

MEDYCYNĄ WETERYNARYJNĄ

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

CZASOPISMO POŚWIĘCONE NAUCE I PRAKTYCE WETERYNARYJNEJ
ZAŁOŻONE W 1945 R. PRZEZ WYDZIAŁ WETERYNARYJNY W LUBLINIE

REDAKCJA

Redaktor naczelny: prof. dr Edmund PROST

Członkowie Komitetu Redakcyjnego: prof. dr Ryszard BADURA, prof. dr Jerzy MAZURCZAK,
prof. dr Abdon STRYSZAK, doc. dr Stanisław WOŁOSZYN — sekretarz naukowy.

RADA PROGRAMOWA

Dr Anatol BACHAREWICZ, prof. dr Władysław BIELAŃSKI, prof. dr Zygmunt EWY, prof. dr Roman HOPPE, prof. dr Tadeusz JASTRZĘBSKI, prof. dr Lech JĄSKOWSKI, dyr. dr Zbigniew JARZĘBSKI, prof. dr Adam KĄDZIOLKA, płk dr Stefan KOSSAKOWSKI, prof. dr Stanisław KRAUSS, prof. dr Józef KULCZYCKI, prof. dr. Zdzisław LARSKI, dr Władysław LUTYŃSKI, dyr. dr Henryk OBERFELD, prof. dr Wincenty PEZACKI, prof. dr Wiktor STEFANIAK, prof. dr Marian TRUSZCZYŃSKI, prof. dr Aleksander ZAKRZEWSKI, prof. dr Eugeniusz ŻARNOWSKI.

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

JANUSZ WAWRZKIEWICZ, TADEUSZ JASTRZĘBSKI, STANISŁAW MAJDAN

Próby otrzymania szczepionki inaktywowanej przeciwko chorobie Aujeszkiego

Institut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie
Dyrektor: doc. dr S. WOŁOSZYN

W związku z przedstawieniem hodowli trzody chlewnej z drobnotowarowej na przemysłową, należy się liczyć z występowaniem szeregu nowych chorób zakaźnych, które w małych gospodarstwach indywidualnych nie powodowały dotąd większych strat. Spośród chorób wirusowych musimy brać pod uwagę m.in. chorobę Aujeszkiego — schorzenie coraz częściej notowane na terenie naszego kraju, powodujące duże straty ekonomiczne nie tylko u zwierząt futerkowych ale także i u trzody chlewnej. W Bułgarii, Rumunii i Czechosłowacji, gdzie choroba ta występuje powszechnie, zapobieganie jej polega przede wszystkim na masowym szczepieniu zwierząt przy użyciu szczepionki żywej; niebezpieczeństwo bowiem wprowadzenia żywego zarazka do środowiska nie jest brane tam pod uwagę. W Polsce choroba Aujeszkiego występuje tylko na ograniczonych terenach, wobec czego wprowadzenie szczepień żywym wirusem winno być traktowane bardzo ostrożnie. Mając to na uwadze, autorzy przeprowadzili próby przygotowania szczepionki zabitej. Szczepionka zabita, aczkolwiek z reguły droższa w produkcji i mniej wygodna w stosowaniu (wymaga częstszego podawania i słabsza pod względem immunogenności)

ma tę poważną zaletę, że nie stanowi potencjalnego niebezpieczeństwa z punktu widzenia epizootologicznego.

Materiał i metody

Szczep. Do przygotowania szczepionki użyto adaptowany do hodowli komórek zarodków kurzych szczep AT 73 („Toneva”), otrzymany z Bułgarii od dr Russeffa. Szczep ten po 7 dalszych pasażach przez hodowlę komórek 9–11 dniowych zarodków kurzych, oznaczony symbolem AT 73/7 użyto jako materiał wyjściowy.

Hodowla komórkowa (HK). Podłożem do namnażania wirusa była 24–48 godz. hodowla pierwotnych komórek 9-dniowych zarodków kurzych. Jako płyn wzrostowy (PW) użyto płyn Hanksa z dodatkiem 0,5% hydrolizatu laktalbuminy, 2% surowicy cielęcej oraz antybiotyków (100 j penicyliny i 0,1 mg streptomycyny na 1 ml). Podłożem utrzymującym był: a) płyn Parkera 199 bez surowicy, b) płyn Parkera z dodatkiem 3% surowicy cielęcej, lub c) płyn RTN (roztwór Hanksa z laktalbuminą i 2% surowicy cielęcej).

Odczyn seroneutralizacji. Badane surowice po inaktywacji przez 30 min. w 56°C rozcieńczano od 1:5 w postępie geometrycznym płynem Parkera. Do każdego rozcieńczenia dodawano w równej ilości wirus AT 73/7 w dawce 50 TCID₅₀/0,1 ml. Po zmieszaniu wstawiano do łaźni wodnej do temp. 37°C na 1 godz., a potem do chłodni (4°C) na noc. Każde rozcieńczenie surowicy z dodanym wirusem wysiewano na 4 próbówki z HK w ilości 0,2 ml na 1 próbówkę z hodow-

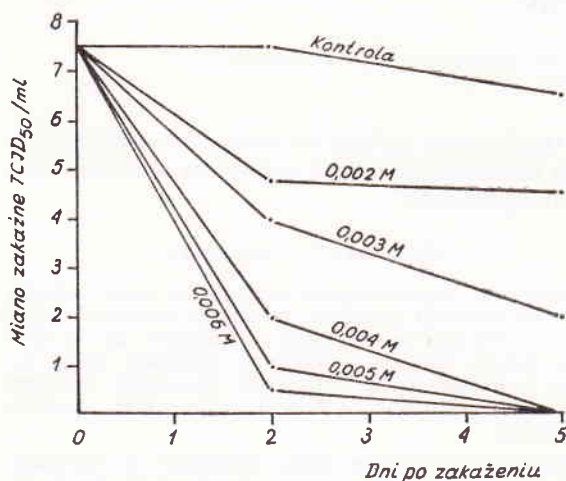
lą komórek. Wynik odczytywano na 2, 3 i 5 dzień po inokulacji notując zmiany cytopatyczne. Kontrolę stanowiły próbki z HK, hodowle komórek z mianowanym wirusem oraz hodowle zakażone 50, 5 i 0,5 TCID₅₀ wirusa przetrzymywanymi w tych samych warunkach jak wirus z surowicami badanymi metodą SN.

Wyniki

Wstępne badania przy użyciu szczepu AT 73/7 wykazały, że obie użyte hodowle fibroblastów kurzych, tj. zarówno 24 jak i 48 godzinna niezależnie od użytego podłoża, nadają się w jednakowym stopniu do namnażania wirusa. W przypadku hodowli 24 godz. uzyskano wirus o mianie 6²⁴ (log₁₀) na podłożu z płynem Parkera, 6,5 na hodowli z płynem Parkera plus 3% surowicy cielęcej i 7 na podłożu RTN. Hodowla 48 godz. fibroblastów kurzych pozwoliła na uzyskanie odpowiednio miana wirusa w wysokości 6³³ (log₀₁), 6⁶⁶ i 6⁶⁶. Biorąc pod uwagę koncentrację wirusa oraz koszt płynu utrzymującego, dalsze badania prowadzono przy użyciu płynu RTN.

W celu doboru odpowiedniej ilości formaldehydu oraz czasu inaktywacji wirusa, przebadano wpływ różnych ilości formaldehydu na proces inaktywacji wirusa w temp. 37°C. Wyniki ilustruje ryc. 1.

Wpływ różnych stężeń formaldehydu na żywotność szczepu AT w temp. 37°C

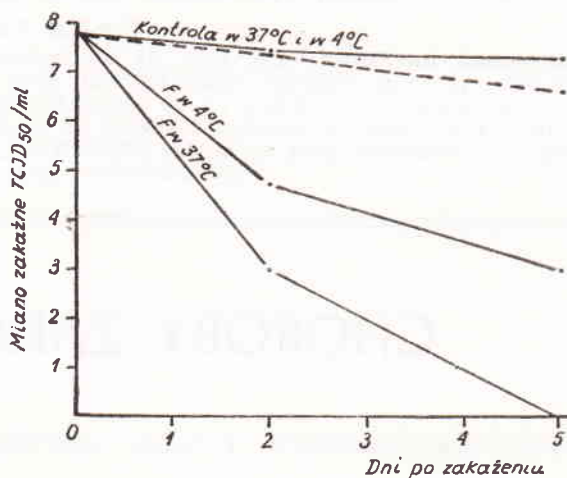


Badania wykazały, że wyższe stężenia formaldehydu, tj. 0,006 M, 0,005 M i 0,004 M inaktywują wirus stosunkowo bardzo szybko, gdyż powodują spadek miana wirusa po 48 godz. o ponad 5 log, podczas gdy miano wirusa bez formaldehydu utrzymywało się w tych warunkach na pierwotnym poziomie. Po 48 godz. proces inaktywacji ulegał zwolnieniu i zakaźność resztkowa zanikała całkowicie dopiero w ciągu następnych 3 dni. Niższe stężenie formaliny tj. 0,003 M inaktywowało wirus, ale całkowite zniszczenie zarazka nie było osiągnięte nawet po 5 dniach. Dalsze obniże-

nie koncentracji formaldehydu doprowadzało tylko do częściowej inaktywacji zaznaczającej się w pierwszych godzinach po dodaniu preparatu.

Proces inaktywacji wirusa przez glicerolowy roztwór fioletu krystalicznego (produkcji Dupont) ilustruje ryc. 2.

Wpływ fioletu krystalicznego w glicerolu na żywotność szczepu AT w temp. 37°C i 4°C



Do doświadczeń użyto roztworu o następującym składzie: 1 ml 10% roztw. fioletu krystalicznego rozpuszczonego w 96% etanolu plus 99 ml jałowego glicerolu cz.d.a. Tak przygotowany roztwór fioletu krystalicznego dodawano w ilości 20% do zawiesiny wirusa AT 73/7. Stwierdzono, że pod wpływem działania preparatu w temp. 37°C ponad 99,99% wirusa uległa inaktywacji po 48 godz., a całkowite usunięcie zakaźności nastąpiło w ciągu następnych 3 dni. W temp. 4°C proces powyższy ulegał wyraźnemu zwolnieniu, gdyż po 48 godz. miano zakaźne zmniejszało się o 3 log, a po 5 dniach o niecałe 5 log, przy czym dość znaczna ilość wirusa przetrwała nadal w formie zakaźnej.

Powyższe wstępne badania pozwoliły na przygotowanie dwóch szczepionek tj. a) szczepionki inaktywowanej formolem (F), b) szczepionki inaktywowanej fioletem krystalicznym (C). Obie przygotowano z wirusa AT 73/8 namnożonego na podłożu składającym się z hodowli stacjonarnej fibroblastów kurzych w płynie RTN. Miano wyjściowe użytego wirusa wynosiło 10⁷ TCID₅₀/ml. Inaktywację wirusa przeprowadzono w temp. 37°C przez 6 dni stosując przy szczepionce formolowej (F) 0,004 M formolu cz.d.a. Po 4 dniach inaktywacji dodano do szczepionki 20% wodorotlenku glinu. W przypadku natomiast szczepionki z fioletem krystalicznym (szczepionka C), wodorotlenek glinu dodano bezpośrednio do zawiesiny i dopiero wówczas dodano fiolet krystaliczny rozpuszczony w glicerolu i przetrzymywano w 37°C przez następnych 6 dni.

Wartość uodparniającą szczepionek określono metodą pośrednią na królikach (o ciężarze ciała ok. 3,5 kg) przez zbadanie poziomu przeciwciał w surowicy zwierząt szczepionych. Poziom przeciwciał neutralizujących po każdym wprowadzeniu antygeny przedstawia tab. 1.

Tab. 1. Miano surowicy obliczone wg TCID₅₀

Nr królika	Przed szczepieniem	Po I szczepieniu	Po II szczepieniu	Po III szczepieniu
1 (F)	< 1:2	1:4	1:22	1:45
2 (F)	< 1:2	< 1:4	1:22	1:80
3 (F)	< 1:2	0	0	0
4 (C)	< 1:2	< 1:4	1:6	1:64
5 (C)	< 1:2	< 1:4	1:4	1:45
6 (C)	< 1:2	1:4	1:22	1:128

Objaśnienia: F = podano szczepionkę formolową; C = podano szczepionkę z fioletem krystalicznym; 0 = nie badano

Badania przeprowadzone po I szczepieniu, tj w 12 dni po podaniu antygeny wykazały, że wszystkie uodpornione zwierzęta nie dały wyraźnej odpowiedzi immunologicznej. Dopiero w 12 dni po II iniekcji stwierdzono u wszystkich badanych królików obecność przeciwciał w mianie od 1:4 do 1:22 TCID₅₀. W wyniku wprowadzenia szczepionki po raz trzeci w 4 tygodnie po II iniekcji (reakcja anamnesticzna), poziom przeciwciał po 14 dniach podniósł się wyraźnie u wszystkich badanych zwierząt, niezależnie od rodzaju podanej szczepionki.

Próba challenge przy użyciu 3 i 30 TCID₅₀ wirusa AT wykazała, że uodpornione króliki przeżyły zakażenie bezobjawowo. Natomiast dwa króliki kontrolne zaszczepione 3 i 30 TCID₅₀ tego samego wirusa, padły na 4 i 5 dzień.

Po tych zachęcających wynikach prowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych, wykonano wstępne badania na 6 warchlakach w wieku 3—4 miesięcy, podając trzem z nich szczepionkę „F”, a pozostałym 3 sztukom szczepionkę „C” s.c. w ilości 10 ml dwukrotnie w odstępie 2 tygodniowym. Przeprowadzony następnie odczyn SN z pobranymi próbkami surowicy od ww zwierząt, nie wykazał obecności przeciwciał przy rozcieńczeniu surowicy 1:5.

O mówienie i wnioski

Pierwsze szczepionki przygotowywane z narządów wewnętrznych zwierząt wrażliwych, zabitych w okresie szczytowym choroby, zawierały

znaczące ilości białek narządowych. Białka te osłaniały wirus na skutek czego konieczne było stosowanie zwiększonych dawek substancji inaktywujących zarazek. Postępowanie takie zmniejszało jednak wartość immunogenną szczepionki.

Szczepionkę przygotowaną z narządów zakażonego królika stosowano m.in. w ZSRR (6, 11, 12, 14), w Bułgarii (13) i Czechosłowacji (7). W poszukiwaniu szczepionek bardziej aktywnych, wprowadzono w krajach o dużej ekstenywności schorzenia szczepionki żywe. Szczepionki te dawały oczywiście dobrą odporność, ale niekiedy powodowały pojawienie się nowych ognisk choroby jako rezultat zachorowań poszczepiennych. Użyte bowiem do produkcji szczepionek atenuowane szczepy wirusowe były nieszkodliwe dla zwierząt dorosłych i zdrowych, niemniej jednak okazywały się czasami zbyt zjadliwe dla zwierząt młodocianych, tj. prosiąt, cieląt i jagniąt (2, 5). W związku z tym zaczęto się znów interesować możliwościami stosowania szczepionek inaktywowanych, ale w oparciu już hodowli wirusa na podłożu komórkowym. Hodowle takie umożliwiają bowiem uzyskanie wirusa w postaci czystej, tj. pozbawionej w znacznym stopniu ciał balastowych, występujących w szczepionkach narządowych.

Badania własne stanowią próbną ocenę dwóch szczepionek inaktywowanych. Jako inaktywatory zostały użyte: a) formaldehyd, który wg Lubaszenki i Tiulpanowej (9), Czoboniana (3), a przede wszystkim Zuffy (15) jest dobrym inaktywatorem wirusa pseudowścieklizny, oraz b) fiolet krystaliczny stosowany z powodzeniem przy produkcji szczepionki przeciwko pomorowi świń przez Dorseta (4), Mc Bryde i Cole'ya (10), Kulesko (8) i wielu innych. Uzyskane wyniki dowodzą, że obie przygotowane szczepionki posiadały dobre właściwości immunogenne przy uodparnianiu królików. Wyniki te są zgodne z rezultatami Beladi i Ivanovica (1) oraz Zuffy (15), którzy osiągnęli zadawalające efekty u myszek, świnek morskich i królików po zastosowaniu szczepionki formolowej, oraz z wynikami Lubaszenki i Tiulpanowej (9) uzyskanymi przy uodparnianiu zwierząt futerkowych szczepionką formolową z glicerolem. Badania wstępne na warchlakach przy użytej metodzie szczepień dały wynik niepomyślny; we krwi bowiem prosiąt, pomimo dwukrotnego szczepienia, nie stwierdzono obecności przeciwciał w ilości koniecznej do nadania odporności na czas dłuższy (miano poniżej 1:5). Podobnie ujemnie wypadły próby uodpornienia prosiąt przez Zuffę (15). Jednak biorąc pod uwagę wyniki badań Haralambiewa i wsp. (5), którzy stosując szczepionkę etanolową osiągnęli dobre rezultaty u owiec i bydła, a zachęcające u świń w wieku powyżej 10 miesięcy (u młodszych zwierząt odczynem SN nie wykazano mian pozytywnych) należy sądzić, że uodpornienie prosiąt i warchlaków przy użyciu szcze-

pionek inaktywowanych jest specjalnie trudne. Niemniej jednak zagadnienie to wymaga dalszych badań, gdyż nie wykluczone, że przy wyższej koncentracji wirusa w szczepionce, wyniki mogą się okazać pozytywne także i u prosiąt.

Piśmiennictwo

1. Beladi J., Ivanovic S.: Acta microbiol. Acad. Sci. Hung. 2, 151, 1954.
2. Christov S., Pavlov N., Karadjov Iv., Belcher D., Deltchev Iv.: Bull. Office internat. Epizooties 65, 7/8, 1247, 1966.
3. Czobanian M. S.: Wietierinarija 7, 19, 1965.
4. Dorset — cyt. wg Hutyrta F., Marek J., Manninger R., Mocsy J.: Szczegółowa patologia i terapia chorób zakaźnych, PWRiL, 1962.
5. Haralambiev H., Mermerski K., Simeonov S., Jotov M., Stoev I., Dimltrov K., Nikolov I.: Arch. exp. Veterinärmed., 21, 501, 1967.
6. Jakowlew T. G.: Wietierinarija 8, 83, 1955.
7. Jurak E.: Veterinarstvi 10, 458, 1960.
8. Kulesko — cyt. jak w poz. 4.
9. Lubaszenko S. J., Tjulpanowa A. F.: Wietierinarija 3, 54, 1962.
10. Mc Bryde, Cole C. G.: Jour. Amer. Vet. Med. Ass., 19, 652, 1936.
11. Poliwanow A. A., Somlinskij Z. F., Kirillin W. M.: Wietierinarija 36, 29, 1959.
12. Sotomkin P. S.: Wietierinarija 10, 10, 115, 1952.
13. Toneva W.: Bolest'a na Aueski, Sofia 1958.
14. Zotow L. M.: Wietierinarija 32, 84, 1955.
15. Zuffa A.: Arch. exp. Veterinärmed., 17, 595, 1963.

Adres autora: doc. dr habil. Janusz Wawrzekiewicz, Lublin, ul. B. Chrobrego 1 m. 19.

Вавжкевич Я., Ястшемски Т., Майдан С. — Попытки приготовления инактивированной вакцины против болезни Ауески.

Исследовали активность 2 вакцин против болезни Ауески. Вирус размноженный в культуре фибробластов зародка кур инактивировали: а) формолегидом и концентрации 0,004 М и б) 0,1% алькогольно-глицериновым раствором кристал-фиолета (придаваемым в количестве 20%). Положительные результаты получили только при иммунизации кроликов: титр антител по методу нейтрализации в культуре фибробластов зародка кур после 3 х введения вакцины равнялся 1:45 — 1:128; животные не заболели также после контрольного заражения 3 и 30 TCID₅₀ вирулентного вируса. Попытки иммунизации поросят возрастом в ок. 3 месяца оказались безуспешны: после 2 х введения вакцины антител в сыворотке в разведении 1:5 не установили.

Wawrzekiewicz J., Jastrzębski T., Majdan S. — Attempts to receive inactivated vaccine against Aujeszky's disease.

There were carried out some investigations on the immunological values of two sorts of vaccines against Aujeszky's disease. A pseudorabies virus was inactivated by means of a formalin at the concentration of 0.004 M and b) crystal-violet in the amount of 20% in a 0.1% glycerine-ethanol solution. Positive results were obtained only in the course of rabbit's immunization (antibody titres examined in SN test ranged from 1:45 to 1:128 following three times vaccination). Challenge with 3 and 30 TCID₅₀ of a virulent virus was also positive, e.g. animals appeared resistant. Attempts of immunization of young pigs at the age of about 3 month failed. After double vaccination of these animals there were not noted SN antibodies in sera diluted from 1:5. The findings have been discussed.

ANTONI DZIĄBA, JERZY KITA, ABDON STRYSZAK

Ocena skuteczności Neovitanu-Polfa w leczeniu kolibakteriozy zwierząt*

Institut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynarii SGGW w Warszawie
Dyrektor: prof. dr A. STRYSZAK

Neovitan zawiera neomycynę, witaminę A oraz kaolin i pektynę. Neomycyna działa na drobnoustroje znajdujące się w przewodzie pokarmowym: *Escherichia coli*, *Staphylococcus albus*, *Streptococcus faecalis*, niektóre gatunki *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* i *Aerobacter aerogenes*. Zaletą neomycyny jest jej stosunkowo długie utrzymywanie się w przewodzie pokarmowym zwierząt oraz to, że tylko rzadko powoduje powstawanie szczepów opornych na ten antybiotyk. Kaolin i pektyna powleka i chroni błonę śluzową jelita, a witamina A ułatwia jej sprawne funkcjonowanie.

Materiał i metody

Badania obejmowały oznaczenie stężenia bakteriostatycznego neomycyny zawartej w Neovitanie w kale i surowicy krwi po doustnym wprowadzeniu preparatu oraz kliniczną ocenę terapeutycznego działa-

nia leku w schorzeniach przewodu pokarmowego zwierząt.

Oznaczenie stężenia bakteriostatycznego antybiotyku w kale i surowicy krwi przeprowadzono u świń rasy wielkiej białej angielskiej, pięci mieszanego o ciężarze ciała od 20—55 kg, świnie dzielono na grupy po 4 względnie 3 (grupa III) zwierzęta w każdej. Neovitan podano jednorazowo w dawce 20 mg/kg c.c. pierwszej grupie świń bezpośrednio sondą dożołądkowo, drugiej jako domieszkę do suchej paszy, trzeciej jako dodatek do wody do picia, świniom czwartej grupy podano przez 48 godzin Neovitan w wodzie do picia w postaci 0,05% roztworu.

Krew potrzebną do oznaczenia stężenia bakteriostatycznego neomycyny w surowicy pobierano w godzinach rannych przed karmieniem z żyły czczej przedniej w ilości około 10 ml. Oznaczenie stężenia antybiotyku przeprowadzono metodą mikrobiologicznych seryjnych rozcieńczeń przy użyciu szczepu stan-

*) Preparat w opracowaniu, nie znajduje się w obrocie aptecznym.