

wtrętowych. W makrocytach sztucznych hodowli bck, zakażonych wirusem apś, stwierdza się oprócz jądra ciała wtrętowe zlokalizowane w plazmie komórek. Ciała te złożone są z takiej samej substancji jak jądro (DNA, Feulgen +) i pojawiają się w rozwiniętym stadium zakażenia. Podobne twory stwierdza się także w komórkach zakażonych.

Ponadto prowadzone są badania nad odpornością świń na apś. Dotychczas nie osiągnięto znamienych wyników. Wcześniejsze próby użycia szczepionek zawierających żywy, osłabiony wirus do czynnego, zapobiegawczego szczepienia świń — nie powiodły się. Trudności te związane są głównie z niekorzystnymi właściwościami immuno-biologicznymi wirusa apś, który — jak już wiadomo — ma małe właściwości uodporniające, mimo dużej zjadliwości i inwazyjności. Brak swoistych przeciwciał neutralizujących wirus apś w surowicy świń zakażonych warunkuje ponadto możliwość częstego powstawania długotrwałego nosicielstwa i siewstwa wirusa przez świnię. Świnie takie nie na-

bierają jednak odporności — mimo, że niektóre z nich są okresowo niewrażliwe na sztuczne zakażenie wirusem apś. Istota tej oporności nie jest bliżej znana. Być może, że gra tu rolę interferon.

Fakty te wskazują, że aczkolwiek apś jest w zasadzie zarazą znacznie wolniej szerzącą się niż np. pryszczycza, to jednak ze względu na niekorzystne właściwości wirusa należy ona do grupy trudnych do zwalczania, a przez to niebezpiecznych, zaraz zwierzęcych. Pogląd ten znajduje potwierdzenie w fakcie, że rzadko któremu krajowi udało się dotychczas zwalczyć zarazę po znacznym jej rozprzestrzenieniu się na obszarze danego kraju. Tym większy musi być przeto wysiłek służby weterynaryjnej naszego kraju, aby nie dopuścić do zawleczenia zarazy, a w przypadku ewentualnego stwierdzenia pojedynczych jej ognisk — do jej rozprzestrzenienia się.

Adres autora: prof. dr Henryk Janowski, Puławy, Al. Partyzantów 55, Instytut Weterynarii.

TADEUSZ KOBUSIEWICZ, JERZY WIŚNIEWSKI, STEFAN SZKILNIK,
CZESŁAW BARANOWSKI, JANINA JANKOWSKA, WIESŁAWA ŁABĘCKA

Przygotowanie próbnej szczepionki przeciwpryszczycowej z wirusa namnożonego w hodowli komórkowej

Instytut Weterynarii, Zakład Badania Pryszczycy w Zduńskiej-Woli
Kierownik: prof. dr T. KOBUSIEWICZ

Stwierdzenie przez Sellersa (15), a następnie Bachra i wsp. (3) możliwości namnażania wirusa pryszczycy w hodowli komórek nerkowych świń i cielęcia połączonego z występowaniem efektu cytopatogenego, spowodowało w szybkim czasie wprowadzenie tej nowej techniki do prac badawczych nad wirusem pryszczycy. Możliwość wyprodukowania taniej szczepionki p/pryszczycowej bez użycia bydła, skłoniła liczne laboratoria do podjęcia badań nad namnażaniem wirusa pryszczycy in vitro (Dinter, Wesslen — 4, Mazzaracho i wsp. — 12, Armbruster i wsp. — 2, Ubertini i wsp. — 17, Leunen i wsp. — 9, Anchew i wsp. — 1, Muntiu i wsp. — 13).

Celem niniejszej pracy było przygotowanie szczepionki p/pryszczycowej z krajowych szczepów wirusa pryszczycy, namnożonych w hodowli komórek nerki cielęcia oraz sprawdzenie jej właściwości immunogennych.

Materiał i metody

Hodowla komórek nerkowych. Do zakładania hodowli służyły komórki nerki cielęcia uzyskane w procesie trypsynizacji. Komórki zawieszano w roztworze z dodatkiem 0,5% hydrolizatu laktalbuminy, 10% surowicy bydlęcej oraz antybiotyków: penicyliny 100 j/ml i streptomycyny 100 mcg/ml. Zawiesinę komórkową o koncentracji 200.000—300.000 komórek w ml rozlewano do butelek Roux. Jednolity pokład komórkowy osiągnano po 4—6 dniach wzrostu

hodowli w 37°C, po czym — po zmianie płynu wzrostowego na utrzymujący (roztwór Earla bez dodatku surowicy) — hodowlę zakażano.

Wirus. Do zakażenia hodowli komórkowych zostały użyte trzy typy wirusa pryszczycy: wirus typu A — szczep RM/53, wirus C — szczep S/66 i szczep N/64 oraz wirus typu O — szczep St/62. Zarazek był uprzednio adaptowany do hodowli komórek nerkowych cielęcia i przeszedł przez kilka pasaży. Miano użytego szczepu wynosiło co najmniej 10⁷. Po 18—24 godzinach wzrostu w 37°C, gdy efekt cytopatogeny był całkowity, bądź prawie kompletny, zawiesinę zlewano, pozostawiając ją w lodówce w 4°C do czasu określenia miana infekcyjności (6) podanego w tabeli 1 oraz wykonania odczynu wiązania dopełniacza (8).

Szczepionka. Przygotowana szczepionka zawierała 60% zawiesiny wirusa o mianie co najmniej 10⁷ TCID₅₀/ml. Zarazek adsorbowany był na 2% roztworze wodorotlenku glinu, którego zawartość w szczepionce wynosiła 38%. Inaktywacja przebiegała w cieple 25° w ciągu 48 godzin, po uprzednim dodaniu 0,05% formolu. Szczepionki nr nr C₂ i C₃ nie zawierały saponiny. Seria C₄ otrzymała 0,5‰ saponiny (jako adiuwantu), w pozostałych szczepionkach oznaczonych symbolami C₈, C₁₀, O₁₂, A₁₉ i A₂₀ dodatek saponiny wynosił 1,0‰.

Zwierzęta doświadczalne. Badania nieszkodliwości i skuteczności szczepionki przeprowadzono na bydło nizinne czarno-białym, w wieku 1—2 lat. Przy badaniu nieszkodliwości szczepionkę stosowano w dawce 25 ml podskórnie do fałdu szyjnego oraz 5 ml w błonę śluzową języka. W badaniu skuteczności szczepionki stosowano różne dawki uodporniające (tabela 2 i 3).

Po upływie 21 dni od zastosowania szczepionki zwierzęta uodpornione oraz kontrolne poddawano

zakazaniu wprowadzając podśluzówkowo 10.000 ID₅₀ homologicznego szczepu wirusa pryszczycy. Szczepionkę przygotowaną z wirusa typu A przebadano również na długotrwałość odporności. Wyniki zamieszcza tabela 3. Badanie przeciwciał zobojętniających z surowicami bydła uodpornionego szczepionkami typu A przeprowadzono metodą stałych dawek wirusa (500 TCID₅₀/ml) i wzrastających rozcieńczeń surowicy przy współczynniku rozcieńczenia 2 (18).

W y n i k i

Przygotowano kilka serii doświadczalnych szczepionek typu A, C, O z wirusa namnożonego w hodowli komórek nerki cielęcej, którego miana infekcyjne przedstawia tabela 1

Tab. 1.

Typ wirusa	Nr szczepionki	Nr pasażu	Log. miana TCID ₅₀ /ml
Wirus C szczep S-60	C-2	7	7,13
" "	C-3 i C-4	8	8,17
szczep N-64	C-8	10	7,63
" "	C-10	17	7,17
Wirus O szczep St-62	O-12	8	8,0
" "	O-21	10	7,38
" "	O-24	13	7,17
" "	O-25	14	7,5
Wirus A szczep RM-53	A-19	10	7,5
" "	A-20	13	8,32

Wszystkie szczepionki badane na bydło okazały się nieszkodliwe.

Szczepionka nr C₂ bez dodatku saponiny oraz szczepionka C₄ z dodatkiem 0,5% adiuwantu nie wykazały właściwości uodporniających. Zwiększenie zawartości saponiny do 1% spowodowało wzrost mocy immunogennej wirusa i podniesienie stopnia odporności u bydła.

Szczepionki saponinowe typu C nr 8 i 10 oraz typu O wykazały właściwości uodporniające. Bydło zakażone 10.000 ID₅₀ wirusa homologicznego 21 dni po zaszczepieniu dawką 5 lub 10 ml było ochronione przed uogólnionym procesem chorobowym. Szczegółowe wyniki ilustruje tabela 2.

Szczepionki typu A nr 19 i 20 z dodatkiem 1% saponiny wstrzyknięte w dawce 5 ml, wykazały wysoką wartość uodporniającą. U żadnego zwierzęcia nie stwierdzono po ich zakażeniu najmniejszych śladów chorobowych. Miano przeciwciał zobojętniających wynosiło 2,31—2,37 log i nie ustępowało mianu stwierdzanemu w surowicy bydła uodpornionego szczepionką przygotowaną z wirusa naturalnego. Szczepionka ta użyta do kontroli trwałości odporności potwierdziła również właściwości uodporniające. W trzy miesiące po szczepieniu wszystkie 4 szczepione zwierzęta wykazały pełną odporność na zakażenie, przy uogólnionym procesie chorobowym u bydła kontrolnego. W 5 miesięcy po uodpornieniu, u jednej jałówki nastąpiło przełamanie odpor-

ności. Miano przeciwciał zobojętniających u tego zwierzęcia wynosiło 0,5 log., podczas gdy u dwóch pozostałych w tej grupie utrzymywało się jeszcze na poziomie 1,43 i 1,95 log. (tab. 3)

Tab. 2.

Szczepionka nr	Dawka szczep. ml	Czasokres uodpornienia dni	Zawartość saponiny	W y n i k i			Zwierzęta kontrolne
				Brak zmian	Zmiany miejscowe	Uogóln. proces chorob.	
C-2	20	21	bez saponiny	—	4	—	uogólniony proces chorobowy
	5	21		1	3	—	
C-3	20	21	bez saponiny	—	3	—	uogólniony proces chorobowy
	10	21		1	1	1	
	5	21		—	2	1	
	2,5	21		—	2	1	
	1	21		—	3	—	
C-4	20	19	0,5 promil	1	1	1	uogólniony proces chorobowy
	10	19		1	1	1	
	5	19		1	—	2	
	2,5	19		1	—	2	
	1	19		1	1	1	
C-8	10	21	1 promil	2	1	—	uogólniony proces chorobowy
	5	21		2	1	—	
C-10	10	21	1 promil	—	3	—	uogólniony proces chorobowy
	5	21		—	3	—	
O-12	10	21	1 promil	1	2	—	uogólniony proces chorobowy
	5	21		1	2	—	

Tab. 3.

Szczepionka nr	Dawka szczep. ml	Czasokres uodpornienia dni	Zawartość saponiny	W y n i k i			Zwierzęta kontrolne	Log. miana SN
				Brak zmian	Zmiany miejscowe	Uogóln. proces chorob.		
A-19	5	21	1 promil	4	—	—	uogóln. proces chorob.	2,31
A-20	5	21	1 promil	3	—	—	uogóln. proces chorob.	2,37
A-19	5	21	1 promil	—	—	—	uogóln. proces chorob.	1,50
	5	60		1	3	—		
	5	90		4	—	—		
	5	150		—	2	1		

O m ó w i e n i e

Z trzech typów wirusa pryszczycy użytych do produkcji szczepionki najwyższe właściwości uodporniające posiadał zarazek typu A. Potwierdził to wysoki stopień ochrony uodpornionego bydła oraz duży poziom przeciwciał zobojętniających w surowicy szczepionych zwierząt.

Zgodnie z wynikami wielu autorów (1, 4, 7, 9, 10, 12, 17, 19) stwierdzono możliwość

przygotowania aktywnych szczepionek p/pryszczycowych z wirusa namnożonego w hodowli komórkowej. Trzymiesięczna odporność po zastosowaniu badanej przez nas szczepionki wy- daje się nieco za krótka w porównaniu z wyni- kami innych autorów, którzy stwierdzili sku- teczność ochrony w 3, 6, 8, a nawet 12 miesię- cy po szczepieniu (Armbruster i wsp. — 2, Schneider i wsp. — 14, Ubertini i wsp. — 16, Muntiu i wsp. — 13).

Ubertini i wsp. (16) uodporniając trzy grupy świnek morskich szczepionką z wirusa z hodo- wli: normalną, 10-krotnie i 100-krotnie skon- centrowaną wykazali, że trwałość ochrony za- leży od koncentracji antygenu w szczepionce. Już szczepionka 10-krotnie skoncentrowana, zabezpieczała prawie 100% pogłowia świnek morskich w 9 miesięcy po uodpornieniu. Być może, że koncentracja antygenu wirusowego w naszej szczepionce była niewystarczająca dla uzyskania długotrwałej ochrony. W przemysło- wej produkcji szczepionki p/pryszczycowej w oparciu o wirus z hodowli komórkowej, Leu- nen i wsp. (9) zużywają około 25 cm² powierz- chni pokładu komórkowego do namnożenia wirusa potrzebnego na jedną dawkę szczepion- ki. W naszych warunkach wirus zawarty w dawce 5 ml namnażał się w pokładzie komórek o powierzchni 5 cm². Można więc sądzić, że zawartość antygenu w dawce szczepionki była zbyt mała, ażeby wywołać dłuższą trwającą od-orność. W świetle badań Girarda i wsp. (5), również zwiększenie ilości saponiny do 25 mg w dawce, może przyczynić się do dalszego pod- niesienia właściwości immunogennych szcze- pionki produkowanej z wirusa z hodowli ko- mórkowej.

Wnioski

1. Szczepionki p/pryszczycowe, monowalen- tne wyprodukowane z wirusa namnożonego w hodowli komórek nerkowych cieląt, z dodat- kiem 1‰ saponiny posiadały właściwości uodporniające.

2. Bydło uodpornione szczepionkami typu C i O w dawkach 5 i 10 ml, badane po 21 dniach wykazało odporność na sztuczne zaka- żenie wirusem pryszczycy.

3. Szczepionka typu A zastosowana w dawce 5 ml dawała u bydła całkowitą odporność, któ- ra utrzymała się przez co najmniej trzy mie- sięce. Po 5 miesiącach od uodpornienia stwier- dzono u jednej jałówki przełamanie odpor- ności.

4. Stwierdzono obecność wysokiego miana przeciwciał zobojętniających u zwierząt uod- pornionych szczepionką typu A, które stopnio- wo obniżało się utrzymując się jednak jeszcze przez 5 miesięcy po szczepieniu.

Piśmiennictwo

1. Anchow V., Cholakowa R., Boyadger S.: Veter. Med. Nauki (1) 23, 1965.
2. Armbruster O., Beck W., Garbe H. G., Pilz W., Selweckendiek O. E.: Mh. Tierhk. 11, 234, 1958.
3. Bachrach H. L., Hess W. R., Callis J. J.: Science 122, 1269, 1955.
4. Dinter Z., Wesslen T.: Bull. Off. Int. Epiz. 49, 1—2, 87, 1958.
5. Girard H. C., Čňarutamba U., Smitinondana P., Supavilai P.: Bull. Off. Int. Epiz. 61, 9—10, 1025, 1964.
6. Kobusiewicz T., Wiśniewski J.: Medycyna Wet. 21, 18 1965.
7. Kubin G.: Wien. Tierärztl. Monatschr. 49, 427, 1962.
8. Larski Z.: Wirusologia Weterynaryjna PWRiL, 1965.
9. Leunen I., Mammerickx M., Strobbé R.: Bull. Off. Int. Epiz. 59, 7—8, 1019, 1963.
10. Lichaczew N. W., Orłow S. D., Szemanowa G. F.: Wietierinaria Moskwa 39, 3, 64, 1963.
11. Lichaczew N. W., Zwjagin I. W., Machniuk R. A., Fiedorowa T. E., Kazancewa N. W., Malaczniukow W. A., Sankow S. D., Zujewa N. J.: Wietierinaria — Moskwa 43, 1, 1967.
12. Mazzarachio V., Zavagli V., Orfei Z., D'Amore A., Ravaioli L., Castagnoli B.: Bull. Off. Int. Epiz. 49, 1—2, 91, 1958.
13. Muntiu N., Dohotaru V., Popa M., Bercan A., Sara I.: Archiva Veterinaria 1, 59, 1965.
14. Schneider B., Jaeger O., Bengelsdorff H.: Bull. Off. Int. Epiz. 61, 9—10, 1013, 1964.
15. Sellers R. F.: Nature 176, 547, 1955.
16. Ubertini B., Nardelli L., Dal Prato A., Panina G., Santero G.: Bull. Off. Int. Epiz. 57, 5—6, 634, 1962.
17. Ubertini B., Nardelli L., Prato A., Panina G., Santero G.: Zbl. Veter-Med. 10, 2, 93, 1963.
18. Wiśniewski J.: Medycyna Wet., 21, 471, 1965.
19. Zavagli V., Mazzarachio V., Fontanelli E., Orfei Z., D'Amore A., Ravaioli L., Castagnoli B.: Bull. Off. Int. Epiz. 53, 657, 1960.

Adres autora: dr Jerzy Wiśniewski, Zduńska-Wola, ul. Wodna 7.

Кобусевич Т., Висневски Е., Шкильник С., Барановски Ч., Янковска Я., Лабенца В. — **Приготовление пробной антиафтозной вакцины из вируса размноженного в тканевых культурах.**

Приготовили несколько пробных серий моновалентных вакцин против типам А, С и О из вируса размноженного в тканевых культурах из почек телят. Вакцина типа А контролируемая на крупном рогатом скоте заражением 10 000 ID₅₀ гомологического вируса обнаружила хорошие иммунизирующие способности. Доза 5 мл предохраняла животных от контрольного заражения в три месяца после прививки. В сыворотке привитых установили высокий уровень противотел. Вакцины типа С и О примененные в дозе 5 и 10 мл, контролируемые только в 3 недели после прививки, предохраняли животных от генерализованного болезненного процесса.

Kobusiewicz T., Wiśniewski J., Szkilnik S., Baranowski C., Jankowska I., Łabęcka W. — **The preparing vaccins against Foot-and-Mouth disease from the virus multiplied in tissue culture.**

Several series were made of the experimental monovalent vaccines of A, C, and O types from the virus multiplied in the tissue culture of calf kidney. The vaccine of A type, controlled in cattle by the infection of 10 000 ID₅₀ of the homological virus and in reaction of neutralizing antibodies showed the good immunizing features. The 5 ml dose of vaccine protected cattle against the infection in three months after the immunization. In the serums of vaccinated animals the high level of neutralizing antibodies was noted. The C and O type vaccines, used in 5 and 10 ml doses and challenged only 21 days after the vaccination, protected animals against the generalization of the disease.