

TADEUSZ KOBUSIEWICZ, CZESŁAW BARANOWSKI, MARIA LATAŁA-NIEDZIELSKA,
WIEŚŁAWA ŁĄBĘCKA, STEFAN SZKILNIK, JERZY WIŚNIEWSKI

Próby uodpornienia bydła szczepionką zawierającą żywy lapinizowany wirus pryszczycy

Instytut Weterynarii — Zakład Badania Pryszczycy w Zduńskiej Woli
Kierownik: doc. dr T. KOBUSIEWICZ

W ciągu długiego okresu czasu zarazek pryszczycy namnażano wyłącznie na językach bydła. Znana była również wrażliwość świnek morskich na sztuczne zakażenie wirusem pryszczycy.

Wzrastająca produkcja szczepionek p/pryszczycowych powodowała konieczność pozyskiwania coraz większych ilości materiału wirusowego. Metoda klasyczna — namnażanie na językach — stała się niewystarczająca.

Prace poszły zasadniczo w dwu kierunkach:
a) uzyskiwania wirusa pryszczycy *in vitro* oraz
b) namnażania zarazka w organizmach zwierząt, uważanych poprzednio za niewrażliwe na pryszczycę.

Pierwszy kierunek zapoczątkowany w latach trzydziestych (*Frenkel, Ribelin* — 3, *Hacke* — 4, *Maitlandowie* — 5) stosowany jest obecnie na skalę przemysłową przy użyciu metody *Frenkela* i namnażania wirusa na jednowarstwowej hodowli komórek nerkowych (*Mammerickx* i wsp. — 6, *Mazzaracho* i wsp. — 7, *Mitev* i wsp. — 8, *Muntiu* i wsp. — 9, *Ubertini* i wsp. — 13).

Prace *Skinnera* (12) wykazujące możliwość zakażenia wirusem pryszczycy osesków myszy i szczurów, dały początek usiłowaniom mającym na celu otrzymanie zmodyfikowanego zarazka nieszkodliwego dla bydła i trzody, a zachowującego właściwości odpościowe. Szczególnie wiele prac poświęcono zagadnieniu namnażania zarazka pryszczycy na oseskach króliczych.

Liczne badania wykazały (*Cunha* i wsp. — 2, *Ratner* i wsp. — 10, 11, *Verge* i wsp. — 14), że zarazkiem pryszczycy pochodzenia bydłowego można zakażać oseski królicze, o ile wiek ich nie przekracza 2—4 dni oraz przeprowadzić dowolną ilość ciągłych pasaży. W ustroju starszych królików wirus bydłowy może również się namnażać, ale proces ten przebiega bezobjawowo (*Ciacco* — 1). W miarę pasażowania i postępującego przystosowania się zarazka można używać królików starszych.

Stwierdzenie, że wirus lapinizowany dość szybko staje się nieszkodliwy dla bydła oraz daje odporność (*Ratner* i *Gribanow* — 10, *Verge* i wsp. — 14), skłoniło nas do podjęcia prac nad przystosowaniem krajowego szczepu wirusa O do królików oraz do zbadania właściwości immunobiologicznych lapinizowanego zarazka pryszczycy.

Materiał i metody

W doświadczeniu zarazkiem wyjściowym był zarazek bydłowy typu O szczep J-56, o mianie $10^{7,65}$ I D₅₀ dla bydła — w 1 g materiału.

Adaptację szczepu bydłowego wirusa pryszczycy rozpoczęto na królikach 1-dniowych, bezrasowych z własnej hodowli, a następnie w miarę narastania liczby pasaży udawało się zakażenie królików starszych. Przy pasażu 8 zakażono królika 7-dniowego, przy 13 — 11-dniowego, przy 15 — 20-dniowego. Króliki zakażano domięśniowo zawiesiną wirusa w rozcieńczeniu 1:10 w fosforanowym płynie buforowym o pH 7,2—7,4. Do sporządzania zawiesiny używano tuszek króliczych pozbawionych skóry, głowy i dolnych odcinków kończyn. Króliki preparowano bezpośrednio

po uśpieniu w stadium zupełnego porażenia lub po padnięciu.

U zakażonych królików obserwowano następujące objawy kliniczne: postępujący niedowład mięśni kończyn tylnych, następnie przednich, a wreszcie głowy. Typowe zmiany anatomopatologiczne obserwowano przy sekcji królika 20-dniowego, który padł w 6 dni od chwili zakażenia. Zmiany te miały postać zwyrodnienia mięśni szkieletowych. Z uwagi na przedłużający się — u królików starszych — okres w rozwoju procesu chorobowego do pasażowania stosowano przeważnie króliki młodsze — 4—8-dniowe, które reagowały w okresie 24 godzin. Obecność wirusa pryszczycy w tkankach królików stwierdzano metodą biologiczną, zakażając świnki morskie, oraz odczynem wiązania dopełniacza.

Zjadliwość lapinizowanego zarazka dla bydła stwierdzono metodą Hendersona mianując wirus na językach bydła.

Po utraceniu cech zjadliwości dla dorosłego bydła z uzyskanego materiału przygotowano żywą szczepionkę, którą sprawdzano na nieszkodliwość i skuteczność na bydle i trzodzie chlewnej.

W doświadczeniach z trzodą chlewną szczepionkę wprowadzano podskórnie u nasady ucha. Zakażenie kontrolne świń uodpornianych oraz próby nieszkodliwości zarazka lapinizowanego przeprowadzano wstrzykując zawiesinę zarazka pod skórę szpary rancicowej i do tarczy ryja.

Bydło uodparniano dawką 3 ml szczepionki tj. dając 200—300 mg materiału wirusowego, a po 21 dniach zakażono wprowadzając u bydła podśluzówkowo do języka 10.0000 ID ID₅₀ zjadliwego zarazka homologicznego typu w 0,2 mg zawiesiny.

Wyniki

W pracach prowadzonych na przestrzeni kilku ostatnich lat w naszym Zakładzie, zaadaptowano do królików wirus pryszczycy typu O oraz uzyskano 318 ciągłych pasaży zarazka na królikach.

Zakażając młode 1—8-dniowe króliki wirusem pryszczycy, obserwowano pierwsze objawy chorobowe nieraz już po kilku godzinach. Występowały trudności ruchowe, przechodzące w porażenie tylnej części ciała. Porażenie rozszerzało się stopniowo na przednie kończyny i przednią część ciała. Królik padał po 18—24 godzinach po zakażeniu. Sekcyjnie stwierdzono porażenie pęcherza wypełnionego dużą ilością moczu, żołądek wypełniony mlekiem. W mięśniach szkieletowych obserwowano wynacznienie i zmiany degeneracyjne nieraz bardzo rozległe.

W miarę postępowania pasaży w kontroli na bydle obserwowano stopniowe zanikanie cech zjadliwości pasażowanego szczepu w stosunku do bydła dorosłego.

Zarazek od 118 pasażu utracił zupełnie zjadliwość w stosunku do dorosłego bydła. Próbę przeprowadzono na 2 jałówkach, które mimo zastrzyknięcia 200 mg materiału wirusowego

w zawieszynie w płynie buforowym pod śluzówką języka nie uległy zakażeniu. W czasie 10-dniowej obserwacji oraz przy badaniu poubojowym nie zaobserwowano u szczepionych zwierząt żadnych zmian charakterystycznych dla pryszczycy. Natomiast stwierdzono pełną zjadliwość zarazka z tego pasażu dla świnek morskich.

Próbie na nieszkodliwość szczepionki przygotowanej z żywego lapinizowanego wirusa powtórzono używając zarazka z dalszych pasażu. Dawki wirusa wahały się od 200—2000 mg lapinizowanego szczepu w rozcieńczeniu 1:10. Wyniki ilustruje tabela 1.

Tab. 1

L. p.	Pasaż nr	Ilość wprow. materiału wirusowego	Ilość zwierząt	Czas obserwacji	Wynik
1	118	200 mg	2	10 dni	brak zmian
2	174	200 mg	4	10 dni	brak zmian
3	174	500 mg	4	10 dni	brak zmian
4	194	2000 mg	3	15 dni	brak zmian
Kontrola nieszkodliwości na trzodzie chlewnej					
1	213	400 mg	5	6 dni	uogólnienie procesu chorobowego

Szczep zachował zjadliwość dla trzody chlewnej, bowiem wszystkie zwierzęta zachorowały z uogólnionymi objawami pryszczycy.

Chcąc sprawdzić działanie wirusa lapinizowanego na organizm młodych zwierząt zastrzyknięto — w pomieszczeniu ściśle izolowanym — 4 cielętom w wieku 4 tygodni podskórnie po 200 mg materiału wirusowego ze 194 pasażu. Z zakażonych cieląt 2 padły na czwarty dzień po zakażeniu, 2 pozostałe poddano ubojowi z konieczności. U cieląt nie zaobserwowano zewnętrznych objawów typowych dla pryszczycy, natomiast sekcyjnie stwierdzono u wszystkich — rozległe zmiany zwyrodnieniowe w mięśni sercowym (serce tygrysie). Cztery pro-

sięta zakażone zarazkiem z tego samego pasażu zachorowały po 5 dniach z uogólnionymi objawami pryszczycy.

Badanie na skuteczność

Zarazek uzyskany po pasażu 174 użyto do próby uodpornienia bydła przeciwko zakażeniu wysoko-zjadliwym zarazkiem pryszczycy. W tym celu 8 jałówkom wagi 285—340 kg wstrzyknięto podskórnie po 300 mg lapinizowanego materiału wirusowego w zawieszynie 10%. Zwierzęta te wraz z dwoma jałówkami kontrolnymi pozostawały we wspólnym pomieszczeniu pod obserwacją przez 10 dni — żadne ze zwierząt nie zachorowało. Po 10 dniach zakażono zwierzęta uodpornione wraz z kontrolnymi przez podśluzówkowe wstrzyknięcie do języka 10.000 ID₅₀ zjadliwego zarazka pryszczycy pochodzenia bydłowego. U zwierząt kontrolnych stwierdzono uogólniony proces chorobowy. Zwierzęta, którym zastrzyknięto poprzednio zarazek lapinizowany, okazały się niewrażliwe na zakażenie. Wyniki zestawiono w tabeli 2.

Dodatkowo przeprowadzono badanie skuteczności używając 3 szt. bydła, które otrzymało po 2.000 mg materiału wirusowego przy badaniu nieszkodliwości. Zwierzęta te zakażone po 15 dniach dawką 10.000 ID₅₀ wykazały pełną odporność.

Wyniki kontroli na skuteczność dalszych pasażu ilustruje tabela 3.

Przy pasażu 207 badanie na skuteczność w 3 dni po uodpornieniu dało wynik ujemny (na 7 sztuk bydła — 4 generalizacje). Krowy zaszczone szczepionką z pasażu 213 — po 18 dniach od uodpornienia wykazały odporność. Szczepionka z pasażu 227 przygotowana była na królikach 21-dniowych i nie dawała odporności, do pozostałych szczepionek używano króliki 4—8 dniowe. Pasaż 246 w dawce 300 mg po 21 dniach dawał u bydła szczepionego dobrą odporność.

Tab. 2

L. p.	Pasaż	Ilość wprow. zarazka lapin.	Ilość użytego bydła	Czasokres uodpornienia	Sposób zakażenia	W y n i k i:			
						Brak zmian	Zmiany miejscowe	Uogóln. proces chorob.	Kontrola
1	174	200 mg	4	10 dni	podśluz. 10.000 ID ₅₀	4	—	—	uogólniony proces chorobowy
2	174	500 mg	4	10 dni	„	4	—	—	„

Tab. 3

L. p.	Pasaż	Ilość wprow. zarazka lapin.	Ilość użytego bydła	Czasokres uodpornienia	Sposób zakażenia	W y n i k i:			
						Brak zmian	Zmiany miejscowe	Uogóln. proces chorob.	Kontrola
1	207	200 mg	7	3 dni	podśluz. 10.000 ID ₅₀	1	2	4	uogólniony proces chorobowy
2	213	200 mg	4	18 dni	„	3	1	—	„
3	227	200 mg	3	21 dni	„	—	1	2	„
4	221	300 mg	3	21 dni	„	2	—	1	„
5	246	300 mg	6	21 dni	„	5	1	—	„

Dla stwierdzenia długotrwałości nabytej odporności przebadano bydło w 30 i 150 dni po uodpornieniu. Wyniki ilustruje tabela 4.

panionki z wirusa lapinizowanego wydaje się w praktyce weterynaryjnej wysoce niebezpieczne.

Tab. 4

L. p.	Pasaż	Ilość wpraw. zarazka lapin.	Ilość użytego bydła	Czasokres uodpornienia	Sposób zakażenia	W y n i k i:			
						Brak zmian	Zmiany miejscowe	Uogóln. proces chorob.	Kontrola
1	213	200 mg	6	30 dni	podśluz. 10.000 ID ₅₀	4	1	1	uogólniony proces chorobowy
2	246	300 mg	5	150 dni	„	3	1	1	„

Szczepionką z pasażu 213 zaszczepiono 6 jałówek dawkami à 200 mg wirusa. W 30 dni po uodpornieniu zakażono zwierzęta dawką 10.000 ID₅₀ — jedna jałowka miała uogólniony proces chorobowy. Podobny wynik uzyskano przy pasażu 246, gdzie po 150 dniach od uodpornienia również jedna jałowka miała uogólniony proces chorobowy.

Szczepionką z pasażu 246 zaszczepiono również 4 warchlaki o wadze ca 45 kg stosując dawkę szczepionki 10 ml. Zakażenie przeprowadzone w 21 dni po szczepieniu: 3 zwierzęta z czterech uodpornionych zachorowały z uogólnionymi objawami pryszczycy.

Z pasażu 315 przygotowano szczepionkę 10% jak poprzednio. Zastosowano ją u 6 cieląt w wieku ca 4 tygodni w dawce 5 i 10 ml: po 3 dniach zachorowały wszystkie zwierzęta — jedno padło, u dwóch sekcyjnie stwierdzono zmiany martwicze w mięśniu sercowym.

W n i o s k i

1. Szczep bydłocy wirusa pryszczycy pasażowany na oseskach króliczych utracił chorobotwórcze właściwości dermatropowe dla dorosłego bydła począwszy od 118 pasażu.

2. Bydło zaszczepione wirusem z pasażu nr, nr: 174, 194, 213 i 246 wykazało odporność na zakażenie zarówno drogą wciarki (aftyzacji), jak również na wprowadzenie 10.000 ID₅₀ zarazka pryszczycy w błonę śluzową języka. Badanie długotrwałości wykazało częściowy zanik odporności już po 30 dniach.

3. Szczepionka przygotowana z królików 21-dniowych nie dała odporności u szczepionego bydła.

4. W okresie pasażowania wirus zatracił własności dermatropowe natomiast nasilił chorobotwórcze cechy myotropowe, wywołujące u cieląt zwyrodnienie mięśnia sercowego o różnym nasileniu, które było powodem licznych upadków.

5. Próby uodpornienia trzody chlewnej lapinizowanym zarazkiem nie dały pozytywnych wyników.

6. Dość dobre wyniki uodpornienia szczepem lapinizowanym przygotowanym z mięśni młodych królików uzyskano jedynie u bydła dorosłego o dobrej kondycji. Biorąc jednak pod uwagę upadki cieląt, stosowanie żywej szcze-

P i s m i e n n i c t w o

1. G. Ciacco: Rev. Immunol. 21, 1957, 285.
2. R. G. Cunha, E. A. Eichhorn: Am. J. of. Vet. Res. XX, 74, 1959, 133.
3. H. S. Frenkel, W. E. Ribelin: Am. J. Vet. Res. 17, 1956, 40.
4. F. Hecke: Zbl. für Bakt. 116, 1930, 386.
5. M. C. Maitland, M. B. Maitland: J. of. Camp. Path end Ther. 44, 1931, 106.
6. Mammerickx M., Leunen J.: Bull. Int. Epiz. 65 (3-4), 337-348, 1966.
7. Mazzaraccio V., Zavagli V., Orfei Z., D'Amore A., Ravaioli L., Castagnoli B.: Bull. Off. Int. Epiz. 49 (1-2), 91, 1958.
8. Mitev G., Wassilewa L., Tekerlekow P.: Archiv. für Exper. Veter. 20 (11), 85-90, 1966.
9. Muntiu N., Dohotaru V., Popa M., Bercan A., Sava I.: Archiva Veterinaria 1 (1), 59-66, 1965.
10. L. Ratner, W. Gribanow: Bull. Off. 43, 1955, 660.
11. L. Ratner, W. Gribanow, E. Sokotowa, A. Bobyr: Wieter. 4, 1955.
12. H. H. Skinner: Proc. Roy. Soc. Med. 44, 1951, 101.
13. Ubertini B., Nerdelli L., Dal Prato A., Panina G., Santoro G.: Bull. Off. Int. Epiz. 57 (5-6), 634-650, 1962.
14. J. Verge, A. Paraf, L. Dhennin, J. Asso: Bull. Off. 1960, 619.

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

Кобусевич Т., Барановски Ч., Лятала-Недельска М., Лабэнцка В., Шкильник С., Висьневски Е. — **Попытки иммунизации крупного рогатого скота вакциной содержащей живой лапинизированный вирус ящура.**

Произвели 318 пассажей через крольчата-сосуны вируса ящура типа О. После 118 пассажей штамм сделался апатогенным для взрослого крупного рогатого скота. Живая вакцина приготовленная из этого лапинизированного штамма давала хорошие кратковременный иммунитет. Штамм сохранил однако вирулентность для телят; привитые телята погибали вследствие дегенерации сердечной мышцы. Штамм потерял дермотропные, а приобрел мьотропные свойства; у павших телят наблюдали „тигровидные сердца” при отсутствии других характерных для ящура изменений.

Kobusiewicz T., Baranowski Cz., Latała-Niedzielska M., Labęcka W., Szkilnik S., Wiśniewski J. — **Attempts to immunize cattle with vaccine containing lapinized foot-and-mouth live virus.**

Foot-and-mouth virus type O was adapted to suckling rabbits, attaining 318 continuous passages. After 115 passages the strain was found to be apathogenic for mature cattle. The live vaccine was prepared from the lapinized strain and gave good, though short-term, immunity to the mature cattle. The strain retained toxicity for calves, which died after the vaccine was administered, due to degeneration of the cardiac muscle. The strain lost its dermatropic properties and attained myotropic properties: in the post-mortem examinations of the calves, „tiger heart” was found in the absence of other foot-and-mouth changes.