

TADEUSZ JASTRZĘBSKI, JANUSZ WAWRZKIEWICZ, STANISŁAW MAJDAN

**Badania nad produkcją surowicy przeciwko chorobie Aujeszky'ego**Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie  
Dyrektor: doc. dr habil. S. WOŁOSZYN

Kierownik tematu: prof. dr T. JASTRZĘBSKI

Choroba Aujeszky'ego (ch.Au) występuje na całym świecie. W Polsce jest ona stwierdzona i opisywana od 1958 r. (18). Choroba Au powoduje w dotkniętych nią gospodarstwach duże straty wśród prosiąt osesków, a niekiedy również warchlaków. Znaczne straty notowane są także od czasu do czasu w hodowlach nerek i lisów karmionych odpadkami rzeźnymi pochodzenia świńskiego (17, 18). Zwalczanie choroby metodą wybijania natrafia na dość znaczne trudności, gdyż wirus może się utrzymywać również w populacji innych zwierząt, a zwłaszcza szczurów (12). Zwalczanie immunologiczne polega na czynnym lub biernym uodparnianiu zwierząt narażonych na zakażenie. Uodparnianie czynne przy użyciu szczepionek zabitych daje odporność niezbyt silną i stosunkowo krótkotrwałą. W związku z tym ostatnio w krajach, gdzie choroba Au powoduje duże straty, stosowane są głównie szczepionki żywe. Żywe atenuowane szczepionki zapewniają dostateczną odporność trwającą ponad rok, jednakże na terenach gdzie choroba ta występuje raczej sporadycznie budzą pewne obawy ze względu na potencjalną możliwość: a) uzjadliwienia się zarazka przy samoistnych pasażach w stadzie, b) powstania endemicznych ognisk w terenie. Uodparnianie bierne powoduje stanu zagrożenie dla zwierząt w terenie, jednak ma dość ograniczone zastosowanie, służy przede wszystkim do zabezpieczenia prosiąt osesków w pierwszym specjalnie dla nich niebezpiecznym okresie życia. Surowica przeciwko ch.Au lub jej koncentraty są stosowane na szeroką skalę w ZSRR oraz w krajach bałkańskich. Wyniki w praktyce są na ogół zadowalające (2, 3, 4, 8, 11, 14, 16), aczkolwiek w niektórych przypadkach pozytywnych rezultatów nie osiągnięto. Z opublikowanych prac zdają się wynikać następujące warunki skuteczności seroprofilaktyki ch.Au: 1) surowica winna być możliwie wysokowartościowa (co można osiągnąć przez użycie antygenu o dużej koncentracji immunogenego wirusa, lub przez przerobienie surowicy natywnej na gamma globulinę), 2) lepsze wyniki (nawet przy nieco niższym mianie) daje surowica homologiczna, 3) surowica winna być zastosowana w odpowiednich dawkach i we właściwym czasie.

Celem badań własnych było opracowanie metody produkcji surowicy przeciwko ch.Au, homologicznej, możliwie wysokowartościowej i ze względów epizootologicznych bez użycia szczepów pełnozjadliwych dla świń.

**Materiał i metody**

Zwierzęta produkcyjne. Do badań użyto warchlaki rasy krajowej uszlachetnionej, typu bekonowego, o ciężarze ok. 60 kg. Zwierzęta uprzednio uodpornione były przeciwko pomorowi i różycy świń.

Szczepy wirusa ch.Au. Użyto następujące wirusy: A — do produkcji surowicy - atenuowany szczep Buk, uzyskany od dr Vinohradnyka z Rumunii. Jest to szczep laboratoryjny, adaptowany do hodowli komórek zarodka kurzego, używany w państwach bałkańskich do produkcji szczepionki żywej. B — do kontroli surowicy - szczep AT otrzymany z Bułgarii od dr Russeffa jako zjadliwy, adaptowany do HKZK, wywołujący objawy świądu i śmierć u królików.

Hodowla komórkowa. Hodowlę komórek zarodków kurzych (HKZK) przygotowywano z 9—10 dniowych zarodków wg standardowej metody.

Odczyn seroneutralizacji (SN). Badane surowice rozcieńczano płynem Parkera 199 i do każdego rozcieńczenia dodawano równą ilość zawiesiny wirusa Au szczepu AT o stężeniu ok. 100 TCID<sub>50</sub>/0,1 ml. Surowicę zmieszaną z wirusem pozostawiono w temperaturze pokojowej (ok. 20°C) na okres 1,5 godz. Każde rozcieńczenie surowicy badano na 4 próbkach HKZK w ilości 0,2 ml na 1 próbkę. Przy każdym badaniu sprawdzano ilość wirusa użytego w próbie SN. Wyniki odczytywano na 2, 3 i 5 dzień (pow. 80x).

Odczyn ochronny u królików. Badania prowadzono na królikach rasy mieszanej, wagi ok. 3,5 kg. Wirus AT inokulowano i.m. w tylną kończynę, surowice podawano natychmiast potem s.c. Okres obserwacji — 2 tyg.

**Wyniki**

Pierwszą serię doświadczeń surowicy (SD<sub>1</sub>) wyprodukowano przy użyciu 6 warchlaków. Wstępne próby wykazały, że szczep Buk podany zarówno doustnie jak i podskórnie jest dla nich nieszkodliwy. Badania surowicy pobranej w 3 tyg. od daty szczepienia wykazały obecność przeciwciał neutralizacyjnych. Przy podaniu wirusa s.c. przeciwciała powstały u obu szczepionych sztuk, a przy podaniu per os tylko u jednej (z dwóch użytych). Stwierdzono, że szczep posiada zdolność transmisji poziomej, gdyż przeciwciała pojawiły się również u jednego z dwóch warchlaków kontrolnych, przebywających ze zwierzętami szczepionymi. Przebieg uodparniania ilustruje tab. 1. Wprowadzanie uodpornionym zwierzętom po 2 ml j.m. a potem 80 ml s.c. lub i.v. wirusa świńnie również zniosły dobrze bez jakichkolwiek odczynów poszczepiennych. Wykonany po 18 dniach od ostatniego szczepienia upust krwi wykazał miano przeciwciał u świń szczepionych i.v. 630 TCPD<sub>50</sub> w stosunku do 1000 TCID<sub>50</sub>, natomiast u świńi szczepionej s.c. zaledwie 200 TCPD<sub>50</sub>. Jedna sztuka po dawce 2 ml wirusa urodziła zdrowe prosięta i została wyłączona z dalszych doświadczeń; w surowicy prosiąt zbadanych na 3 dzień po urodzeniu oraz w siarze pobranej pierwszego dnia po porodzie stwierdzono obecność przeciwciał neutralizacyjnych.

Zakonserwowana surowica serii D<sub>1</sub> przetrzymywana w chłodni (4°C) przez okres 2 lat wykazała spadek miana przeciwciał do poziomu 140 TCPD<sub>50</sub> w stosunku do 100 TCID<sub>50</sub> wirusa. Wyniki badania w tym czasie na królikach podaje tab. 2. Wykazały one, że surowica SD (przechowywana 2 lata w chł-

Tab.1 Produkcja surowicy przeciwko chorobie Au - seria SD<sub>1</sub>

Nr świni	Uodparnianie wirusem Buk z HKZK data szczepienia			Miano próbki z dnia			
	17 XII 65	15 I 66	19 II 66	22 IV 66	24 XII 65	15 I 66	10 V 66
P <sub>1</sub>	1 ml s.c.	1 ml p.o.	2 ml c.m.	80 ml l.v.	< 50/1000	390/1000	630/1000
P <sub>4</sub>	1 ml s.c.	1 ml p.o.	2 ml c.m.	80 ml l.v.	< 50/1000	120/1000	630/1000
P <sub>2</sub>	1 ml s.c.	1 ml s.c.	2 ml l.m.	—	< 50/1000	50/1000	n.b.
P <sub>5</sub>	1 ml s.c.	1 ml s.c.	2 ml l.m.	80 ml s.c.	< 50/1000	100/500	200/1000
KP <sub>3</sub>	—	—	—	—	< 50/1000	125/500	n.b.
KP <sub>10</sub>	—	—	—	—	< 50/1000	< 50/1000	n.b.

dni) nie chroni królików przed jednoczesnym lub opóźnionym o 24 godz. wprowadzeniem 10—1000 TCID<sub>50</sub> wirusa AT i.m., a jedynie zdaje się opóźniać o 1—2 dni datę śmierci. Surowicę SD zastosowano także i.m. u 2 prosiąt kilkudniowych o ciężarze ciała 4,2—4,7 kg w ilości 5 ml i 20 ml. Jednocześnie wstrzyknięto im i.m. po 0,1 ml wirusa AT 73/16 rozcieńczonego 1:10 tj. ok. 10<sup>6,5</sup> TCID<sub>50</sub> (ok. 1 000 000 DLM dla królika z zejściem śmiertelnym po 48 godz.). Obydwa badane prosięta pozostały zdrowe. Natomiast prosię kontrolne zareagowało przejściowym wzrostem wewnętrznej ciepłoty ciała. Na podstawie uzyskanych wyników następną serię doświadczalną surowicy wyprodukowano metodą skróconą. Przebieg uodparniania przedstawia tab. 3. Miano surowicy (zmieszanej z dwóch upustów i porabanej od wszystkich świń) badanej w 3 mies. po wyprodukowaniu surowicy, wynosiło 2 000 TCPD<sub>50</sub>. Użyta dla kontroli natywna surowica bułgarska wykazała miano 400 TCPD<sub>50</sub> (pod koniec terminu ważności), a gamma-globulina bułgarska 2 000 TCPD<sub>50</sub>.

Tab.2 Ocena wartości surowicy odpornościowej SD<sub>1</sub> na królikach (miano 140 TCPD<sub>50</sub> 100 TCID<sub>50</sub>)

Dawka wirusa	Dawka surowicy odpornościowej	Data zejścia śmiertelnego
1000 TCID <sub>50</sub>	0,3 ml/kg ż.w.	4 dz.
"	0,6 ml/kg ż.w.	4 dz.
"	1,2 ml/kg ż.w.	5 dz.
"	5 ml/kg ż.w.	5 dz.
"	—	4 dz.
100 TCID <sub>50</sub>	1,3 ml/kg ż.w.	5 dz.
"	2,5 ml/kg ż.w.	5 dz.
"	5,0 ml/kg ż.w.	5 dz.
"	—	4 dz.
10 TCID <sub>50</sub>	10 ml/kg ż.w.	9 dz.
"	—	7 dz.

Tab.3 Produkcja surowicy przeciwko chorobie Au - seria SD<sub>2</sub>

Nr świni	Uodparnianie wirusem Buk HKZK data szczepienia			Miano (TCPD <sub>50</sub> ) - data pobrania próbki				
	1 IV 69	30 IV 69	5 V 69	1 IV 69	30 IV 69	5 V 69	16 V 69	19 V 69
P <sub>21</sub>	5 ml s.c.	—	100 ml l.v.	< 2	—	10	3200 próbki mieszane z 1 upustem	1100
P <sub>29</sub>	5 ml s.c.	—	100 ml l.v.	< 2	—	30		2000
P <sub>30</sub>	5 ml s.c.	150 ml l.v.	—	< 2	50	—		1600
P <sub>33</sub>	5 ml s.c.	—	100 ml l.v.	< 2	—	13		1600

Omówienie i dyskusja

Dane z piśmiennictwa odnośnie celowości stosowania surowicy przeciwko ch.Au aczkolwiek przeważnie pozytywne wykazują pewną rozbieżność. Obok pozytywnych ocen działania surowicy odpornościowej, a nawet surowicy ozdrowieńców, pojawiły się również doniesienia o wynikach mniej korzystnych (1, 4, 7, 9, 15, 16). Pomimo to w wielu krajach m.in. w ZSRR, Bułgarii i Rumunii rozpoczę-

to produkcję surowicy w dużych ilościach, poszukując jednocześnie metod zwiększających skuteczność seroprofilaktyki.

W wyniku przeprowadzonych badań udało się stwierdzić, że skuteczność seroprofilaktyki u prosiąt osesków zależy od szeregu czynników, m.in. 1) od aktywności surowicy, 2) czasu jej podania i 3) przynależności gatunkowej zwierzęcia — producenta.

Aktywność surowicy. Dane piśmiennictwa co do miana produkowanej surowicy są trudne do porównania ze względu na różne metody jej oceny. Badacze radzieccy zastosowali w tym celu myszy, świnki morskie i króliki. Wg Kazanskiego i wsp. (2) swoista gamma globulina winna chronić co najmniej 50—60% myszek i 50—70% świnek morskich od zakażenia powodującego śmierć ok. 90% zwierząt kontrolnych. Pomyślne wyniki osiągnano również przy użyciu królików, jednak jedynie przy podaniu zwierzętom i.v. wirusa uprzednio poddanego działaniu badanej surowicy. Doświadczenia własne potwierdziły niemożność wykazania wartości ochronnej na królikach przy podaniu surowicy (s.c.) i wirusa (i.m.) oddzielnie. Ostatnio podstawowa metoda stało się mianowanie surowicy na hodowli komórek przy użyciu SN. Z przeprowadzonych badań zdaje się wynikać, że aktywność poszczególnych preparatów surowicy przeciwko ch. Au wykazuje dużą rozpiętość. Wg oceny Nozycznej i wsp. (13) surowica handlowa przeciwko ch.Au produkcji chersońskiej fabryki surowic miała miano 64—128 i./100 TCID<sub>50</sub> wirusa, a miano 10% gamma-globuliny wynosiło 512 i./100 TCID<sub>50</sub>. Badania nasze wykazały, że miano surowicy bułgarskiej (pod koniec terminu ważności) wynosiło 400 TCPD<sub>50</sub>, a gamma-globuliny bułgarskiej 2 000 TCPD<sub>50</sub>/100 TCID<sub>50</sub>. Wysokość miana surowicy lub gamma-globulin uzależniona jest w znacznej mierze od metody produkcji. Przeprowadzone badania własne wykazały, że użycie do hiperimmunizacji wirusa Au szczepu Buk, namnożonego na HKZK *in vitro*, zawierającego dużą koncentrację zarazka przy małej ilości ciała balastowych — oraz podawanie go i.v., umożliwiła uzyskanie surowicy o bardzo wysokim mianie. Na znaczenie praktyczne stopnia aktywności surowicy wskazuje cały szereg danych z piśmiennictwa. Kojnok i Greczi (3) donoszą, że zastosowanie surowicy wysokowartościowej u prosiąt ssących w chlewni zapowietrzanej obniżyło straty do 6,7% (padło 63 na 943), podczas gdy w grupie kontrolnej wyniosły one 30,4% (padło 229 na 752). Podobne wyniki otrzymywali i inni autorzy podając swoisty koncentrat globulinowy lub swoistą gamma-globulinę (2, 9). Dane Korniejewej (4) wskazują, że przeżywalność prosiąt po zastosowaniu gamma-globulin wyniosła 91,5%, a po surowicy niskowartościowej

zaledwie 1,3%. Masic (11) po zaaplikowaniu surowicy o stosunkowo niskim mianie (64—128 j.) utrzymał przy życiu prosięta u poszczególnych stadach w 52%, 71% i 94%, podczas gdy poprzednio śmiertelność w opisanym terenie sięgała do 100%. Popescu (14) podając profilaktycznie surowicę niskowartościową 160 prosiętom w stadzie zapowietrzonym miał upadki wynoszące 51,2%. Surowica wysokowartościowa zredukowała upadki do 8,3% (na 133 szczepione), a gamma-globulina do 9,3% (na 352 poddane seroprofilaktyce). W innej pracy ten sam autor (16) interweniując w 10 gospodarstwach zapowietrzonych głównie u prosiąt osesków za pomocą swoistego koncentratu globulinowego uzyskał ochronę w 88% (padło 381 na 3178), a używając surowicy handlowej (niskowartościowej) tylko w 39% (padło 478 na 787).

Czas podania surowicy. Surowica przeciwko ch.Au podobnie jak inne surowice przeciw-wirusowe winna być podana przed wniknięciem wirusa do organizmu. Prosięta oseski w stadach zapowietrzonych zakażają się słów-nie po ok. 15 dniach po urodzeniu gdy następuje u nich pewien spadek poziomu przeciwciał. Wg Krzeszowskiego (6) sprzyja zakażeniu również okres wykluwania się zębów. Natomiast prosięta pochodzące od matek, które nie przechorowały ch.Au mogą ulec zakażeniu już w pierwszych dniach życia wraz z siałą i mlekiem matki. W związku z tym najlepsze wyniki rokuje podanie surowicy przed pierwszym ssaniem. Genew (cyt. za 5) podając wysokowartościową surowicę lub gamma globulinę prosiętom oseskom przed pierwszym ssaniem osiągnął obniżenie śmiertelności w stadzie z 12,4% (grupa kontrolna) do 0,22%.

Przynależność gatunkowa zwierzęcia producenta surowicy. Niektóre prace zdają się wskazywać, że wyniki seroprofilaktyki zależą również od gatunkowej przynależności surowicy odpornościowej. Surowice końskie nawet posiadające nieco wyższe miana niż surowice świńskie, mają działać profilaktycznie u prosiąt słabiej. Horoviuc i Bugeac (1) stosując surowicę końską nie osiągnęli wyników pozytywnych.

Wyniki stosowania u prosiąt surowicy lub gamma-globuliny dla celów leczniczych są dość rozbieżne. Obok autorów, którzy otrzymywali efekty pozytywne (8, 9) są i inni, którzy nie potwierdzili tych obserwacji (7, 15). Dane na temat rezultatów leczenia ch. Au u innych gatunków zwierząt poza trzodą chlewną są nieliczne. Na uwagę zasługuje więc doniesienie Łukaszewa i Nikitina (10), którzy wyleczyli 12 krów na 14 chorych po jednorazowym, a 12 na 12 chorych (100%) po dwukrotnym zaaplikowaniu swoistej gamma-globuliny. Podobne przypadki opisywano przy

leczeniu lisów srebrzystych. Łukaszew i wsp. (9) po wybuchu ch.Au na fermie podali swoistą gamma-globulinę 26 sztukom profilaktycznie. Z całego stada padł tylko 1 lis i to na drugi dzień po podaniu preparatu. Z pozostałych — 6 sztuk zachorowało wśród typowych objawów choroby, jednak po powtór-nym podaniu preparatu wyzdrowiały.

Pozytywne wyniki seroprofilaktyki i sero-terapii ch.Au przy zastosowaniu wysokoaktywnych surowic i globulin, osiągnięte przez różnych autorów wskazują na celowość badań w tym kierunku z wykorzystaniem opracowanej przez nas metodyki produkcji wysoko-wartościowej surowicy przeciwko ch.Au.

#### Piśmiennictwo

1. Horoviuc S., Bugeac T.: *Revta zooteh. Med. vet. Bukareszt* 15, 2, 52, 1965.
2. Kazanski I., Karniejewa W. E., Dieriabina Z. G.: *Veterinarija, Moskwa* 7, 35, 1960.
3. Kojnok J., Greczi E.: *Acta vet. hung.* 7, 423, 1957.
4. Korniejewa W. E.: *Trudy VIEV* 22, 1962.
5. Krettschmar C.: *Die Aujeszky'sche Krankheit*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1970.
6. Krzeszowski J.: *Medycyna Wet.* 24, 392, 1968.
7. Lubaszenko S. J., Tiulpanowa A. F.: *Veterinarija, Moskwa* 8, 37, 1958.
8. Łukaszew I. I., Nikitina W. S.: *Veterinarija, Moskwa* 9, 48, 1958.
9. Łukaszew I. I., Nikitina W. S., Nikitin M. G.: *Veterinarija, Moskwa* 9, 24, 1959.
10. Łukaszew I. I., Nikitin M. G.: *Veterinarija, Moskwa* 6, 29, 1962.
11. Masic M.: *Acta vet., Belgrad* 9, 4, 41, 1959.
12. Nikitin M. G.: *Zool. Z., Moskwa* 39, 282, 1960.
13. Noczewnuj W. T., Osidze D. F., Murawiew W. K.: *Mattier. I niezwez. wiet. wirus. konfier.* 26—28 najobar. Moskwa, cz. II, 87—88, 1970.
14. Popescu A.: *Lucr. Inst. Cert. Vet. Bioprep. Pasteur* 1, 279, 1962.
15. Popescu A.: *Lucr. stint. Inst. Ser. Vaccin. Pasteur* 7, 45, 1963.
16. Popescu A.: *Revta Zooteh. Med. vet. Bukareszt* 10, 42, 1963.
17. Steffen J., Szaflarski J.: *Medycyna Wet.* 18, 201, 1962.
18. Ugorski L.: *Medycyna Wet.* 14, 10, 1958.

Adres autora: prof. dr Tadeusz Jastrzębski, Lublin, ul. J. Dąbrowskiego 6/1.

Ястшембски Т., Вавжкевич Я., Майдан С. — Исследования по продукции сыворотки против болезни Ауешки.

Установили, что высокоактивную сыворотку против болезни Ауешки можно получить, применяя в качестве антигена культуру атenuированного штамма „Buk”, что заслуживает внимания с эпизоотологической точки зрения. Вирус, выращиваемый на культуре клеток куриных эмбрионов, проявлял титр  $10^{6,5}$  TCID<sub>50</sub>/мл. Приготовление высокоактивной сыворотки требовало интравенозной инъекции вируса. Титр изготовленной нативной сыворотки равнялся ок. 2000 TCPD<sub>50</sub> (при тест дозе вируса ок. 100 TCID<sub>50</sub>). На основании полученных результатов и данных из литературы авторы считают целесообразной дальнейшую разработку темы.

Jastrzębski T., Wawrzkievicz J., Majdan S. — Investigations on the production of serum against Aujeszky's disease.

It was found that a serum of high potency against Aujeszky's disease could be obtained by the use of attenuated strain Buk, that is important from the epizootiological point of view. The virus grown on chick embryo fibroblasts showed the titre of  $10^{6,5}$  TCID<sub>50</sub>/ml. It was noted that only after intravenous injection of the virus it was possible to obtain the serum of high potency. The produced serum displayed the SN titre of 2000 TCPD<sub>50</sub> against about 100 TCID<sub>50</sub>. There was discussed, on the basis of data from literature, the results of application of antisera and specific gamma globulins against Aujeszky's disease and purposefulness of further investigations in this field.