

ANNA CAKAŁA, ELŻBIETA SAMOREK-DZIEKANOWSKA, PIOTR GAŹDZIŃSKI

Ocena skuteczności próbnej serii krajowej szczepionki przeciwko chorobie Mareka w warunkach terenowych

Z Zakładu Badania Chorób Drobiu Instytutu Weterynarii w Puławach

Zwalczanie choroby Mareka u kur, obok rygorystycznego stosowania odpowiednich zabiegów sanitarno-higienicznych, polega obecnie na prowadzeniu systematycznych szczepień ochronnych. Jakkolwiek zabieg ten nie chroni ptaków przed zakażeniem terenowymi szczepami wirusa choroby Mareka, to jednak zapobiega rozwojowi procesu nowotworzenia i wybuchowi choroby, a tym samym pozwala na uniknięcie poważnych strat ekonomicznych. Szczepieniu poddaje się jednodniowe pisklęta wprowadzając im żywy, niezjadliwy wirus.

Aktualnie stosowane szczepionki można podzielić na trzy grupy w zależności od wirusa użytego do ich sporządzenia:

- a. szczepionki przygotowane z atenuowanych szczepów wirusa choroby Mareka (4),
- b. szczepionki przygotowane z naturalnie apatogennego szczepu wirusa tej choroby (14),
- c. szczepionki przygotowane ze szczepów wirusa *Herpes* wyosobnionych od indyków (16), obecnie najpowszechniej stosowane w praktyce. Do ich produkcji używany jest najczęściej szczep Wittera (16) FC 126, rzadziej szczep PBI (5), oraz TK/A (15).

Stosowane są 2 rodzaje szczepionek sporządzonych w oparciu o szczep FC 126 — tzw. szczepionka płynna, przechowywana w płynnym azocie (temp. — 160°C), stanowiąca zawiesinę wirusa w postaci silnie związanej z komórką, oraz szczepionka liofilizowana, zawierająca wirus uwolniony od komórki.

W Polsce systematyczne szczepienia zapobiegawcze prowadzi się od 1972 r. Używa się do tego celu szczepionek importowanych, sporządzonych na indyckim szczepie FC 126 wirusa *Herpes*. Badania nad otrzymaniem szczepionki krajowej podjęto w 1973 r. Określono parametry pozwalające na uzyskiwanie wysokich koncentracji wirusa HVT szczepu FC 126 namrożanego w hodowli fibroblastów kurzych i kaczek (3). Kontynuację poprzednich badań stanowi przedstawiona praca, której celem było: a) sporządzenie próbnej serii szczepionki płynnej ze szczepu macierzystego FC 126 indyckiego wirusa *Herpes* oraz b) określenie nieszkodliwości i skuteczności przygotowanej szczepionki w warunkach terenowych.

Materiał i metody

Szczep szczepionkowy. Do badań użyto indyckiego szczepu szczepionkowego wirusa *Herpes*

(HVT-FC 126), wyizolowanego z komercyjnej szczepionki. TCID₅₀ szczepu wyjściowego wynosiło 0,2 ml rozcieńczenia 10^{-4,26}. TCID₅₀ szczepu macierzystego przygotowanego w hodowli fibroblastów kurzych określono na 0,2 ml rozcieńczenia 10^{-5,7}.

Hodowla fibroblastów zarodka kurzego (CEF). Pierwotne, jednowarstwowe hodowle CEF sporządzano wg metody podanej przez Calneka i wsp. (2). Jako podłoża wzrostowego używano płynu Earle'a z dodatkiem 10% surowicy cielęcej. Płyn utrzymujący różnił się od wzrostowego zmniejszoną do 2% ilością surowicy.

Płyny do hodowli. Używano płynów Earle'a i Eagle'a produkcji Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie. Stamtąd również otrzymywano surowicę cielęcą i 0,25% roztwór trypsyny.

Płyn osłaniający. Płyn osłaniający składał się z: 75% płynu Eagle'a, 15% surowicy cielęcej i 10% Dimetylosulfoxidu oraz zawierał penicylinę — 100 jedn./ml i streptomycynę — 100 mikrogr./ml.

Rozcieńczalnik szczepionki. Używano do tego celu płynu Earle.

Określanie koncentracji wirusa w szczepionce. Mianowanie wirusa przeprowadzano określając TCID₅₀. W tym celu sporządzano kolejne dziesięciokrotne rozcieńczenia szczepionki w płynie utrzymującym. Rozcieńczeniami od 10⁻¹ do 10⁻⁶ zakażano 24 godziną hodowlę CEF. Na każde rozcieńczenie wirusa przeznaczano od 4 do 6 próbek. Do każdego mianowania dołączano 5 próbek kontrolnych, niezakażonych. Hodowle inkubowano w temp. 38,5°C kontrolując pod mikroskopem pojawianie się charakterystycznego dla wirusa *Herpes* efektu cytopatycznego. Końcowy odczyt wykonywano w 5 dni po zakażeniu, w hodowlach niebarwionych. TCID₅₀ wirusa obliczano metodą Reeda i Muencha (13).

Ptaki. Doświadczenie przeprowadzono na 1000 piskląt (krzyżówka NHxSx), pochodzących od kur z fermy „Ł”, w której w poprzednich latach notowano poważne, sięgające 50—60% ptaków straty spowodowane ostrą formą choroby Mareka.

Sposób przeprowadzenia szczepienia. Szczepionkę po wyjęciu z pojemnika z ciekłym azotem umieszczano w termosie wypełnionym suchym lodem i przewożono do zakładu wylęgowego. Ampułkę ze szczepionką po wyjęciu z termosu odmrażano szybko pod bieżącą wodą i natychmiast mieszano z odpowiednią ilością rozpuszczalnika. Szczepienia wykonywano w zakładzie wylęgowym, w kilka godzin po wyjęciu piskląt z komory klujnikowej, wprowadzając ptakom po 0,2 ml szczepionki w mięśnie podudzia, przy pomocy strzykawki automatycznej.

Sposób określenia skuteczności szczepionki. Skuteczność szczepionki wyliczano wg wzoru Muelmansa i wsp. (11):

$$p = \frac{(Dc - Dv) \times 100}{Dc}$$

gdzie

p = % skuteczności badanej szczepionki,
Dc = % ptaków padłych ze zmianami makroskopowymi typowymi dla choroby Mareka w grupie kurcząt kontrolnych,

Dv = % ptaków padłych ze zmianami makroskopowymi typowymi dla choroby Mareka w grupie kurcząt szczepionych.

Przebieg doświadczeń i wyniki

Doświadczenie I.

Przygotowanie próbnej serii szczepionki płynnej. Szczepionkę przygotowywano w sposób następujący: 2 ampułki zawierające po 1,0 ml szczepu macierzystego wyjmowano z ciekłego azotu i umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze 35–37°C, w celu szybkiego odmrożenia. Materiałem tym zakażano 24 godziną hodowlę CEF (2 butle Roux). Inkubowano je 48 godz. w temperaturze 39°C, następnie trypsynowano, odwirowywano w 800 obr./min. przez 5 min., a osad zawieszano w 40 ml płynu Earla i zakażano nim nową hodowlę CEF (4 butle Roux). Po 48 godz. inkubacji zbierano materiał wirusowy, przygotowując go jak poprzednio, a uzyskany osad zawieszano w 80 ml zawieszalnika. Materiałem tym zakażano 12 butli Roux. W 72 godz. po zakażeniu, do hodowli dodawano zawiesinę świeżych, niezakażonych komórek zarodka kurzego, o gęstości $1,5 \times 10^6$ komórek/ml, w ilości 100 ml na butlę Roux i inkubowano przez dalsze 48 godz. w temperaturze 37,5°C. Wtedy komórki trypsynowano, wirowano jak poprzednio, a uzyskany osad zawieszano w 24 ml płynu osłaniającego. Zawiesinę rozlewano do ampulek w ilości po 1,0 ml. Ampułki umieszczano w pudełku ze styropianu o grubości ścian około 7 cm. Pudełko wstawiano do pojemnika z suchym lodem na okres 18 godz. Następnie ampułki przenoszono do pojemnika z ciekłym azotem.

TCID₅₀ tak uzyskanej szczepionki wynosiło 0,2 ml rozcieńczenia $10^{-6,4}$. Ilość TCID₅₀ przeliczano na liczbę jednostek lysinotwórczych (PFU) w 0,2 ml (8). Wreszcie obliczano ilość rozpuszczalnika potrzebną do rozpuszczenia szczepionki przed szczepieniem, tak aby w 1 dawce (0,2 ml) znajdowało się około 1400 PFU.

Doświadczenie II

Próba oceny skuteczności szczepionki w warunkach terenowych. Badaną szczepionkę, po rozcieńczeniu jej w sposób opisany uprzednio podano 500 pisklątom. Grupę kontrolną stanowiło 500 piskląt z tego samego wylęgu, które pozostawiono nie szczepione. Ptaki kontrolne oznakowano obcinając im 1 człon palca. Obie grupy piskląt umieszczono w doświadczalnej fermie G, we wspólnej wychowalni, w 4 przedziałach, po około 250 sztuk w każdym. Grupy ptaków szczepionych umieszczano na przemian z grupami kontrolnymi.

Ptaki żywiono mieszanką DKA-starter i finisher, a następnie mieszanką DK i DH. Dwukrotnie w czasie trwania doświadczenia ptaki szczepiono przeciwko rzekomemu pomorowi drobiu szczepionką „L”, podaną w wodzie do picia. W 5 i 12 tygodniu życia ptaki otrzymały Sulfatyf w dawce leczniczej, ponieważ w stadzie wystąpiły objawy kokcydiozy.

Co 4 tygodnie po 20 ptaków z każdej grupy ważono indywidualnie, wyliczając następnie średni ciężar ciała ptaków w danej grupie.

Okres doświadczenia trwał 22 tygodnie. Przez pierwsze 6 tygodni życia (do momentu zauważenia pierwszych objawów niedowładu kończyn) sekcje padłych ptaków wykonywano w fermie. Od 7 tygodnia wszystkie sztuki padłe przesyłano do Zakładu Badania Chorób Drobiu IWet. w Puławach, gdzie przeprowadzono dokładne badanie anatomico-patologiczne. Po ukończeniu przez ptaki 12 tygodni życia, z powodu niemożności przeniesienia ich do większych pomieszczeń, 200 ptaków grupy kontrolnej poddano ubojowi, a następnie badaniu sekcijnemu. Wszystkie ptaki, u których makroskopowo stwierdzano zmiany nowotworowe w narządach wewnętrznych, uznano za chore na chorobę Mareka. Pod koniec doświadczenia, w 23 tygodniu życia, wszystkie ptaki, zarówno grupy szczepionej jak i kontrolnej, poddano ubojowi celem wy-

konania badań sekcyjnych. Ptaki, które wykazały obecność zmian nowotworowych w narządach wewnętrznych, wliczono do grupy chorych na chorobę Mareka.

Uzyskane w doświadczeniu wyniki przedstawiono w tab. 1. Upadki kurcząt w grupie kontrolnej były znacznie wyższe niż wśród ptaków szczepionych i wynosiły odpowiednio 201 i 76 sztuk. Tylko w okresie pierwszych 6 tygodni życia w grupie kurcząt szczepionych padło o 5 ptaków więcej niż w grupie kontrolnej. W następnym okresie między 7 a 22 tygodniem życia znacznie większe upadki notowano w grupie kontrolnej (186 sztuk) niż u ptaków szczepionych (56 sztuk).

Tab. 1. Skuteczność szczepionki w próbie terenowej

Grupa ptaków	Szczepione	Kontrolne
Liczba ptaków w grupie	500	500
Liczba ptaków padłych do 6 tygodnia	20	15
Liczba ptaków padłych od 7 do 22 tygodnia	56	186
Liczba ptaków padłych z powodu choroby Mareka	3	65
% ptaków padłych z powodu choroby Mareka	0,6	13,0
% skuteczności szczepionki	95,3	

Zmiany sekcyjne charakterystyczne dla ostrej formy choroby Mareka, wśród ptaków grupy szczepionej stwierdzono tylko u 3 sztuk. Natomiast w grupie kontrolnej stwierdzano je u 65 sztuk. W badaniu sekcyjnym obserwowano zwykle nowotworowe zmiany w jajniku, wątrobie, śledzionie, rzadziej w płucach i mięśniu sercowym, sporadycznie notowano makroskopowe zmiany w nerwie kulszowym.

Tab. 2. Średnia waga kurcząt

Liczba ważonych ptaków	Wiek ptaków w tygodniach	Średnia waga kurcząt szczepionych w gramach	Średnia waga kurcząt kontrolnych w gramach
20	4	300	277
20	8	920	895
20	12	1571	1540
20	16	2560	2454
20	22	2582	2433

Oprócz znacznie mniejszych upadków w grupie ptaków szczepionych obserwowano również lepsze wyrównanie stada i wyższe średnie wagi (tab. 2). Prowadzone w odstępach miesięcznych ważenie ptaków wykazało, że już po 4 tygodniach odchowu przeciętna waga ptaków grupy szczepionej była o 23 g wyższa niż w grupie kontrolnej. Po 12 tygodniach różnica ta wynosiła 31 g, po 16 tygodniach — 106 g, a po 22 tygodniach — 149 g na korzyść grupy szczepionej.

Kokcydioza jelit cienkich, którą stwierdzano w stadzie w 5 i 12 tygodniu życia atakowała przede wszystkim ptaki grupy kontrolnej.

Wyliczona w oparciu o wzór Muelmansa (11) skuteczność szczepionki (próbnej serii) w warunkach terenowych wyniosła 95,3%.

Dyskusja

Próbną serię szczepionki własnej przygotowano w oparciu o szczep indyczy HVT FC 126, ponieważ tylko ten szczep został dopuszczony do stosowania w kraju. Metody sporządzania szczepionek stanowią zwykle tajemnicę firm produkujących je. Jakkolwiek znane są metody namnażania tego wirusa i zasady sporządzania szczepionek, to jednak niektórzy autorzy (10) uważają, że wpływ takich czynników jak koncentracja komórek użyta do założenia hodowli, dawka infekcyjna wirusa, sposób jego zbierania może być różny w różnych warunkach i dlatego powinien być ściśle określony dla możliwości lokalnych. Badaną serię szczepionki przygotowano zgodnie z wcześniej określonymi optymalnymi parametrami namnażania szczepu HVT FC 126 (3). Koncentrację wirusa w użytym preparacie można uznać za wysoką, bowiem jego miano wynosiło $10^{6,4}$ w 0,2 ml. Ogólnie przyjmuje się, że 1 dawka szczepionki powinna zawierać przynajmniej 1000 a nawet 1400 (1) jednostek lysinkotwórczych (PFU). Chociaż Purchase i wsp. (12) wykazali, że wprowadzenie pisklątom tylko 5 PFU powodowało uodpornienie 50% ptaków, to jednak w warunkach terenowych, gdzie wiele czynników może działać niszcząco na wirus lub komórkę, w której on się znajduje, dawkę tę znacznie się podwyższa. W badaniach własnych stosowano koncentrację $10^{3,7}$ TCID₅₀ w 1 dawce szczepionki. Wg Kalety i Siegmanna (8) dawka taka odpowiada 1400 PFU w 0,2 ml. Również badania przeprowadzone przez innych autorów (1) wykazały, że dla uzyskania dobrej odporności przeciwko chorobie Mareka konieczne jest podanie szczepionki posiadającej co najmniej $10^{3,5}$ TCID₅₀ wirusa HVT w 1 dawce. W badaniach własnych oparto się na wyliczeniu liczby TCID₅₀, ponieważ próby określania ilości PFU w szczepionce nie były powtarzalne.

Badania terenowe prowadzone na 1000 ptaków przez okres 22 tygodni wykazały nieszkodliwość podanej w pierwszym dniu życia ptaków szczepionki. Z pewnością badanie nieszkodliwości preparatu należałoby przedłużyć i na okres produkcyjny kur, niestety warunki fermy, w której prowadzono doświadczenie na to nie pozwalały. Jednakże w dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych mówiących o szkodliwym wpływie stosowania szczepionek przeciwko chorobie Mareka zarówno w okresie odchowu jak i produkcji. Przeciwnie, zgodnie podkreśla się zmniejszenie liczby upadków u ptaków szczepionych na skutek innych niż choroba Mareka przyczyn, jak również wyższą

liczbę znoszonych przez nie jaj. Wyniki omawianego doświadczenia zdają się to potwierdzać. W grupie kurcząt szczepionych ogólna liczba upadków była znacznie mniejsza (76 ptaków) niż w grupie kontrolnej (210 ptaków). Kokcydioza jelit cienkich, która była głównym powodem zwiększonych upadków, atakowała przede wszystkim kurczęta grupy kontrolnej. Podobne spostrzeżenie obok innych autorów poczynili również Karczewski i Cąkała (9), prowadząc badania nad skutecznością importowanej szczepionki przeciwko chorobie Mareka. Oprócz mniejszej zapadalności na kokcydiozę wśród ptaków grupy szczepionej, stwierdzono również lepsze ich przyrastanie. Wyższe wagi średnio o 100 g w 16 tygodniu życia i o 150 g w 22 tygodniu w porównaniu z grupą kontrolną można chyba łączyć właśnie z rzadszym występowaniem i lżejszym przebiegiem kokcydiozy w grupie ptaków szczepionych.

Skuteczność szczepionki określona w omawianym doświadczeniu na 95,3% wydaje się bardzo wysoka. Wiadomo, że szczepionki przeciwko chorobie Mareka nie powodują uodpornienia 100% szczepionych ptaków. Przyjmuje się zwykle, że skuteczność szczepionki wynosząca ponad 85%, tzn. powodująca uodpornienie przynajmniej 85% ptaków w stadzie oceniana jako dobra. Podobne badania (9) w warunkach krajowych płynnej szczepionki importowanej wykazały, że jej skuteczność wynosiła 91,4%. Wydaje się zatem, że przygotowany wg opracowanej przez autorów metody preparat mógłby w przyszłości zastąpić szczepionki importowane.

Wnioski

1. Przygotowana w oparciu o wcześniejsze badania metodyczne próbna seria szczepionki posiadała wysoką koncentrację wirusa ($10^{6,4}$ TCID₅₀ w 0,2 ml).
2. Szczepionka podana domięśniowo w dawce $10^{3,7}$ TCID₅₀ w 0,2 ml zabezpieczyła ptaki w 95,3% przed wystąpieniem ostrej formy choroby Mareka w okresie 22 tygodni doświadczenia.
3. U szczepionych ptaków stwierdzono znacznie mniejsze upadki na skutek innych przyczyn niż choroba Mareka (np. kokcydioza).
4. Średnia waga ptaków szczepionych była w 22 tygodniu życia o 150 g wyższa niż u ptaków kontrolnych.

Piśmiennictwo

1. Bengelsdorff H., Bernhardt D.: Wien. tierärztl. Mschr. 60, 254, 1973.
2. Calnek B., Garrido C., Okazaki W., Patrascu I.: Avian Dis. 16, 52, 1972.
3. Cąkała A., Samorek-Dziekanowska E.: Pol. Arch. wet. (w druku).
4. Churchill A., Payne L., Chubb R.: Nature, Lond. 221, 844, 1969.
5. Churchill A., Baxendale W., Carrington G.: Vet. Rec. 92, 327, 1973.
6. Churchill A., Baxendale W.: Wien. tierärztl. Mschr. 60, 248, 1973.
7. Garrido C.: Avian Dis. 16, 1087, 1972.

8. Kaleta E., Slegmann O.: Dtsch. tierärztl. Wschr. 79, 428, 1972.
9. Karczewski W., Cakała A.: Mat. z Sympozjum na temat choroby Mareka, Jabionna, 1972.
10. Lee L.: Avian Dis. 15, 565, 1971.
11. Muelmanns G., Halen P., Schyns P., Bruynooghe D.: Vet. Rec. 89, 326, 1971.
12. Purchase H., Okazaki W., Burmester B.: Avian Dis. 16, 57, 1972.
13. Reed L., Muench H.: Am. J. Hyg. 27, 493, 1938.
14. Rispen B., Van Vloten J., Mastendroeck N., Maas H.: Avian Dis 16, 108, 1972.
15. Willemart J.: Recl. Méd. vét. 148, 203, 1972.
16. Witter R., Nazerian K., Purchase H.: Am. J. vet. Res. 31, 525, 1970.
17. Woernle H.: Dtsch. Geflügelwirtsch. 24, 842, 1972.

Adres autora: doc. dr hab. Anna Cakała, ul. 22 Lipca 3/7, 24-100 Puławy.

Цонкала А., Саморэк-Дзекановска Э., Газьдински П. — Оценка эффективности опытной серии вакцины против болезни Марэка отечественного производства в местных условиях.

Приготовили опытную серию жидкой вакцины против болезни Марэка с применением вируса индюшечьего штамма Herpes FC 126. Вирус размножали на культуре фибробластов куриных эмбрионов. Титр TCID₅₀ вакцины равнялся 10^{8,4} в 0,2 мл. Эффективность препарата проверяли в производственных условиях на 500 привитых цыплятах и 500 контрольных невакцинированных.

Однодневным цыплятам вводили внутримышечно по 1400 PFU вакцины. Во время 22 недель наблюдений вакцина хранила привитые цыплята от падежа по причине болезни Марэка в 95,3%. Также общий падеж в группе вакцинированных цыплят был меньше (13,2%) чем в контрольной группе (40%). Под конец опыта вес привитых цыплят был в среднем на 150 г. выше чем контрольных цыплят.

Cakała A., Samorek-Dzieskanowska E., Gaździński P. — Evaluation of the efficacy of a tentative series of Polish vaccine against Marek's disease under field conditions.

A tentative series of Marek's disease vaccine was produced with the turkey strain of FC 126 Herpesvirus, multiplied on the cell culture of chicken fibroblasts. TCID₅₀ of the vaccine was 10^{8.4} per 1 ml. The efficacy of the vaccine was checked on 500 vaccinated and 500 control chickens one day old under field conditions. The dose of the vaccine applied i.m. contained 1400 pfu. In the period of 22 weeks of the experiment 95.3% of the vaccinated birds were protected. The whole number of death in vaccinated animals was also lower (13.2%) than that in control animals (40.0%). At the end of the experiment the weight of vaccinated chickens was about 150 g higher than that in non-vaccinated animals.

ZENON MINTA, WOJCIECH KARCZEWSKI

Porównanie niektórych właściwości wirusa ND (szczep LaSota) w szczepionkach różnego pochodzenia

Z Zakładu Badania Chorób Drobiu Instytutu Weterynarii w Puławach

Szczep LaSota wirusa rzekomego pomoru drobiu (ND) zastosowano po raz pierwszy do uodparniania ptaków przeciwko temu schorzeniu w USA w 1952 r. Obecnie szczepionki produkowane z tego szczepu stosowane są w wielu krajach. W 1962 r. szczep ten został wprowadzony do produkcji szczepionki „L” w naszym kraju. Od tego czasu wyprodukowano około 600 serii preparatu. Jego masowe zastosowanie szczególnie u młodych kurcząt, umożliwiło zabezpieczenie szczepionych ptaków przed ND (11), a wyniki dalszych badań nad poprawą programów szczepień (6) doprowadziły do prawie zupełnej likwidacji ND w kraju.

Do produkcji poszczególnych serii szczepionki używa się szczepu macierzystego. Ten ostatni pasażują się tylko raz na 1—2 lata, aby uniknąć ewentualnych zmian jego immunogenności. Od chwili wprowadzenia szczepionki w naszym kraju wykonano 10 pasaży szczepu macierzystego. Mimo tak małej liczby pasaży nie można wykluczyć, że po kilkunastu latach szczep ten

mógł ulec pewnym zmianom. Niektórzy badacze (7) zwracają uwagę, że obecnie ptaki po szczepieniu nie uzyskują już tak wysokich mian HI jak to miało miejsce w początkach stosowania szczepionki „L”. Ponieważ wyjściowe pasaży produkowanego u nas szczepu macierzystego LaSota są już niedostępne, wydało się celowe porównanie niektórych parametrów ostatnich pasaży szczepu LaSota produkcji krajowej ze szczepami używanymi w innych krajach.

Materiał i metody

Szczep LaSota wirusa ND. Do badań użyto:
a) laboratoryjny szczep LaSota wirusa ND w postaci zliofilizowanego płynu owodniowo-omocznioowego zakażonych zarodków kurzych. Koncentracja wirusa wynosiła 10^{7,3} EID₅₀ w 1 ml,

b) szczepionka „L” seria 280474 produkcji Puławskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego (preparat LP),

c) szczepionka pochodzenia zagranicznego, którą oznaczono jako preparat LR,

d) dwie szczepionki pochodzenia zagranicznego. Ponieważ szczepionki te uzyskano jedynie w ilości po