronienia na tle brucelozy
1x/, 3x/ - ilość sztuk z gospodarstw, w których występują ronienia na tle brucelozy

Porównanie serologicznych mian poszczepionych bydła szczepionego szczepionką S-19 w wieku dorosłym z mianami równocześnie szczepionych młodych zwierząt wykazało istotną różnicę jedynie w odczynie aglutynacyjnym i to tylko w 6 miesięcy od chwili szczepienia, kiedy to miano u krów wykazało wyższą wartość. W tymże odczynie w 3 i 12 miesięcy po szczepieniu, oraz w odczynie wiązania dopełniacza przez cały okres doświadczenia nie wykazano statystycznie istotnych różnic w wartości miana serologicznego krów i młodych zwierząt.

Jest to specjalnie znamienne przy powszechnie przyjętej opinii, że po szczepieniu poziom przeciwciał zlepnych i wiążących dopełniacza

jest wyższy i dłużej utrzymujący się u sztuk dorosłych, niż u młodych zwierząt.

Porównawcza analiza statystyczna (tab. 6) wartości antygenowych różnych wariantów liofilizowanych szczepionek, wykazała w odczynie aglutynacji wyższość wariantu TpR nad Tp 5-krotnie, z czego 3 razy u krów w 3, 6 i 12 miesięcy oraz 2-krotnie u młodzieży w 6 i 12 miesięcy po szczepieniu. TpR nad Z — 2-krotnie i nad M także 2-krotnie z czego: raz u krów w 3 oraz u młodych zwierząt w 12 miesięcy po szczepieniu.

M nad Tp — 2-krotnie: w 6 miesięcy u krów i 12 mies. u młodych zwierząt raz nad Z u krów w 6 — oraz raz nad K w 3 miesiące po szczepieniu.

Tab. 2. Porównanie wartości mian serologicznych krwi szczepionych krów i młodzieży.

Lp	Krowy K Jatówki J	Miesiące po szczepieniu	Miana aglutynacyjne										Liczeb- ność n_i	$Dn_1 n_2 \sqrt{N}$	Jakość różnic dla $\alpha = 0,01$ +
			0	12,5	25	50	100	200	400	800	1600	3200 do 12800			
1	K	3	30	31	91	133	169	45	13	12	2	3	529	+1,1604	—
	J		8	12	60	126	131	33	9	2	1	382			
2	K	6	15	51	116	143	164	29	17	9	1	545	+2,8839	+	
	J		5	36	88	87	46	3	1		266				
3	K	12	8	51	109	114	81	10	5		1	379	+0,8290	—	
	J		24	30	84	81	51	4	3		277				
			Miana wiązania dopełniacza												
4	K	3	285		24	42	32	35	18	10	6	3	455	+1,9624	+
	J		152		59	35	28	23	12	5	1	315			
5	K	6	420		36	29	29	9	16	2	2	2	545	+1,3073	—
	J		231		13	10	9	2	1			266			
6	K	12	320		13	11	24	6	3	2			379	+1,2843	—
	J		262		5	4	6					277			

Ż nad Tp — 1 raz u młodych zwierząt w 12 miesięcy po szczepieniach.

Odczyn wiązania dopełniacza podobnych różnic w zasadzie nie wykazał poza wariantem M, który okazał się słabszy od każdego z pozostałych. Ocena ta była oparta na badaniu w 3 miesiące po szczepieniu.

Raz także okazała się przewaga wariantu Ż nad TpR w 3 miesiące po szczepieniu młodych zwierząt.

Należy tu jednak wziąć pod uwagę, że szczepienia różnymi wariantami szczepionki liofilizowanych były przeprowadzone w różnych gospodarstwach na osobnikach różnych populacji.

Przy ocenie wartości tych wariantów należy uwzględnić także możliwość istnienia pewnych różnic w interpretacji i w technice przeprowadzania prób przez poszczególne pracownie.

W przeprowadzanych badaniach specjalną uwagę zwrócono na rodzaj i stopień nasilenia reakcji po szczepieniu była S-19. Występowanie ich miało charakter lokalny w postaci obrzęków w miejscu wprowadzenia szczepionki, lub też — ogólny, w postaci utraty apetytu, posmutnienia, podwyższonej temperatury, a u krów spadku mleczności.

Obrzęki w miejscu iniekcji pojawiały się u sztuk szczepionych na okres kilku dni. Utrzymywały się one czasem dłużej, nawet do kilku tygodni, pozostając u niektórych sztuk jako ograniczone guzowate zgrubienia wielkości orzecha włoskiego i większe, czasem nawet dochodzące do wielkości 2 pięści. Ulegają one stopniowej organizacji. Obrzęki występu-

jące bezpośrednio po szczepieniu bywały bolesne i dochodziły nieraz do wielkości 2 dłoni. Stosunkowo częściej obserwowano się je u krów, niż u młodych zwierząt. Znaczny odsetek powstających w miejscu iniekcji guzowatych ropni jest następstwem zakażenia drobnoustrojami ropnymi w czasie wprowadzenia szczepionki.

Przyczyny nieregularności, w występowaniu i nasileniu objawów poszczepiennych u bydła nie są niestety dotychczas wyjaśnione. Obserwuje się je jako reakcje o znacznym nieraz nasileniu u pewnej tylko ilości sztuk w gospodarstwie, kiedy u innych nie stwierdza się żadnych zmian. Czasem w jednym gospodarstwie było szczepione reaguje w znacznym odsetku, a w sąsiednim nie daje żadnej reakcji, mimo że szczepione jest tą samą serią szczepionki, i niejednokrotnie nawet tego samego dnia.

Reakcje poszczepienne obserwowano po zastosowaniu wszystkich rodzajów szczepionek, a kształtowały się one różnorodnie, głównie w zależności od środowiska. Nie dało się ustalić żadnej korelacji między nasileniem reakcji poszczepiennej a stopniem zaawansowania cielności, stanem odżywienia i wydajnością mleka. W ogólnym bilansie, częstość i nasilenie ich występowania nie odbiegały od obserwowanych po dotychczasowym stosowaniu szczepionki płynnej.

Należy tu zwrócić uwagę na niepokojącą w terenie silną reaktywność poszczepienną w tzw. gospodarstwach zakażonych. Istotą tych reakcji jest gwałtowny odczyn alergiczny szczepionych osobników chorych, bądź też znajdujących

cych się w stadium wylegania. Nie jest ona wykładnikiem jakości szczepionki, ale stanu uczulenia danych osobników na wprowadzane alergeny.

W analizie reakcji po zastosowaniu szczepionki S-19 specjalną uwagę zwrócono na intensywność i czas trwania spadku mleka u szczepionych dojnych krów.

Obserwacje przeprowadzone na 960 krowach wykazały poszczepienne zmniejszenie udojów w oborach na okres 2—14 dni, średnio 7,1 doby. Maksymalny spadek dzienny produkcji mleka, w całej oborze wynosił od 3 do 25%, a średnio 12,4%, w stosunku do średniej udojów z 10 dni bezpośrednio poprzedzających dzień szczepienia. Średni zaś spadek dziennej mleczności w oborach za cały okres poszczepienny wynosił 2—12%, średnio 6,7%.

W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano, że ogólna strata mleka w wyniku szczepień S-19 wyniosła 48% jednego udoju dziennego.

Należy zauważyć, że występowanie poszczepiennego spadku mleczności nie jest regułą. W jednym np. z gospodarstw mających 57 dojnych krów nie wystąpił on wcale, zanotowano tam nawet pewne podwyższenie produkcji mleka.

Porównanie zmniejszenia udojów po zastosowaniu szczepionki liofilizowanej i płynnej przeprowadzono w jednym tylko gospodarstwie. Po szczepionce płynnej zastosowanej u 27 krów średni spadek mleczności przez 5 dni wyniósł 13%, czyli łącznie 65%, zaś po szczepionce liofilizowanej — u 37 krów przez 2 dni po 3%, a zatem łącznie za cały okres poszczepienny strata mleka wyniosła tu 6% udoju dziennego.

O m ó w i e n i e

Poszczepienne miana serologiczne krwi utrzymywały się, u pewnego odsetka sztuk, na poziomie wyniku dodatniego przez 12-miesięczny okres obserwacji. Stwierdzono to u sztuk szczepionych jako dorosłe 57,7%, ale także i u 49,1% młodych zwierząt. Ma to specjalne znaczenie dla interpretacji wyników badań w związku z przyjętymi u nas wysokościami mian, które uważa się za poszczepienne.

Szereg badaczy, jak *Gromatzki* i *Teute* (6), *Iwanow* i współpracownicy (9), *Kilchsperger* (10), *King* i *Frank* (12)), *Krauss* i *Ugorski* (14), *Lipnicki* (15), *Seelemann* i *Meyer* (19), *Tekliński* (22), *Wiesner* (25), *Wilson* i *Miles* (26) podaje, że u cieląt zanik dodatniego miana aglutynacyjnego następuje w ciągu drugiego roku po szczepieniu. *Gromatzki* i *Teute* (6) stwierdzali jeszcze po 2 latach dodatnie miana aglutynacyjne u 24% zwierząt szczepionych jako cielęta, a *Hellman* (7) nawet po 2,5 latach.

Badania własne wykazały wcześniejsze zanikanie miana odczynu wiązania dopełniacza niż

aglutynacji, zgodnie z twierdzeniami *Van der Schaafa* i *Jaartsvelda* (17), *Wiśniowskiego* (27), *Kocowicz* i współpracowników (13). Jednak jeszcze rok po szczepieniu dodatni odczyn wiązania dopełniacza stwierdzono u 14,6% badanych krów oraz u 5,4% sztuk szczepionych jako młode zwierzęta. Dane te są podobne do wyników badań innych autorów. *Tiewosow* (21) podaje, że zarówno miano aglutynacji jak i wiązania dopełniacza zanika u szczepionych cieląt w 5,5—6,5 miesięcy, u jałowizny 19—20, a u krów nawet w 24 miesiące. *Ulbricht* (23) stwierdza, że u pewnego odsetka cieląt miano aglutynacyjne może się utrzymywać przez 3 lata, a dodatni odczyn wiązania dopełniacza nawet do 530 dni.

Badania, mające na celu wykazanie wpływu ilości drobnoustrojów zawartych w dawce szczepionki S-19 na wysokość i utrzymywanie się aglutynacyjnego miana poszczepiennego, przeprowadził *Kilchsperger* (10). Stwierdził on u królików wpływ 3-krotnego zwiększenia koncentracji drobnoustrojów w dawce szczepionki, u cieląt zaś — półtora i dwukrotnego. Jednak ilość użytych przez niego zwierząt była tak mała, że nie upoważniało to do wyciągania jakichś wniosków.

Z przeprowadzonych natomiast naszych badań wynika, że nawet dwukrotne przedawkowanie (warianty TpR i Ż) ilości żywych drobnoustrojów w szczepionce S-19, w stosunku do przyjętych norm, nie powodowało uchwytanych statystycznie różnic w wynikach odczynowości serologicznej.

Wielokrotnie dłuższy (4—8 miesięcy) termin pełnej aktywności szczepionki liofilizowanych w stosunku do płynnych, wykazany w czasie przedstawionych tu badań, znajduje potwierdzenie we wnioskach *Collinsa* (5) i *Hulsa* (8) o zachowaniu żywotności szczepionki S-19 przez okres co najmniej 2,5 lat.

Zagadnienie powyższe rozpatrywane pod kątem wpływu różnych substancji osłaniających na przeżywalność drobnoustrojów *Brucella* S-19 w liofilizowanych szczepionkach są tematem odrębnej pracy.

Co się tyczy ewentualnego wpływu liofilizacji na zmienność antygenową szczepionki S-19, wywołaną dysocjacją drobnoustrojów z form S w R, to badania nasze przeprowadzane w ciągu kilkunastu lat nie wykazały uchwytanych zmian w natężeniu tego procesu.

Niektórzy ze zwalczających brucelozę w terenie mają niekiedy wątpliwości odnośnie działania szczepionki S-19. Należy jednak przyjąć, że wieloma badaczami zajmującymi się od lat tym zagadnieniem, że szczepionka nadaje odporność większości zwierząt, jednak nie zabezpiecza ich całkowicie przed zakażeniem.

Interesujące pod tym względem są badania *Ulbrichta* (23), który zakaził dospojówkowo 30 krów szczepionych przeciw brucelozie w wieku 6 miesięcy. W wyniku tego zakażenia poroniły

3 krowy, a u 14 wyosobniono zjadliwe brucele z dróg rodnych, lub wymienia. Szczepienie zdaniem autora zmniejsza ilość ronień, ale tylko częściowo zabezpiecza krowy przed zakażeniem.

Ogólnie obowiązującą zasadą jest, że reakcja serologiczna organizmu na wprowadzony antygen nie uprawnia do wyciągania wiążących wniosków odnoszących się do stanu odpornościowego organizmu. Są to dwa różne mechanizmy, których obecność i działanie wymagają odrębnej analizy, a wyniki działania tych mechanizmów nie muszą się pokrywać.

Większość zwierząt szczepionych uzyskuje dostateczne zabezpieczenie przed naturalnym zakażeniem. Same jednak szczepienia nie zwalczą choroby bez przestrzegania równocześnie innych metod walki.

Mimo, że szczepionka S-19 nie daje zwierzętom całkowitej odporności, jednak nie można pomniejszyć jej znaczenia. Przy jej pomocy bowiem daje się zmniejszyć straty powodowane przez brucelozę, do poziomu, który gospodarstwo nie ma wielkiego znaczenia.

Przytoczone wyniki badań własnych, jak również cytowane z piśmiennictwa nie powinny jednak niepokoić przy ich konfrontacji z obowiązującymi w Polsce przepisami zwalczania brucelozy. Badania naukowe dają materiał obiektywny, najczęściej dotyczą pewnego wycinka zagadnienia, natomiast przepisy administracyjne ujmują sprawę kompleksowo, pod kątem jak najszybszego doprowadzenia do likwidacji choroby. Tym samym ustalone kryteria mogą być bardziej surowe, gdyż przy ich pomocy można prędzej osiągnąć pożądane efekty. Należy się jednak liczyć z występowaniem sytuacji nieuwzględnionych w przepisach administracyjnych.

Już w początku stosowania płynnej szczepionki S-19 w Polsce obserwowano w miejscach zastrzyku gorąco, twardy i bolesny obrzęk utrzymujący się przez 5 do 10 dni. Z objawów ogólnych stwierdzano czasem przejściowe podwyższenie ciepłoty ciała nawet do 42°, brak apetytu, sztywność kończyn, przyspieszenie oddechu i spadek mleczności (*Tekliński 22*). Objawy te były krótkotrwałe, lub też ostro wyrażone i dłużej trwające. Niekiedy objawy poszczepienne nie występowały w ogóle.

Jak wynika z badań własnych odczynowość poszczepienna obserwowana obecnie zarówno po stosowaniu szczepionki płynnej jak i liofilizowanej, nie odbiega w zasadzie od objawów obserwowanych na początku jej stosowania w Polsce.

Wiśniowski (28) stwierdzał u jałówek szczepionych w wieku 10—13 miesięcy adsorbowaną S-19 duże, długo utrzymujące się obrzęki mogące mieć pewien wpływ na wysokość mian serologicznych krwi.

W pracach nad zagadnieniem reakcji poszczepiennych u bydła po stosowaniu szczepionki

S-19 dużo uwagi poświęca się sprawie zaburzeń w produkcji mleka. *King, Eddington, Frank (12)* stwierdzają, że szczepienie krów przeciw zakaźnemu ronieniu wpływa tylko nieznacznie na spadek ilości mleka. Szczegółowa analiza poszczepiennego spadku mleczności bydła w latach 50 wykazała w Polsce stratę 19% mleka udoju dziennego. Stwierdzano wtedy, że u krów mających wyższą wydajność mleka w chwili szczepienia straty były procentowo mniejsze, niż u sztuk o niskich udojach. Stwierdzono także, że reagowanie spadkiem mleczności przy rewakcytacji jest analogiczne jak i po pierwszym szczepieniu (*Tekliński 22*).

Wyniki niniejszej pracy dotyczące zaburzeń w produkcji mleka nie odbiegają w zasadzie od danych przytoczonych z piśmiennictwa. Precyzują one natomiast, na podstawie dość obszernego materiału, ogólną stratę mleka u krów dojnych po zastosowaniu szczepionki S-19 na około połowę ich produkcji dziennej.

W n i o s k i

1. Na podstawie analizy statystycznej serologicznych mian poszczepiennych surowic krwi krów oraz młodych zwierząt, bydła szczepionego przeciw zakaźnemu ronieniu krów, nie wykazano istotnych różnic w wartości antygenowej między szczepionkami S-19 liofilizowanymi i płynnymi. Nie ma zatem podstaw do odrzucenia hipotezy H_0 dla poziomu istotności $\alpha = 0,01$.

2. Porównywanie w ciągu roku mian serologicznych krwi, bydła szczepionego w różnym wieku szczepionką S-19 wykazało utrzymywanie się wyższego miana aglutynacyjnego u krów niż u młodych zwierząt jedynie po 6 miesiącach od szczepienia. Miano to po 3 i 12 miesiącach oraz miano wiązania dopełniacza po 3, 6 i 12 miesiącach od chwili szczepienia nie wykazało, istotnych statystycznie, różnic w poziomie obecności przeciwciał u krów i młodych zwierząt.

3. Z pośród krów uodpornianych S-19 stwierdzono, w rok po szczepieniu, dodatnie miano aglutynacyjne u 57,7% a dodatnie miano wiązania dopełniacza u 14,6% sztuk. U szczepionych zwierząt, po roku odpowiednie liczby wynoszą 40,1% dla odczynu aglutynacji i 5,4% dla odczynu wiązania dopełniacza.

4. W liofilizowanych szczepionkach wykazano utrzymywanie się wymaganej ilości żywych drobnoustrojów przez okres 4—8 miesięcy.

5. Szczepionki liofilizowane użyte w 87 do 235 dni od ich wyprodukowania wykazały niezmienną wartość antygenową. Potwierdza to znacznie wyższą ich przydatność terenową od szczepionek płynnych, które mają jedynie 14-dniowy termin ważności.

6. Dwukrotne zwiększenie koncentracji żywych drobnoustrojów w dawce szczepionki nie

miało w przeprowadzonych doświadczeniach, istotnego wpływu na wysokość poszczególnych mian surowicy krwi.

7. Strata w produkcji mleka obserwowana po szczepieniu krów dojnych wahała się średnio w granicach 48% jednego udoju dziennego za cały okres poszczepienny.

Piśmiennictwo

1. Abalchin K. A., Krasnow W. A.: Wietierinarija 10, 36 (1958).
2. Andrijewski P., Tekliński A.: Próby osłabienia zjadliwości *Pasteurella multocida* przez zamrażanie. (1933). Praca nie publikowana.
3. Aschood-Smith M. J.: Cryobiology 1, 39 (1965).
4. Blagoutieszceńska G. S.: Wietierinarija 5, 28 (1954).
5. Coullins J. M.: La préparation du vaccin *Brucella Abortus* (Souche 19) sous la forme lyophilisée. Traité de Lyophilisation. Monografia zbiorowa. Paris (1960).
6. Gromatzki H., Teute H. W.: B. M. T. W. 17, 323 (1958).
7. Hellman E.: Mh. f. Tierhik, Rindertub. u. Bruc. 137 (1957).
8. Hulse E. C.: Proc. 4-th International Conference Biological Standards. Bruxelles (1958).
9. Iwanow M. M.: Wietierinarija 7, 33 (1961).
10. Kilschperger G.: Schw. Arch. Tierheilk. 9, 509 (1957).
11. King N. B., Eddington B. H., Frank N. A.: Amer. J. vet. Res. 70, 93 (1958).
12. King N. B., Frank N. E.: J. Am. vet. med. Ass. 139, 100 (1961).
13. Kocowicz I., Ratomski S., Wiśniowski J.: Med. Wet. 3, 142 (1950).
14. Krauss S., Ugorski L.: Med. Wet. 1, 257 (1959).
15. Lipnicki J.: Med. Wet. 11, 656 (1955).
16. Rey L.: Traité de lyophilisation. Monografia zbiorowa. Paris (1960).
17. Van der Schaaf A., Jaartsveld F. H. J.: Vet. Rec. 74, 1070 (1962).
18. Schuster E. O.: D. T. W. 13, 360 (1959).
19. Seelmann M., Meyer A.: Mhf. Tierhik. 8 (1958).
20. Seelmann M., Börger H.: Mhf. Tierhik. 9 (1958).
21. Tiewosow A. M.: Wietierinarija 9, 25 (1961).
22. Tekliński A.: Szczepionki i ich stosowanie. *Brucelloza zwierząt domowych*. Monografia zbiorowa. Warszawa (1959).
23. Ulbrich F.: Bul. Off. int. Epiz. 54, 424 (1960).
24. Ulbrich F., Wiegand D.: Zbl. Vet. Med. 3, 249 (1960).
25. Wiesner E.: Zur Frage der Abortus-Bang-Schutzimpfung, 22, 631 (1957).
26. Wilson G. S., Miles A. A.: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. London (1957).
27. Wiśniowski J.: Med. Wet. 2, 65 (1961).
28. Wiśniowski J.: Med. Wet. 2, 65 (1964).
29. Wiśniowski J.: Med. Wet. 11, 641 (1964).

Adres autora: dr Antoni Tekliński, Warszawa 22, ul. Częstochowska 24, m. 2.

Теклинский А. — Влияние лиофилизации на иммуногенные свойства вакцины S19.

Во всех исследованных хозяйствах иммунизировали половину крупного рогатого скота лиофилизатом а другую половину жидкой вакциной S19. Оценку эффективности обеих вакцин проводили методом статистического анализа (тест согласия Холмгоровова — Смирнова на уровне значимости $\alpha = 0,01$) серологического титра сыворотки крови в реакциях агглютинации и связывания комплемента. Исследовали 1073 иммунизированных коров и 869 голов молодежи в 3, 6 и 12 месяцев после прививки.

Статистический анализ серологических титров иммунизированного скота не указывает на существенные различия в антигенических свойствах между лиофилизированной и жидкой вакциной. Не установлено тоже существенных различий во времени сохранения положительного титра агглютинации и связывания комплемента у иммунизированных коров и молодежи за исключением реакции агглютинации в 6 месяцев после прививки, которая у коров была сильнее. В год после вакцинации положительный агглютинационный титр установили у 57,7% коров и 49,1% молодежи, а положительный титр связывания комплемента у 14,6% коров и 5,4% молодежи. Даже двухкратное увеличение концентрации бактерий в вакцине S19 не повлияло существенным образом на высоту серологического послепрививочного титра.

Общие потери молока у 960 наблюдаемых коров составили за весь послепрививочный период 48% суточного удоя.

Теклиński А. — The effect of liophilization on the antigen value of vaccine S-19.

The investigations were intended to show the possible effect of the process of liophilization on the antigen value of the vaccine S-19 against infectious abortion in cows. In each of the farms one half of the cows were immunized with liophilized S-19, the other half with liquid vaccine. The estimate of the value of both vaccines was based on statistical analysis (the Kolmogorov-Smirnov agreement test on the level of significance $\alpha = 0,01$) of the serological titres of the blood: agglutination and the supplement linking test. 1073 vaccinated cows and 869 heifers were investigated 3,6 and 12 month after vaccination.

Statistical analysis of the serological titres of the vaccinated cattle did not show significant differences in antigen values between the liophilized and liquid vaccines. No significant differences were found in the maintenance of agglutination titres and supplement linking in vaccinated heifers and cows, except in agglutination 6 months after vaccination, when there was a higher value in cows. One year after vaccination, a positive agglutination titre was found in 57,7% cows and 49,1% of heifers, while a positive reaction of supplement linking was noted in 14,6% of cows and 5,4% of heifers. Even a two-fold increase in concentration of bacteria in the vaccine dose of S-19 had no significant effect on the height of post-vaccine serological titres.

The total milk loss in 960 cows observed, vaccinated with S-19, was, for the whole post-vaccination period, 48% of a daily milk yield.

Теклиński А. — L'influence de la lyophilisation sur la valeur antigène du vaccin S-19.

Les investigations effectuées avaient pour but de démontrer l'influence possible du processus de lyophilisation sur la valeur antigène du vaccin contre la brucellose S-19.

Dans chaque ferme la moitié des bovins était immunisée à l'aide du vaccin S-19, lyophilisé, la deuxième moitié à l'aide du vaccin liquide. L'évaluation de ces deux vaccins était appuyée sur l'analyse statistique (test d'accord de Kolmogorow-Smirnow à base de la réalité = 0,01), les titres sérologiques sanguins: l'agglutination et la fixation du complément. L'expérience embrassa 1073 vaches vaccinées et 869 jeunes bovins, examinés 3, 6, et 12 mois après la vaccination.

L'analyse statistique des titres sérologiques des bovins vaccinés ne démontra pas de différences réelles dans la valeur antigène des vaccins lyophilisés et liquides. On ne démontra pas de différences substantielle dans le maintien des titres d'agglutination et de la fixation du complément chez les jeunes bovins et les vaches à l'exception de la réaction d'agglutination effectuée 6 mois après la vaccination, qui démontra une valeur plus élevée chez les vaches.

Un an après la vaccination on constata des titres d'agglutination positifs chez 57,7% de vaches et 49,1% de jeunes bovins, ainsi qu'une réaction de la fixation du complément positive chez 14,6% de vaches et 5,4% de jeunes bovins.

Même une concentration deux fois plus grande des microorganismes dans la dose du vaccin S-19 n'avait pas d'effet substantiel sur la valeur des titres après la vaccination.

La perte générale du lait chez 960 vaches observées, vaccinées à l'aide de la souche S-19 comportait pour la période entière d'après la vaccination 48% de la traite journalière.

Теклиński А. — Einfluss der Lyophilisation auf den antigenen Wert des Vakcins S—19.

Durchgeführte Untersuchungen bezweckten einen eventuellen Einfluss der Lyophilisation auf antigenen Wert des gegen seuchenhaftes Verwerfen der Kühe-Vakcins S-19 nachzuweisen. In jeder Wirtschaft

wurde der eine halbe Rinderbestand mit dem lyophilisierten S-19, der andere mit flüssigem Vakcin immunisiert. Wertbeurteilung beider Vakcine ist auf statistische Analyse (Einheitstest Kołmogorow — Smirnow — Wesentlichkeitsspiegel 0,01) der serologischen Bluttitel gestützt worden: Agglutination und Komplexbinding. Das Experiment hat 1073 vakcinierete Kühe und 869 Jungrinder in 3,6 und 12 Monate nach der Impfung umfasst. Statistische Analyse der serologischen Titer der vakcinieren Rinder hat keine wesentlichen Differenzen bezüglich des antigenen Wertes der lyophilisierten und flüssigen Vakcine erwiesen. Es wurden auch keine wesentlichen Unterschiede in der Aufrechterhaltung der Agglutinationstiter und der Komplexbinding bei den vakci-

nieren Jungrinder und Kühen wahrgenommen. Eine Ausnahme bildete bloss die Agglutination sechs Monate nach der Impfung, welche sich bei den Kühen höher gestaltete. Ein Jahr nach der Vakcinierung sind positive Agglutinationstiter bei 57,7% Kühe und 49,1% der Jungrinder beobachtet worden, positive Reaktion der Komplexbinding trat bei 14,6% Kühe und 5,4% Jungrinder auf. Sogar eine Verdopplung der Mikroorganismenkonzentration in der Dosis S-19 übte keinen wesentlichen Einfluss auf die Höhe der postvakzinalen serologischen Titer aus. Der allgemeine Milchverlust bei 960 beobachteten und mit S-19 vakcinieren Kühen für den ganzen postvakzinalen Zeitraum hat 48% des taglichen Gemelkes ergeben.

JANUSZ LIPNICKI

Warszawa

Obowiązujące wytyczne dotyczące rozpoznawania i zwalczania brucelozy bydła*)

Przypadki ronięcia u krów występują stosunkowo często. Lagneau (9) ocenia, że około 15 do 20% krów cielných roni, a według Blaringhema (cyt. 9) na 100 krów mlecznych, które osiągnęły ósmy rok życia i optymalną produkcję mleczną, 50% roniło, raz, dwa lub trzy razy. Poronienia mogą być na tle zakaźnym, bądź z innej przyczyny bez udziału jakiegokolwiek drobnoustroju. Z ogólnej liczby poronień około 45% jest tła zakaźnego; natomiast z ogólnej liczby poronień na tle zakaźnym 75 do 80% spowodowanych jest pałeczką *Brucella abortus*. Wraz z wydalaniem płodu, błon płodowych i odchodów macicznych bogatych w brucele, poronienie jest przyczyną znacznego siewstwa bruceli przez 2 lub 3 tygodnie, powstaje zatem wielkie niebezpieczeństwo dla krów stojących w sąsiedztwie, a następnie zarażenie całej obory.

Wydzielina pochłowa może być zaraźliwa podczas kilku tygodni, najdalej jednak do 6 miesięcy po porodzie (poronieniu). U nieciążarnych zwierząt (krowy, jałówki) brucele przeważnie umiejscawiają się w wymieniu i węzłach chłonnych nadwymieniowych oraz biodrowych; w innych węzłach chłonnych, jak wątrobowe, śródpiersiowe itd., brucele lokują się w 10 do 20% przypadków.

Wydalanie bruceli z mlekiem następuje zazwyczaj w ciągu krótkiego okresu po porodzie, przy czym liczba pałeczek w 1 ml dochodzi niekiedy do 100.000 lub 200.000 w pierwszych tygodniach. To wydalanie może też występować podczas całego okresu laktacji, lub w niektórych przypadkach podczas kilku następujących po sobie laktacji. Zarażenie u bydła może nastąpić *per os*, przez spojówkę, przez skórę uszkodzoną, lub nawet nieuszkodzoną i *per vaginam* (za pośrednictwem zakażonego buhaja, lub sztucznej inseminacji), natomiast zarażenie na skutek wdychania kurzu, lub pyłu zawierającego wysuszone cząstki wydaliny, lub wydzielin zwierząt zakażonych, jak to zdarza się przy brucelozie kóz i owiec (brucele zachowują zjadliwość w wełnie owczej do 115 dni, a w nawozie do 160 dni), nie wchodzi w rachubę przy brucelozie bydła. Człowiek zaraża się od bydła, spożywając mleko i produkty mleczne, przygotowane z mleka surowego, pochodzącego od krów dotkniętych brucelozą, następnie poprzez skórę w trakcie zabiegów lekarskich u chorych zwierząt, lub przy obsłudze zwierząt dotkniętych brucelozą, a także poprzez spojówkę. Natomiast człowiek zakażony *Brucella abortus* praktycznie nie przedstawia niebezpieczeństwa dla bydła. Niezmiernie więc ważne

jest dla ochrony zdrowia ludzkiego, poza zachowaniem niezbędnych środków ostrożności przy pracy i zabiegach w oborze zakażonej, aby unikać picia mleka surowego, i aby masło i sery nie były wyrabiane z mleka surowego, a zwłaszcza sery miękkie (np. camembert, Münster), w których żywość bruceli utrzymuje się aż do końca ich zdolności konsumpcyjnej. Jak stwierdził Kästli i Hausch (8) w serach twardych (np. ementalski, grojer, roquefort) i półmiękkich (np. tyłczyki) zarazki te giną przed wpływem okresu dojrzewania tych serów, a zatem przed oddaniem ich do spożycia. W mleku świeżym brucele zachowują zjadliwość 20 do 60 dni, w mleku kwaśnym do 3 tygodni. Masło z niepasteryzowanej śmietanki może zawierać zjadliwe brucele do 67 dni.

Rozpoznawanie brucelozy bydła. W celu należytego zwalczania brucelozy bydła podstawową kwestią jest przeprowadzenie właściwego rozpoznania. Do wykrywania stosuje się przede wszystkim badanie serologiczne (aglutynacja, odczyn wiązania dopełniacza, próba pierścieniowa z mlekiem, w szczególnych przypadkach odczyn Coombsa), czasami badanie bakteriologiczne (np. przy poronieniach). Rozpoznanie serologiczne, pomimo błędów sięgających 5 do 10% badanych prób, mogłoby nam skutecznie wykrywać brucelozę, gdyby szczepienie S 19 bez uprzedniego badania zwierząt na brucelozę, bez zaznaczenia w dokumentacji i założenia kolczyka „S 19”, (rewakcyjnacja) w poważnym stopniu nie utrudniało diagnozy, czyniąc niemożliwym jakiegokolwiek odróżnienie zwierząt szczepionych od zwierząt zakażonych.

W celu wykrycia brucelozy w oborze najlepiej używać próby pierścieniowej z mlekiem (ABR lub RT), bardzo czulej, gdyż mleko krowy reagującej dodatnio można zmieszać z mlekiem od 12, a nawet 15 krów niereagujących, zdrowych, i próba wypada dodatnio. Próba ta służy przede wszystkim do wykrywania obór zakażonych. Przeciwciała w mleku mogą pochodzić bądź z surowicy krwi, bądź w następstwie zakażenia węzłów chłonnych nadwymieniowych; to ostatnie zakażenie jest szczególnie częste. Otóż główna część przeciwciał brucelozowych w mleku pochodzi z tych węzłów, a przeciwciała z surowicy krwi praktycznie są w mleku tylko na początku i na końcu laktacji. Próba ABR jest bardzo praktyczna, prosta, ma duże znaczenie orientacyjne, zwłaszcza w gospodarstwach wielkostatdnych, lub na terenach wolnych od brucelozy bydła. Nie nadaje się ona do stosowania w ciągu 20 dni po porodzie lub po poronieniu, podczas zatrzymania łożyska, w ostatnich 3 miesiącach przed wycieleniem (krowy zapuszczone), u krów z procesami zapalnymi wymienia i w przebiegu cięż-

*) Referat wygłoszony na zjeździe lekarzy weterynarii województwa warszawskiego i PTNW w Warszawie dnia 22.I.1966 r.