

TADEUSZ WIJASZKA, STANISŁAW TERESZCZUK, MARIA MIERZEJEWSKA,
JAN ZADURA, JACEK ROSZKOWSKI

Badania nad laboratoryjnym rozpoznawaniem zakaźnego wirusowego zapalenia żołądka i jelit świń (TGE). III. Próba immunofluorescencji bezpośredniej

Z Zakładu Badania Chorób Świń
Instytutu Weterynarii w Puławach

Z Zakładu Anatomii Patologicznej
Instytutu Weterynarii w Puławach

Na przestrzeni ostatnich lat pojawiły się w piśmiennictwie weterynaryjnym prace na temat możliwości stosowania próby immunofluorescencji (if) w laboratoryjnej diagnostyce TGE (2—11). Uzyskane wyniki — generalnie rzecz biorąc — można uznać za pomyślne. Dotyczy to w pierwszym rzędzie immunofluorescencji wykonywanej metodą bezpośrednią (ifb), opartej o preparaty histopatologiczne z jelit cienkich chorych prosiąt (4, 7, 8, 9, 10, 11). Mając powyższe na uwadze podjęto niniejszą pracę, której celem jest zaadaptowanie próby ifb do rutynowej diagnostyki TGE w naszym kraju, a także wyprodukowanie odpowiedniej ilości swoistej surowicy znakowanej, z zamiarem udostępnienia jej Zakładom Higieny Weterynaryjnej.

Materiał i metody

Do badań użyto:

1. Dwa, opisane w poprzedniej pracy (12), cytopatyczne szczepy wirusa TGE, oznaczone symbolami N-17, i C-71;
2. Jednowarstwową pierwotną hodowlę komórek nerki świni, przygotowaną według metody podanej poprzednio (12);
3. Surowicę krwi świni hiperimmunizowanej szczepem wirusa TGE, oznaczonego symbolem N-17, której miano końcowe wynosiło 1:720 TCID₅₀;
4. Koniugatę wzorcową do rozpoznawania TGE, produkcji Bioveta Ivanovice n/Hane, otrzymaną z Instytutu Weterynarii w Brnie (CSSR);
5. Trzy mioty (A, B, C) dwudniowych prosiąt, łącznie z maciorami, pochodzącymi z gospodarstwa hodowlanego wolnego od TGE;
6. 138 prosiąt nadesłanych z terenu do badań rozpoznawczych w kierunku TGE na przełomie lat 1970—1972, z czego 107 sztuk dostarczono w stanie żywym, w 2—10 dniu choroby, a 31 w stanie martwym, po upływie 6—48 godzin od chwili padnięcia.

Koniugatę własną przygotowano w następujący sposób: przeciwciała anti-TGE, zawarte w surowicy krwi uzyskanej ze świni hiperimmunizowanej szczepem M-17, wytrącono siarczanem amonu i dializowano, a uzyskana gamma-globulinę oczyszczono celulozą DEAE-DE₅₀. Znakowanie p-ciał izotiocyanianem fluoresceiny (Fluka) przeprowadzono wg metody Coonsa w modyfikacji Aynaud i Bibarda (1).

W każdym z trzech dwudniowych miotów jedno prosię usypiano, a pozostałe dzielono na dwie grupy z których pierwszą — łącznie z maciorą — zakażano doustnie i donosowo wirusem TGE, a drugą pozostawiono do zakażenia kontaktowego. Miot A zakażono

szczepem N-17, podając dwóm prosiętom 2×10^4 , a maciorze 2×10^4 TCID₅₀ wirusa namnożonego w hodowli komórek nerki świni; 3 sztuki prosiąt z miotu B i maciorę zakażono szczepem C-71 w dawkach podanych wyżej; część miotu C (3 szt.), łącznie z maciorą, zakażono rozcierem jelit cienkich prosięcia podejrzanego o TGE, które zostało dostarczone do badań rozpoznawczych z terenu. Część prosiąt usypiono po upływie 24—72 godz. od chwili zakażenia, a reszta padła w czasie 46—115 godzin. Natychmiast po śmierci prosiąt wykonywano sekcję, pobierając równocześnie 1 cm wycinki jelita czczego i biodrowego w celu sporządzenia preparatów histopatologicznych niezbędnych do wykonania próby ifb. Wzorowano się przy tym częściowo na technice podanej przez Pospíšila i wsp. (9). Wycinki jelit najpierw utrwalano w acetonie w temp. +4°C co najmniej przez 4 godz., a następnie prześwietlano je w dwu zmianach benzenu w temperaturze pokojowej i zatapiano w nisko topliwej parafinie (52—54°C).

Z zatopionych przetrzymywanych w lodówce bloczków, krojono skrawki grubości 4—5 μ , przytwierdzano je do szkiełek podstawowych i po upływie godziny odparafinowywano w ksylenie przez 5 minut, płukano w alkoholu 96% i 70% przez 5 minut, a następnie w buforze fosforanowym 10 minut. Po wysuszeniu preparatów w temp. pokojowej „barwiono” je koniugatą w komorze wilgotnej o temp. 37°C przez 30 minut, potem płukano przez 10 minut w PBS, oraz przez 5—10 sekund w wodzie destylowanej. Skrawki powlecano mieszaniną gliceryny i PBS (1 cz. gliceryny + cz. PBS) i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Oceny preparatów dokonywano w mikroskopie luminescencyjnym ME-2, stosując filtry ultrafioletu UFS 5—6, oraz filtry barierowe ZS-18.

Kontrole swoistości ifb przeprowadzono w odczynie wygaszania, stosując przed barwieniem koniugatą 30 minutowe wysycanie preparatów surowicą o wysokim mianie przeciwciał anti-TGE.

Z prosiętami dostarczonymi z terenu i z pobranym z nich materiałem (wycinki jelita czczego i biodrowego) postępowano w sposób wyżej opisany.

Wyniki

Wszystkie trzy mioty prosiąt, zakażone łącznie z maciorami trzema różnymi szczepami wirusa TGE, już po upływie 18—24 godz. — jeśli chodzi o prosięta, którym podano wirus doustnie i donosowo, lub po upływie 36—48 godzin — w przypadku prosiąt pozostawionych do zakażenia kontaktowego, zachorowały wśród objawów typowych dla zakaźnego wirusowego zapalenia żołądka i jelit (12). Zmiany anatomiczne i histopatologiczne, które stwierdzono u uspiętych i padłych prosiąt opisano poprzednio (12, 13).

U zakażonych macior stwierdzono tylko ogólną apatię, znacznie zmniejszone laktowanie, utratę wydzielania mleka. Biegunki nie obserwowano. Po upływie kilku dni stan ogólny tych zwierząt powrócił do normy.

Wyniki próby immunofluorescencji bezpośredniej (ifb), wykonanej na skrawkach parafinowych z jelita czczego i biodrowego doświadczalnych prosiąt, przedstawiono w tab. 1. Wynika z niej, że po upływie 24 godzin od chwili zakażenia tych zwierząt, niezależnie od użytego szczepu wirusa TGE, próba ifb wypadła dodatnio. Swoistą fluorescencję w postaci jasnego żółto-zielonego świecenia plazmy wykazywało ok. 30—60% komórek nabłonka błony śluzowej (enterocytów) badanych wycinków jelit. U prosiąt uspijonych lub padłych w 48—115 godz. po zakażeniu wirusem TGE, czy też po pozostawieniu ich w bezpośrednim kontakcie z zakażonymi zwierzętami, swoistą fluorescencję stwierdzono w 60—90%, a nawet w 100% enterocytów. Cytoplazma komórek nabłonka jelitowego zwierząt kontrolnych, oraz części komórek zwierząt chorych, wykazywała fluorescencję nieswoistą (ujemną) w odcieniu zielonkawym. Jądra komórek zarówno „dodatnich” jak i „ujemnych” były pozbawione fluorescencji. Nie stwierdzano istotnych różnic między preparatami z jelita czczego i biodrowego w zakresie komórek wykazujących dodatnią fluorescencję.

do badania dopiero po upływie 8—10 godz. po śmierci.

Ujemne wyniki uzyskano przy badaniu 26 prosiąt. Dotyczyły one częściowo przypadków, u których lekarz terenowy niesłusznie podejrzewał TGE, albo kiedy dostarczone do badań prosięta długo chorowały, bądź dostarczone je zbyt późno po padnięciu.

Dyskusja

Wprowadzenie do rutynowej praktyki laboratoryjnej szybkiej, prostej w wykonaniu, a równocześnie dokładnej metody rozpoznawania TGE, jest obecnie sprawą niezmiernie pilną. Wymienionym warunkom wydaje się odpowiadać w znacznym stopniu próba immunofluorescencji. Nie wchodzi tu raczej w rachubę — w naszych obecnych warunkach — immunofluorescencja wykonywana metodą pośrednią, polegającą na „barwieniu” koniugatą hodowli komórek zakażonych uprzednio nadesłanym do badania, podejrzanym o TGE, materiałem. Do

Tab. 1. Wyniki rozpoznawania zakaźnego wirusowego zapalenia żołądka i jelit świń przy pomocy próby immunofluorescencji bezpośredniej u prosiąt sztucznie zakażonych różnymi szczepami wirusa TGE

Nr miotu	Wirus TGE użyty do zakażenia	Sposób zakażenia	Liczba prosiąt	Czas uspienia / padnięcia prosiąt od chwili zakażenia (w godzinach)	Wyniki ifb	
					Koniugata własna uspienie/padłe	Koniugata czeska uspienie/padłe
A	N-77	donosowo (caustycznie) kontaktowo	2	24/46	+/+++	+/+++
			2	48/66	+++ /+++	+++ /+++
			1 (K)	uspienie przed zakażeniem	—	—
B	C-71	donosowo (caustycznie) kontaktowo	3	24, 48 / 70	+++ , +++ /+++	+++ , +++ /+++
			3	48 / 45, 71	+++ /+++ , +++	+++ /+++ , +++
			2 (K)	uspienie przed zakażeniem	—	—
C	rozcięt jelit prosięcia podejrzanego o TGE	donosowo (caustycznie) kontaktowo	3	24, 72 / 48	+++ , +++ /+++	+++ , +++ /+++
			2	72 / 115	+++ /+++	+++ /+++
			1 (K)	—	—	—

Objaśnienia: K = prosięta kontrolne; ++ = dodatnia fluorescencja ok. 30% komórek nabłonka jelitowego; +++ = dodatnia fluorescencja ok. 60% komórek nabłonka jelitowego; ++++ = dodatnia fluorescencja 80-100% komórek nabłonka jelitowego.

Jak wynika z tab. 1, koniugata własna dawała wyniki bardzo zbliżone do czeskiej, tzn. w jednakowym prawie stopniu dodatnie u wszystkich prosiąt chorych na TGE, oraz ujemne u zwierząt kontrolnych.

Tab. 2. Wyniki rozpoznawania TGE przy pomocy immunofluorescencji bezpośredniej u prosiąt dostarczonych z terenu.

Wiek prosiąt	Liczba dostarczonych prosiąt żywych/padłych	Wyniki próby ifb		
		+	±	-
		uspienie/padłe	uspienie/padłe	uspienie/padłe
do 2 tygodni	60/23	58/3	- /5	2/15
2-4 tygodnie	47/6	40/0	2/4	3/4
Razem	107/31 (138)	98/3 (101)	2/9 (11)	5/19 (26)

Wyniki próby ifb wykonywanej na preparatach przygotowanych z jelita czczego i biodrowego prosiąt nadesłanych z terenu przedstawiono w tab. 2. Dane zebrane w tab. 2 wskazują, że spośród 138 prosiąt nadesłanych do badania z terenu, dodatnie wyniki uzyskano u 101 zwierząt. Należy zaznaczyć, że tylko w trzech przypadkach dotyczyły one zwierząt padłych przed dostarczeniem do Instytutu Wet.

Wyniki wątpliwe (niezdecydowany odcień immunofluorescencji) uzyskano w sumie u 11 prosiąt, z czego 2 u prosiąt żywych, starszych niż 2 tygodnie i chorujących ok. 8—10 dni, a 9 u prosiąt padłych, u których choroba trwała 5—18 dni, zaś wycinki jelit pobrano

wykonania tej próby konieczne jest bowiem posiadanie dobrze wyposażonej pracowni wirusologicznej, a samo badanie trwa co najmniej kilka dni. W pełni natomiast przydatna do rutynowej diagnostyki TGE jest próba immunofluorescencji bezpośredniej, szczególnie jeśli wykonuje się ją zastosowaną w niniejszej pracy techniką skrawków parafinowych, przygotowanych z jelit cienkich podejrzanych o TGE chorych prosiąt. Umożliwia ona bowiem postawienie diagnozy w ciągu 24 godzin, albo nawet jeszcze szybciej, jest stosunkowo prosta, a co najważniejsze — przy świeżym materiale patologicznym i dobrej koniugacie — może zapewnić nawet w 100% trafne rozpoznanie. Świadczą o tym wyniki pracy własnej (tab. 1) oraz wyniki badań innych autorów, głównie zaś Pansearta i wsp. (7). Wykazali oni między innymi, że właściwie wykonana próba ifb nie ustępuje pod względem dokładności diagnostycznej próbie biologicznej na wrażliwych prosiętach. Uzyskanie tak dużej dokładności, oprócz dobrej koniugaty, należy przypisać w

znacznej mierze użyciu w tej technice preparatów histopatologicznych z jelita czczego i ewentualnie biodrowego. Jak wykazały bowiem badania wielu autorów, najwyższą koncentracją wirusa stwierdza się w komórkach nabłonka tych właśnie odcinków jelit, głównie zaś jelita czczego i dlatego też tam najłatwiej wykazać obecność wirusa TGE.

Wprawdzie Konishi i Bańkowski (3), stosując technikę odciskową uzyskali więcej wyników dodatnich w preparatach z węzłów chłonnych krezkowych (86,6%) i migdałków (93,3%) chorych na TGE prosiąt, niż w preparatach z jelit cienkich (74,3%), to jednak wydaje się, że diagnostyczna swoistość tych wyników może budzić pewne wątpliwości. Upoważniają do tego zarówno dotychczasowe wiadomości na temat powinowactwa wirusa TGE do poszczególnych narządów i tkanek, jak również, będące praktycznym potwierdzeniem powyższego, wyniki badań Pospisila i wsp. (9, 10). Wymienieni autorzy w preparatach z węzłów chłonnych krezkowych i migdałków prosiąt chorych na TGE w ogóle nie spotkali komórek o dodatniej fluorescencji, wskazującej na obecność w nich wirusa tej choroby. Stwierdzili oni wprawdzie jasną fluorescencję w granulocytach, ale występowała ona zarówno w preparatach z prosiąt chorych na TGE, jak i zdrowych — kontrolnych. Można więc sądzić, zgodnie zresztą z opinią Nairna (9), że była to fluorescencja nieswoista.

Skromna stosunkowo ilość dodatnich wyników próby ifb, uzyskana przez Konishi i Bańkowskiego (3) w preparatach odciskowych z jelit cienkich prosiąt zakażonych wirusem TGE (74,3%), wydaje się przemawiać za tym, że technika preparatów odciskowo-mazanych nie jest odpowiednia dla rozpoznawania wymienionej choroby. Technika skrawków parafinowych stosowana przez Pospisila i wsp. (9), Sobiecha i wsp. (11), oraz wypróbowana przez nas w niniejszej pracy, jest niewątpliwie bardziej niezawodna. Do jej zalet należy zaliczyć m. in. możliwość zachowania naturalnego anatomiczno-przestrzennego układu badanych tkanek, co znacznie ułatwia prawidłową ocenę preparatów, a tym samym prawidłowe rozpoznanie. Poza tym, jak wynika z własnych obserwacji i badań Pospisila i wsp. (9, 10), zatopione w parafinie wycinki jelit, jeśli są przechowywane w chłodni, nadają się do celów rozpoznawczych nawet po upływie kilku miesięcy.

Jednym z zasadniczych warunków uzyskania miarodajnych wyników próby ifb, wykonywanej techniką skrawków parafinowych, podobnie zresztą jak i przy pomocy innych technik, jest użycie do badań świeżego materiału, pobranego z prosiąt uśpionych lub padłych w 1—4 dniu choroby. Chodzi o to, że, po pierwsze, szybko zachodzące w przewodzie pokarmowym zmiany autolityczne i gnilne już po upływie kilku godzin od śmierci zwierzęcia powodują nieswo-

istą fluorescencję enterocytów zakażonych wirusem TGE, a powtórnie, równoległe z zaczynającą się po kilku dniach choroby regeneracją kosmków, zmniejsza się szybko liczba dodatnio fluoryzujących komórek nabłonka jelitowego, co — siłą rzeczy — zmniejsza również szanse prawidłowego rozpoznania. Po upływie 10 dni od wystąpienia pierwszych objawów choroby, nawet przy użyciu zupełnie świeżego materiału patologicznego, wyniki próby ifb są już z reguły ujemne (9). Diagnostyczną przydatność prosiąt padłych w okresie 1—5 dnia choroby, można przedłużyć najwyżej do 12 godzin po śmierci, ale tylko wówczas, jeśli zwłoki tych zwierząt będą przechowywane w lodówce (9).

Reasumując wydaje się możliwe stwierdzić, że próba immunofluorescencji bezpośredniej, wykonywana techniką skrawków parafinowych z uwzględnieniem podanych wyżej warunków, może być zalecana w rutynowej diagnostyce TGE w naszym kraju. Wdrożenie jej do praktyki laboratoryjnej nie powinno napotykać na poważniejsze przeszkody. Mamy bowiem krajową, dostatecznie swoistą koniugatę, a większość ZHW dysponuje niezbędnym wyposażeniem technicznym i kwalifikowaną kadrą.

Wnioski

1. Próba immunofluorescencji bezpośredniej wykonywana na skrawkach parafinowych jelita czczego i ewentualnie biodrowego chorych prosiąt, pozwala na uzyskanie 100% dodatnich wyników u zwierząt zakażonych wirusem TGE.
2. Warunkiem uzyskania prawidłowego rozpoznania TGE jest dostarczenie do ZHW prosiąt żywych, chorujących nie dłużej niż 4 dni, albo też padłych, ale możliwie najszybciej po zejściu śmiertelnym (do 4 godzin).
3. Znakowana surowica anty-TGE, przygotowana we własnym zakresie, nie ustępuje pod względem swoistości koniugacie czeskiej („Bio-veta” — Ivanovice) i w pełni jest przydatna do próby immunofluorescencji.
4. Próba immunofluorescencji wykonywana stosowaną w tej pracy techniką jest szybką, tanią i dokładną metodą laboratoryjnego rozpoznawania TGE.
5. Próbę immunofluorescencji bezpośredniej opartą na krajowej koniugacie i parafinowych skrawkach z jelita czczego i ewent. biodrowego chorych prosiąt należy wprowadzić do rutynowej diagnostyki TGE we wszystkich zakładach rozpoznawczych w kraju.

Piśmiennictwo

1. Aynaud J. M., Bibard C.: Les Cahiers Méd. Vét. 5, 1, 1971.
2. Haalterman E. O., Hooper B. E.: Gastroenterology 53, 109, 1967.
3. Konishi S., Bankowski R. A.: Am. J. vet. Res. 28, 937, 1967.
4. Kretschmar Ch.: Mh. Vet.-Med. 26, 51, 1971.
5. Mc Clurkin A. W.: Can. J. comp. med. vet. Sci. 29, 46, 1965.

6. Mc Clurkin A. W., Norman J. O.: Can. J. comp. med. vet. Sci. 30, 190, 1966.
7. Panseart M., Haelterman E. O., Burnstein T.: Can. J. comp. med. vet. Sci. 32, 555, 1968.
8. Panseart M., Haelterman E. O., Burnstein T.: Arch. ges. Virusforsch. 31, 3—4, 321, 1970.
9. Pospisil Z., Mesaros E., Stepanek J.: Vet. Med. Praga 14, 351, 1969.
10. Pospisil Z., Mesaros E., Stepanek J.: Materiały Weterynaryjnej Sesji Naukowej RWPg, Budapeszt 1970.
11. Sobiech T., Bochladek R., Losieczka K.: Medycyna Wet. 28, 323, 1972.
12. Wijaszka T., Tereszczuk S.: Medycyna Wet. 30, 68, 1973.
13. Zadura J., Roszkowski J., Tereszczuk S., Wijaszka T.: Medycyna Wet. 30, 145, 1973.

Adres autora: dr Tadeusz Wijaszka, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy.

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

Wpływ czasu przechowywania nabłonka językowego bydła na właściwości uodparniające szczepionki przeciwpryszczycowej przygotowanej metodą Frenkla

Z Zakładu Badania Pryszczycy Instytutu Weterynarii w Zduńskiej Woli

Efekty uzyskiwane przy namnażaniu wirusa pryszczycy metodą Frenkla, to jest przy namnażaniu *in vitro* na nabłonku zebranych z języków bydła rzeźnego, uzależnione są w dużej mierze od świeżości nabłonka. W nielicznych przypadkach produkcyjne namnażanie wirusa pryszczycy można prowadzić na nabłonku bezpośrednio zebranych z języków. W większości do produkcji trafia nabłonek przechowywany przez pewien okres czasu w płynach konserwujących.

Dane zamieszczone w piśmiennictwie odnoszącym się do tego zagadnienia (1, 2, 3, 4, 5) określają maksymalny czas przechowywania nabłonka na 5 do 7 dni od chwili zebrania. Przeżywanie tkanki nabłonkowej równoznaczne z okresem jej przydatności do namnażania wirusa pryszczycy uzależnione jest od szeregu czynników kształtujących się odmiennie w różnych zakładach. Z tego względu podjęto prace doświadczalne, mające wyjaśnić jak długo w warunkach istniejących w Zakładzie Badania Pryszczycy można przechowywać zebrany nabłonek bez obawy obniżenia walorów uodparniających produkowanej szczepionki przeciwpryszczycowej.

Materiał i metody

Nabłonek. Języki odcięte bezpośrednio po uboju bydła myto bieżącą ciepłą wodą, zmywano alkoholem etylowym o stężeniu 72% i naświetlano promieniami ultrafioletowymi. Po tych zabiegach nabłonek ścinano z języków i umieszczano natychmiast w ochłodzonym do 4°C płynie konserwującym o składzie:

NaCl	72 g
KCl	2 „
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	7,5 „
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0,7 „
CaCl ₂ · 6H ₂ O	4 „
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1 „

NaHCO ₃	20 g
Głukoza	10 „
Ekstrakt drożdżowy	10 „
Hydrolyzatek laktoalbuminy	40 „
Neomycyna	2 „
Sulfametazyna Na	10 „
Penicylina	3 mil jedn.
Woda destylowana do objętości	10 l

Nabłonek w płynie konserwującym przewożono w pojemnikach izotermicznych do Zakładu, gdzie w temperaturze 4°C przetrzymywano go do czasu założenia hodowli.

Wirus. W doświadczeniach używano wirus pryszczycy typu O szczep Strzelewo-62 adaptowany uprzednio do hodowli na nabłonku. Miano wirusa używanego do zakażenia doświadczalnych hodowli wynosiło 10^{8,62}TCID₅₀/ml.

Namnażanie wirusa. Hodowle zakładano używając płyn odżywczy stosowany w seryjnym namnażaniu wirusa dla celów produkcyjnych. Namnażanie prowadzono w ciągu 24 godz. w temperaturze 36°C przy stałym powolnym mieszaniu i ciągłym przepływie tlenu. Do każdego namnożenia używano 1 kg nabłonka w 10 l płynu odżywczego. Hodowle zakażano dodając zawiesinę wirusa w ilości 10¹⁰TCID₅₀. Użytkane materiały wirusowe mianowano na jednowarstwowych hodowlach komórek nerki cielęcia (6). Wyniki obliczano wzorem Reeda i Muencha. Każdorazowo wykonywano również odczyn wiązania dopełniacza z wzrastającymi rozcieńczeniami antygeny. Jako wynik podawane jest najwyższe rozcieńczenie dające zahamowanie hemolizy.

Szczepionka przeciwpryszczycowa. W oparciu o materiały wirusowe otrzymane w poszczególnych namnożeniach sporządzano szczepionkę o następującym składzie:

Materiał wirusowy — nabłonek	6%
Materiał wirusowy — płyn hodowli	30%
Wodorotlenek glinu 2%-owy	30%
Glikokolowy płyn buforowy	1%
Formalina	0,08%
Gliceryna	5%
Saponina	0,1%
Fosforanowy płyn buforowy do	100%

Przy otrzymywaniu szczepionki płyn hodowli zawierający wirus mieszano z wyciągiem uzyskanym z dwukrotnej ekstrakcji nabłonka fosforanowym płynem buforowym. Zawiesinę odbiałczano chloroformem.