

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

Zastosowanie metody Frenkla w produkcji szczepionki przeciwpryszczycowej

Zakład Badania Pryszczycy Instytutu Weterynarii w Zduńskiej Woli

Kierownik: prof. dr T. KOBUSIEWICZ

Rosnąca produkcja szczepionki przeciwpryszczycowej stwarza konieczność namnażania znacznych ilości wirusa pryszczycy.

Pierwsza, stosowana na szerszą skalę szczepionka, przygotowana przez Waldmanna i wsp. (15, 16) zawierała wirus namnożony na językach żywego bydła. Ta metoda namnażania zarazka pryszczycy stosowana przez dłuższy okres czasu była jednak wyjątkowo uciążliwa. Wymagała bardzo dużych, ściśle izolowanych pomieszczeń dla bydła, stwarzała dla otoczenia poważne zagrożenie epizootyczne, a przy tym nie zaspakajała ilościowo, rosnących potrzeb przemysłowej produkcji szczepionki.

Istotnym postępowaniem w tej dziedzinie było opracowanie przez Frenkla (5, 6, 7, 8, 9) metody namnażania wirusa pryszczycy *in vitro* na nabłonku zbieranym z języków bydłecych. W ciągu krótkiego okresu czasu metodę tę adaptowano w licznych zakładach i stała się ona jedną z głównych metod pozyskiwania zarazka pryszczycy w skali przemysłowej (1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, 13, 14).

Walory metody Frenkla zdecydowały, że postanowiono wprowadzić ją w Zakładzie Badania Pryszczycy Instytutu Weterynarii do produkcji szczepionki przeciwpryszczycowej. Uproszczone jedynie skład skomplikowanego płynu odżywczego stosowanego w tej metodzie, wykorzystując wyniki doświadczeń wchodzących w zakres odrębnej pracy.

Material i metody

Nabłonek z języków bydłecych. Języki odcinane bezpośrednio po uboju zwierząt myto starannie szczotkami w ciepłej bieżącej wodzie i napinano na wykonane ze stali nierdzewnej kołowe uchwyty. Następnie języki odkażano 70% alkoholem etylowym i naświetlano lampami UV przez około 5 minut. Nabłonek ścinano tarczowym nożem obrotowym i umieszczano natychmiast w ochłodzonym do 4° płynie odżywczym.

Namnażanie wirusa pryszczycy. Materiał niezbędny do przygotowania próbnych serii szczepionki przeciwpryszczycowej uzyskiwano z namnożeń przeprowadzanych w specjalnie do tego celu wykonanej aparaturze. W skład tej aparatury wchodził zbiornik szklany pojemności 80 l, system ogrzewania z regulacją temperatury oraz układ doprowadzający tlen. Zbiornik wyposażono w mieszadło kotwicowe z napędem elektrycznym, wykonujące 40 obr./min. Automatyczna regulacja umożliwiała utrzymanie temperatury na poziomie 36–37°C z dokładnością do $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Tlen doprowadzano przewodem gumowym do dna zbiornika poprzez płytkę ze szkła porowatego. Gaz po przejściu przez pory płytki do-

stawał się do cieczy w postaci rozdrobnionych pęcherzyków. Uzyskana tą drogą duża powierzchnia zetknięcia fazy gazowej i ciekłej ułatwiała należyte natlenienie hodowli. Ilość przepływającego tlenu kontrolowaną rotametrami regulowano tak, aby utrzymać pH hodowli w granicach 7,2–7,5. Dla ułatwienia mieszania nabłonek rozdrabniano na cząstki o powierzchni kilku cm^2 . Na 1 kg nabłonka dodawano 5 do 7 l płynu odżywczego. Hodowle zakażano zawieszoną wirusa w takiej ilości, aby na 1 kg nabłonka przypadło 10^{10} TCID₅₀. W celu zabezpieczenia hodowli przed rozwojem bakterii dodawano następujące ilości antybiotyków: penicyliny 100 j/ml, neomycyny 100 mcg/ml, chloramfenikolu 100 mcg/ml, nystatyny 50 jedn./ml.

Zakażone hodowle inkubowano w temperaturze 36–37°C przez 24 godz. Następnie oddzielano nabłonek od płynu. Nabłonek zamrażano w temp. -60°C , płyn schładzano do temp. 2 do 4°C.

Mianowanie wirusa. Wszystkie materiały wirusowe mianowano na jednowarstwowych hodowlach trypsynowanej nerki cielęcia. Każdym rozcieńczeniem wirusa zakażano 5 hodowli próbowkowych. 50% dawkę zakaźną obliczano wzorem Reeda Muencha.

Szczepionka przeciwpryszczycowa. Przygotowano szczepionkę o następującym składzie:

1. Materiał wirusowy — nabłonek z języków	6,00%
2. Materiał wirusowy — płyn hodowli	30,00%
3. Wodorotlenek glinu	30,00%
4. Glikokolowy płyn buforowy ca	1,00%
5. Formalina 40%	0,08%
6. Saponina	0,02%
7. Gliceryna	5,00%
8. Fosforanowy płyn buforowy do	100,00%

Nabłonek po rozmrożeniu rozdrabniano w młynku koloidalnym i ekstrahowano dwukrotnie fosforanowym płynem buforowym o pH = 7,6 w temp. 4–5°C. Odwirowany ekstrakt oraz płyn pochodzący z hodowli emulgowano z dodatkiem 0,5% chloroformu dla wyjałowienia i wytrącenie niespecyficznych białek. Po 24 godz. odwirowywano wytrącony chloroformem osad, płyn mieszano z wodorotlenkiem glinu i glikokolowym płynem buforowym doprowadzając pH do 8. Po dodaniu formaliny inaktywowano szczepionkę przez 48 godz. w temperaturze 25°C. Wprowadzenie saponiny jako adjuwantu i gliceryny oraz ewentualna korekta pH kończyły cykl produkcyjny.

Kontrola skuteczności szczepionki.

Kontrolę skuteczności szczepionek przeprowadzano na bydło analogicznie jak kontrolę szczepionek rutynowych tj. szczepiono 5 zwierząt, które zakażano wraz ze zwierzętami kontrolnymi po 21 dniach przez podśluzówkową iniekcję do języka 10.000 ID₅₀ zarazka. Kontrolę skuteczności uzupełniano określeniem poziomu przeciwciał zobojętniających w surowicach pochodzących od zwierząt szczepionych. Odczyn seroneutralizacji wykonywano metodą stałej dawki wirusa zawierającej około 500 TCID₅₀. Miana surowic obliczone metodą 50% dawki zobojętniającej wg wzoru Reeda Muencha podane są w przeliczeniu na log. dziesiętne.

Omówienie wyników

Wirus typu O namnażano w 20 hodowlach. Używana jednorazowo ilość nabłonka wahała się w granicach od 4,10 do 10,5 kg. Łącznie użyto do namnożeń 161,4 kg nabłonka pochodzącego z 4.860 języków.

Wszystkie hodowle dały wynik pozytywny. Z otrzymanego materiału wirusowego przygotowano 14 serii szczepionki przeciwpryszczycowej liczącej w sumie 513.000 dawek (tab. 1).

Tab. 1. Kontrola aktywności szczepionek przeciwpryszczycowych typu O otrzymanych z wirusa namnożonego w zmodyfikowanym płynie odżywczym.

Symbol serii	Ilość szczepionki w dawkach	Miano użytego mater. wirus w TCID ₅₀ /ml	Wyniki kontroli						Średni poziom przeciwciał w surowicy (log SN ₅₀)
			Ilość zwierząt szczepionych	Ilość zwierząt kontrolnych	Wyniki badania podobajowego	Zwierzęta z kontrolnym procesem chorob.	Zwierzęta z kontrolnym procesem chorob.	Zwierzęta z kontrolnym procesem chorob.	
O-1	20.000	10 158	5	2	5	-	-	176	
O-2	10.000	10 163	5	2	5	-	-	174	
O-3	20.000	10 532	5	2	3	-	-	152	
O-4	20.000	10 583	5	2	5	-	-	168	
O-5	20.000	10 583	5	2	3	-	-	194	
O-6	30.000	10 100	5	2	4	f	-	151	
O-7	55.000	10 193	5	2	5	-	-	202	
O-8	30.000	10 583	5	2	5	-	-	183	
O-9	30.000	10 161	5	2	5	-	-	209	
O-10	40.000	10 193	4	2	3	f	-	209	
O-11	40.000	10 173	5	2	5	-	-	190	
O-12	50.000	10 217	5	2	5	-	-	180	
O-13	50.000	10 160	5	2	5	-	-	203	
O-14	10.000	10 185	5	2	5	-	-	203	
Razem	513.000								

Kontrola przeprowadzona na bydłe wykazała, że szczepionki pochodzące ze wszystkich serii odznaczały się wysoką aktywnością. W przeprowadzanych dla poszczególnych serii szczepionki badaniach skuteczności zaszczepiono ogółem 55 zwierząt, wszystkie okazały się niewrażliwe na dojęzykowe zakażenie 10.000 ID₅₀ zarazka. Wysoki był również poziom przeciwciał zobojętniających w surowicach pochodzących od zwierząt szczepionych: log SN₅₀ obliczany średnio dla każdej serii wahał się w granicach od 1,61 do 2,21, a wg francuskich norm kontroli, szczepionki dające średni wskaźnik SN₅₀ > 1,5 zaliczane są do najwyższej klasy i zwalniane od kontroli infekcyjnej.

Wirus pryszczycy typu A był namnażany w 12 hodowlach. Ilość używanego jednorazowo nabłonka wahała się (jak i przy typie O) w dość szerokich granicach. W sumie ten typ wirusa namnożono na 98,2 kg nabłonka zebranego z 3.050 języków bydlęcych. Z tej ilości materiału wirusowego wyprodukowano 7 serii szczepionki liczącej 297.000 dawek (tab. 2).

Tab. 2. Kontrola aktywności szczepionek przeciwpryszczycowych typu A otrzymanych z wirusa namnożonego w zmodyfikowanym płynie odżywczym.

Symbol serii	Ilość szczepionki w dawkach	Miano użytego mater. wirus w TCID ₅₀ /ml	Wyniki kontroli skuteczności						Średni poziom przeciwciał w surowicy (log SN ₅₀)
			Ilość zwierząt szczepionych	Ilość zwierząt kontrolnych	Wyniki badania podobajowego	Zwierzęta z kontrolnym procesem chorob.	Zwierzęta z kontrolnym procesem chorob.	Zwierzęta z kontrolnym procesem chorob.	
A-1	22.000	10 831	5	2	5	-	-	158	
A-2	30.000	10 700	3	2	3	-	-	203	
A-3	50.000	10 763	5	2	5	-	-	176	
A-4	30.000	10 760	5	2	4	f	-	197	
A-5	51.000	10 700	5	2	5	-	-	203	
A-6	60.000	10 800	5	2	5	-	-	209	
A-7	54.000	10 731	5	2	5	-	-	203	
Razem	297.000								

Kontrolę skuteczności przeprowadzono uodparniając 33 sztuki bydła i zakażając 14 zwierząt kontrolnych. Zwierzęta uodpornione okazały się w 100% niewrażliwe na podśluzówkowe zakażenie homologicznym typem wirusa. Wskaźnik poziomu przeciwciał neutralizujących w surowicy bydła uodpornionego wahał się dla poszczególnych serii szczepionki od 1,58 do 2,09.

Dla namnożenia wirusa typu C założono 14 hodowli z użyciem 94,5 kg nabłonka pochodzącego z 2.940 języków. Otrzymany materiał wirusowy służył do przygotowania 219.000 dawek szczepionki w 10 seriach (tab. 3).

Tab. 3. Kontrola aktywności szczepionek przeciwpryszczycowych typu C otrzymanych z wirusa namnożonego w zmodyfikowanym płynie odżywczym.

Symbol serii	Ilość szczepionki w dawkach	Miano użytego mater. wirus w TCID ₅₀ /ml	Wyniki kontroli						Średni poziom przeciwciał w surowicy (log SN ₅₀)
			Ilość zwierząt szczepionych	Ilość zwierząt kontrolnych	Wyniki badania podobajowego	Zwierzęta z kontrolnym procesem chorob.	Zwierzęta z kontrolnym procesem chorob.	Zwierzęta z kontrolnym procesem chorob.	
C-11	10.000	10 533	5	2	4	1	-	2	151
C-12	20.000	10 283	5	2	5	-	-	2	178
C-13	15.000	10 250	5	2	5	-	-	2	164
C-14	15.000	10 250	5	2	5	-	-	2	156
C-15	15.000	10 630	5	2	5	-	-	2	153
C-16	15.000	10 680	3	2	3	-	-	2	154
C-17	12.000	10 715	3	2	3	-	-	2	168
C-18	14.000	10 683	5	2	4	1	-	2	172
C-19	30.000	10 700	5	2	5	-	-	2	139
C-20	71.000	10 632	5	2	5	-	-	2	183
Razem	219.000								

Do kontroli skuteczności szczepionki użyto 66 sztuk bydła. Z tego 46 zwierząt zaszczepiono a 20 użyto jako kontrolne. Wszystkie zwierzęta zaszczepione uzyskały wysoką odporność i nie reagowały na zakażenie. Minimalny poziom przeciwciał neutralizujących dla szczepionki typu C wyrażony w log. SN₅₀ wyniósł 1,39, maksymalny 1,78.

Wnioski

1. Przy użyciu zmodyfikowanego płynu odżywczego można namnażać w skali produkcyjnej wirus pryszczycy trzech typów europejskich O, A i C w hodowlach na nabłonku.
2. Wirus namnożony w hodowlach na nabłonku posiada właściwości pozwalające na użycie go jako materiału wyjściowego do produkcji szczepionki.
3. W oparciu o materiał wirusowy pochodzący z hodowli wyprodukowano łącznie 31 serii szczepionki. Szczepionki z wszystkich serii cechowała bardzo wysoka aktywność stwierdzona po kontrolnym zakażeniu zwierząt uodpornionych oraz przez stwierdzenie u tych zwierząt wysokiego poziomu przeciwciał zobojętniających.

Piśmiennictwo

1. Camand R., Gilbert H., Amighi M., Korour A.: Bull. Off. int. Epizoot. 59, 1037, 1963.
2. Dubouclard C., Roumiantzeff M., Fontaine J., Maczkowski C.: Bull. Soc. Sci. vet. Lyon 68, 243, 1966.
3. Dubouclard C., Gilbert H., Fontaine J., Roumiantzeff M.: IX-e Congrès Int. Microb., Moskwa, 1966.
4. Fogedby E. F., Johnson M. G.: Bull. Off. int. Epizoot. 37, 473, 1952.
5. Frenkel H. S.: Bull. Off. int. Epizoot. 23, 155, 1947.
6. Frenkel H. S.: Am. J. vet. Res. 11, 371, 1950.
7. Frenkel H. S.: Am. J. vet. Res. 12, 187, 1951.
8. Frenkel H. S.: Bull. Off. int. Epizoot. 33, 91, 1953.
9. Frenkel H. S., Ribelin W. E.: Am. J. vet. Res. 17, 40, 1956.

10. Girard H., Maćkowiak C.: Rev. Immunolog. Ther. antimicrob. 17, 224, 1953.
11. Maćkowiak C., Petermann H. G., Camand R., Fontaine J.: Publications IFFA Lyon, 65, 1963—64.
12. Maćkowiak C., Girard H., Camand R., Hirtz J.: Rev. Immunolog. Ther. antimicrob. 19, 436, 1955.
13. Ubertini B., Nardelli L., Barei S., Santero G.: Bull. Off. int. Epizoot. 43, 559, 1955.
14. Ubertini B., Nardelli L., Barei S., Santero G.: Zentbl. Vet. Med. 3, 419, 1956.
15. Waldmann O.: Bull. Off. int. Epizoot. 14, 191, 1937.
16. Waldmann O., Pyl G., Hobohm K. O., Mohlmann H.: Zentbl. Bact. Parasitkde I. 148, 1, 1941.

Adres autora: mgr inż. Stefan Szkilnik, Zduńska Wola, Wodna 7.

Шкильник С., Кобусевич Т., Висьневски Е., Барановски Ч., Лабэдка В., Янковска Я. — **Применение метода Френкеля при продукции вакцины против ящура.**

Приготовили несколько серий противоящурной вакцины для свиней на основании вируса типа О

(штамм GL-69) размноженного по методу Френкеля. Количество вируса в вакцине равнялось 30%. Установили, что приготовленная вакцина не вполне предохраняла свиней от контактного заражения вирусом ящура.

Szkilnik S., Kobusiewicz T., Wiśniewski J., Baranowski Cz., Labędzka W., Jankowska J. — **The application of Frenkl's method for the production of the vaccine against Foot-and-Mouth disease.**

Certain series of the vaccines for pigs were prepared by the use of strain GL-69 (type O) multiplied acc. to Frenkl's method. Thirty per cent of the viral material was used as inoculum. The vaccine obtained was controlled for effectiveness and harmlessness. It was found that the vaccine did not protect the pigs completely from the contact infections with FMD virus.

JAN BUCZEK, JAN KRZYŻANOWSKI, BARBARA MAJER, EDWARD MALINOWSKI

Zapalenie strzyków u krów spowodowane przez wirus z grupy Pox

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Weterynarii AR w Lublinie
Dyrektor: doc. dr habil. S. WOŁOSZYN

Instytut Chorób Niezakaźnych
Wydziału Weterynarii AR w Lublinie
Dyrektor: doc. dr habil. S. KOFER

Przyczyną enzootycznych wirusowych zapaleń strzyków u bydła są zarazki należące wg Hucka (9) do trzech różnych grup systematycznych: *Pox*, *Herpes* i *Papova*.

Kliniczne zakażenia wywołane przez wirusy z grupy *Pox* tj. wirus ospy krowiej (*Poxvirus bovis*), wirus wakcyny (*Poxvirus officiale*) lub wirus ospy rzekomej (*Parapoxvirus*) są trudne do zróżnicowania. Czynniki etiologiczne wg Laudera i wsp. (12) można w tym przypadku zidentyfikować tylko przy pomocy badań wirusologicznych. W Polsce, jak wskazują na to publikacje (2, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 18, 20) zakażenia u bydła wirusami z grupy ospy występują dość często. Wydaje się, że w naszych warunkach największą rolę odgrywa wirus wakcyny.

W niektórych krajach jak np. w Wielkiej Brytanii, w stadach bydła mlecznego często przyczyną zapaleń strzyków jest wirus *Herpes mammillitis*, zarazek izolowany po raz pierwszy w Szkocji przez Martin'a i wsp. (14). Obraz kliniczny tego schorzenia różni się od zakażeń wywołanych przez wirusy z grupy ospy, nagłym występowaniem zmian, ostrym przebiegiem i szybkim rozprzestrzenianiem się choroby.

Wirusy z grupy *Papova* powodują między innymi brodawczycę wymienia. Rozpoznawanie choroby nie następuje w zasadzie trudności. Brodawczycę spotykana dość często w naszym kraju jest bardzo kłopotliwa, zwłaszcza u krów mlecznych. Próby leczenia brodawczycy wymion były przedmiotem naszej poprzedniej publikacji (11).

W niniejszym doniesieniu, przedstawiono wyniki obserwacji klinicznych, badań laboratoryjnych i leczenia enzootycznego zapalenia strzyków. Jak wykazały badania, przyczyną obserwowanego schorzenia była infekcja wirusowa. W wywiadzie nie udało się ustalić żadnego powiązania ze szczepieniami przeciwospowymi ludzi. Podejrzewano więc, że przyczyną schorzenia może być niezidentyfikowany w Polsce wirus ospy rzekomej, lub *Herpes mammillitis virus*. Przeprowadzone badania wirusologiczne pozwoliły na dokładną identyfikację zarazki.

Praca stanowi więc cenny przyczynek do rejestracji schorzeń wirusowych bydła w Polsce.

Badania własne

Pierwsza obserwacja dotyczyła krowy rasy czarnobiałej, dostarczonej do Kliniki Położniczej Wydz. Wet. w Lublinie z powodu schorzenia strzyków. Krowa własnego chowu przed 6 miesiącami wycieliła się a 4 miesiące temu była inseminowana.

Wg relacji właściciela przed około 10-ciu dniami na strzykach przednich ćwiartek wymienia pojawiły się pęcherze, strzyki stały się bolesne i krowa nie pozwalała się doić, a ilość mleka wybitnie się zmniejszyła. Podobne objawy pojawiły się również u 2 pozostałych krów, z tym, że zmiany na strzykach były słabsze i zwierzęta pozwalały się doić. U zwierząt tych również obserwowano spadek mleczności. U cieląt przebywających w tym samym pomieszczeniu klinicznie nie stwierdzono żadnych objawów choroby.