

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 zebranym z języków bydła rzeźnego, uzależnione są w dużej mierze od świeżości nabłonka. W nielicznych przypadkach produkcyjne namnażanie wirusa pryszczycy można prowadzić na nabłonku bezpośrednio zebranym 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. Użytkowane 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.

mem, wirowano, mieszano z wodorotlenkiem glinu i po dodaniu formaliny inaktywowano w temperaturze 26°C przez 48 godzin.

Kontrola aktywności szczepionek. Ocenę doświadczalnych szczepionek przeprowadzano na bydło używając do każdej kontroli 5 zwierząt, którym iniekowano po 5 ml badanej szczepionki. W 21 dni po szczepieniu pobierano krew dla określenia poziomu przeciwciał zobojętniających, a następnie zakażano uodpornione bydło wraz ze zwierzętami kontrolnymi przez wprowadzenie pod śluzówkę języka 10.000 ID₅₀ wirusa pryszczycy typu O.

Poziom przeciwciał badano przy pomocy odczynu seroneutralizacji z użyciem hodowli komórkowych (7). Miana surowic obliczano metodą 50% dawki zobojętniającej.

Wyniki

Przeprowadzono 9 namnożeń wirusa pryszczycy używając kolejno nabłonek przetrzymywane w płynie konserwującym przez coraz dłuższy okres czasu. Uzyskane wyniki przedstawione są w tab. 1.

Tab. 1. Wyniki namnażania wirusa i kontroli szczepionek uzyskane przy użyciu do hodowli nabłonka o różnym okresie przechowywania.

lp	Czas przechowywania nabłonka	Wyniki namnażania		Kontrola aktywności szczepionek						
		OWD	Miano w TCID ₅₀ /ml	Ilość krwi uodpornionych	Ilość krwi kontrolnych	Zmiany pryszczycowe u krwi uodpornionych			Krewy kontrolne z uogólnionym procesem chorobowym	Średnie miano przeciwciał w lg 10
						brak zmian	zmiany miejsc.	uogóln. proces chorob.		
1	2 godz.	1:5	10 ^{6,50}	5	2	5	-	-	2	1,93
2	24 godz.	1:5	10 ^{6,39}	5	2	5	-	-	2	2,09
3	2 dni	1:5	10 ^{6,17}	5	2	5	-	-	2	1,79
4	3 dni	1:4	10 ^{7,57}	5	2	5	-	-	2	1,69
5	4 dni	1:4	10 ^{7,50}	5	2	3	1	1	2	1,56
6	5 dni	1:4	10 ^{7,50}	5	2	4	-	1	2	1,25
7	8 dni	1:2	10 ^{6,38}	5	2	3	1	1	2	1,11
8	10 dni	1:1	10 ^{5,39}	5	2	-	4	1	2	1,25
9	12 dni	nieroz.	10 ^{4,00}	4	2	-	2	2	2	pon 1,00

Omówienie wyników

Analiza uzyskanych wyników wykazuje, że przy istniejących w czasie doświadczeń warunkach zbioru, transportu i przechowywania nabłonka zachowuje niezmienną przydatność do namnażania wirusa pryszczycy przez dwie doby od chwili zebrania. Świadczy o tym zarówno miano wirusa otrzymanego w pierwszych trzech namnożeniach, wynoszące powyżej 10^{8,00}TCID₅₀/ml, wyniki OWD wykazujące zahamowanie hemolizy do rozcieńczenia antygeny 1:5 oraz wysoka skuteczność szczepionek przygotowanych z tych materiałów.

W materiale wirusowym pochodzącym z hodowli prowadzonej na nabłonku 3-dniowym (hodowla Nr 4) obserwowano nieznaczny spadek zdolności wiązania dopełniacza i niewielkie obniżenie miana zjadliwości wirusa. Szczepionka przygotowana z tego materiału posiadała jednak wystarczająco wysokie właściwości uodparniające aby wg przyjętych norm oceny szczepionek przeciwpryszczycowych mogła być zakwalifikowana jako w pełni zdatna do użytku.

Z hodowli Nr 5 i 6 założonych z użyciem nabłonka 4 i 5-dniowego otrzymano materiały

porównywalne pod względem miana i zdolności wiązania dopełniacza z materiałem uzyskanym w namnożeniu Nr 4. Właściwości immunogenne tych materiałów były natomiast wyraźnie obniżone. Jak wykazała kontrola odpowiednich szczepionek, krowy uodparniane nie nabyły pełnej niewrażliwości na podśluzówkowe zakażenie zjadliwym wirusem pryszczycy. U dwu zwierząt wystąpiły objawy uogólnionego procesu chorobowego.

Namnożenia 7, 8 i 9 dały również materiały niepełnowartościowe, co ujawniły kontrole szczepionek. W materiałach tych zaznaczyło się również wyraźne obniżenie zdolności wiązania dopełniacza i nieco mniej charakterystyczne obniżenie miana zjadliwości.

Wnioski

1. W procesie namnażania wirusa pryszczycy metodą Frenkla można używać nabłonek języ-

kowy przechowywany przez 3 doby, nie obserwując obniżenia jakości szczepionki.

2. W hodowlach zakładanych z użyciem starszego nabłonka otrzymuje się materiały wirusowe dające szczepionki niepełnowartościowe.

Piśmiennictwo

1. Fogedby E. F., Johnson M. G.: Bull. Off. int. Epizoot. 37, 473, 1952.
2. Fogedby E. F.: Bull. Off. int. Epizoot. 37, 464 1952.
3. Frenkel H. S.: Am. J. vet. Res. 11, 371, 1950.
4. Frenkel H. S.: Am. J. vet. Res. 12, 187, 1951.
5. Frenkel H. S.: Bull. Off. int. Epizoot. 39, 91, 1953.
6. Kobusiewicz T., Wiśniewski J.: Medycyna Wet. 21, 16, 1965.
7. Wiśniewski J.: Medycyna Wet. 21, 471, 1965.

Adres autora: mgr inż. Stefan Szkilnik, Zduńska Wola, ul. Krótka 20.

Шкильник С., Кобусевич Т., Висьневски Е., Барановски Ч., Янковска Я. — Влияние времени хранения эпителиа языка крупного рогатого скота на иммуногенные свойства противифтозной вакцины приготовленной по методу Фенкля.

Вирус серотипа О культивировали на эпителии языка непосредственно после снятия и после 1—12 суточного хранения. Удовлетворительные результаты получали применяя эпителии хранимый максимум 3 суток. Вакцины приготовленные из вирусных материалов намнажаемых на эпителии хранимом свыше 3 суток оказались не активными.

Szkilnik S., Kobusiewicz T., Wiśniewski J., Baranowski Cz., Jankowska J. — **The influence of cattle epithelium preservation on the immunogenic properties of the vaccine prepared acc. to Frenkel's method.**

In order to explain the influence of epithelium preservation on the quality of viral materials and therefore on the immunogenic properties of the vaccine

against FMD, there was done several multiplications of FMD virus type O. For the culture there was used the epithelium directly after removing from tongues and after 1—12 days since preservation. Positive results were obtained only when the epithelium was preserved not more than 3 days. The virus multiplied in older cells did not give profitable findings.

ANDRZEJ KOMOROWSKI, JERZY ZAHACZEWSKI

Aktywność enzymatyczna lipolitycznych laseczek beztlenowych

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Krakowie

Na wytwarzanie lipazy przez beztlenowe laseczki izolowane z mączek rybnych zwrócono uwagę we wcześniejszej publikacji (13). Lipaza jest enzymem z grupy esteraz i posiada zdolność hydrolitycznego rozkładu trójglicerydów (9). Inicjująca rola lipazy w złożonym łańcuchu destrukcyjnych przemian tłuszczu zmusza do zwrócenia szczególnej uwagi na drobnoustroje będące jej źródłem, a występujące w produktach bogatych we frakcje tłuszczowe — np. w mączkach rybnych.

Lipazy zostały stwierdzone w licznych rodzajach drobnoustrojów — m. in. *Staphylococcus*, *Diplococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Enterobacteriaceae* (6, 11, 12). Alford (2, 3) zwrócił uwagę na specyfikę lipaz różnych gatunków drobnoustrojów. Najczęściej wyraża się ona zwiększoną aktywnością w stosunku do estrów określonych kwasów tłuszczowych.

Szybkość procesu lipolizy zależy od warunków fizyko-chemicznych (1, 2, 6) oraz stopnia aktywności enzymatycznej. Oznaczanie aktywności lipaz bakteryjnych można przeprowadzić badając szybkość reakcji enzymatycznej na podłożach zawierających tłuszcze lub substraty tłuszczowe — np. podłoże Willis-Hobbs (12), Alforda (4) czy Gonzalesa-Sierry (5). Inną metodą określania aktywności lipaz jest alkalimetryczne oznaczanie stężenia kwasów tłuszczowych, uwolnionych w wyniku działania enzymu na substrat tłuszczowy. Ze względu na bardzo szybkie zakwaszenie podłoża w czasie wzrostu drobnoustrojów beztlenowych, metody alkalimetryczne są w tym przypadku mało obiektywne (8).

Lipazy bakteryjne są enzymami konstytucyjnymi-encellularnymi lub adaptacyjnymi-egzocellularnymi. Posługując się metodą Sebalda i Prevot (10) z użyciem wyciągów bezbakt-

teryjnych, można ustalić lokalizację lipaz badanych drobnoustrojów.

Celem naszej pracy było określenie zdolności i czasu rozkładu preparatów Tween użytych jako substraty tłuszczowe, przez lipazy beztlenowych laseczek izolowanych z mączek rybnych oraz stwierdzenie lokalizacji tego enzymu w kulturze bakteryjnej.

Materiał i metody

Szczepy bakteryjne. Do badań użyto 12 szczepów laseczek beztlenowych o typowych właściwościach morfologicznych i biochemicznych, wyizolowanych z importowanych mączek rybnych. Sposób izolacji oraz właściwości szczepów podano w poprzedniej publikacji (13).

Podłoża bakteriologiczne. Hodowlę szczepów prowadzono na bulionie Wrzoska o pH = 7,6. Posiewy inkubowano 48 godzin w temp. 37°C. Czystość hodowli kontrolowano mikroskopowo.

Podłoża z preparatami Tween-20, 40, 60 i 80 przygotowano wg metody Sebalda i Prevot (10). Do określania aktywności lipolitycznej kultur bakteryjnych używano podłoża półpłynnych, rozlanych do probówek o wymiarach 10×120 mm. Lokalizację lipaz badano metodą dyfuzji na podłożach stałych, rozlanych na płytki Petriego o średnicy 9 cm. W agarze wycinano okrągłe baseniki o pojemności 0,06 ml. Na jednej płytce znajdowało się 6 baseników w odległości 10 mm od siebie.

Wyciągi bezkomórkowe. Uzyskiwano je przez wirowanie młodych, 48 godzinnych kultur bakteryjnych w ciągu 30 min przy szybkości 4 tys. obrotów na minutę. Jałowość supernatantów kontrolowano mikroskopowo oraz posiewając je na podłoża Willis-Hobbs.

Badanie aktywności lipolitycznej. Półpłynne podłoża z preparatami Tween regenerowano przed posiewem i po ochłodzeniu wysiewano na nie po 0,2 ml kultury bakteryjnej. Inkubację prowadzono w temp. 37°C przez okres 10 dni. Rozkład Tween-ów kontrolowano mikroskopowo, zwracając uwagę na tworzenie się kryształów soli wapniowych kwasów tłuszczowych.

Badanie lokalizacji lipaz. Do baseników nanoszono wyciągi bezkomórkowe szczepów. Płytki inkubowano w temp. 37°C przez okres 10 dni, kontrolując codziennie przebieg reakcji. Celem uniknięcia wysychania podłoża w czasie inkubacji, na wieczkach płytek umieszczano jałową, wilgotną ligninę.