

# CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

STANISŁAWA WOYCIECHOWSKA, JERZY KITA, TADEUSZ FRYMUS,  
JERZY GÓRSKI, TOMASZ MICHALAK, ANNA CHMIELEWSKA

## Szczepionka przeciwko rhinopneumonitis equorum – badania nieszkodliwości i immunogenności dla źrebnych klaczy

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie

Wirusowe ronienie klaczy (*rhinopneumonitis equorum*) jest w wielu krajach przyczyną dotkliwych strat w hodowli koni. Choroba ta występuje również w Polsce — przypisuje się jej około 25% ogółu poronień klaczy (25). Zakażeniem herpes wirusami u człowieka i u różnych gatunków zwierząt trudno skutecznie zapobiegać przy pomocy immunoprofilaktyki, gdyż nawet naturalna infekcja zazwyczaj daje niezbyt długą odporność. Również i u koni przechorowanie *rhinopneumonitis equorum* pozostawia jedynie przejściową i zmienną odporność (8, 9, 10). Ponieważ odporność poszczepienna jest jedynie odpowiednikiem odporności naturalnej trudno się spodziewać, by szczepienia były w stanie całkowicie rozwiązać problem choroby w hodowlach koni. W wielu krajach podejmuje się jednak próby zmniejszenia strat przez profilaktyczne szczepienia źrebnych klaczy. Ostatnio najczęściej używa się w tym celu żywych, osłabionych szczepów wirusa (11, 15, 17, 20), choć nie zaprzestano doświadczeń ze szczepionkami zawierającymi zarazek inaktywowany (5, 16), a nawet prób łączenia obu rodzajów szczepionek (14). Skuteczność tych szczepień często jest trudna do jednoznacznej oceny (2, 3), bądź nawet bywa czasem przez autorów określana jako niezadowolająca (11, 17).

Mając na celu ograniczenie poronień u klaczy podjęto próbę opracowania atenuowanej szczepionki przeciw *rhinopneumonitis equorum* w oparciu o wyizolowany w Polsce szczep wirusa i sprawdzenia jej immunogenności dla klaczy.

### Materiały i metody

#### 1. Przygotowanie szczepionki.

Do produkcji szczepionki użyto szczepu RAC-H wirusa *rhinopneumonitis equorum* zaadaptowanego do chomików syryjskich (24). Szczep ten był następnie atenuowany w stałej linii komórek nerki świni IBRS-2. Środowiskiem wzrostowym był płyn Eaglea (MEM) z dodatkiem 5–10% surowicy cielęcej oraz antybiotyków (penicylina i streptomycyna). Płynem utrzymującym był płyn Eaglea z antybiotykami. Pasaż 156 wirusa namnożono w ilości około 2 l. Stanowiło to pulę wirusa do produkcji nieliofilizowanej i liofilizowanej szczepionki.

Szczepionkę nieliofilizowaną stanowił płyn zebrany z nad zakażonej hodowli komórek IBRS-2, w którym miano wirusa wynosiło do  $10^{5,0}$  TCID<sub>50</sub>.

Szczepionka liofilizowana zawierała w jednej fiolece 4 ml płynu z nad zakażonej hodowli komórkowej oraz 2,4 ml zawieszalnika (odtłuszczone mleko i sacharoza) z antybiotykami. Każda seria była badana według ogólnie przyjętych zasad (badanie bakteriologiczne, badanie na nieszkodliwość na zwierzętach

laboratoryjnych oraz badanie na aktywność wirusa). Liofilizat rozcieńczano 4 ml rozpuszczalnika.

#### 2. Badanie atenuacji szczepu.

Stopień atenuacji szczepu określano w próbie biologicznej na 43 chomikach syryjskich, zakażając je dootrzewnowo dawką wirusa wielokrotnie przekraczającą dawkę śmiertelną nieatenuowanego wirusa RAC-H. Chomiki były obserwowane przez 3 miesiące od zakażenia, następnie co 2 tygodnie usypiane i badane histopatologicznie w kierunku zmian cytopatycznych w wątrobie.

3. Badanie nieszkodliwości i immunogenności szczepionki dla koni oraz siewstwa wirusa szczepionkowego.

Badania te wykonano w gospodarstwie „G” na 22 klaczach podzielonych losowo na 4 grupy:

grupa I — obejmowała 10 klaczy kontrolnych (5 źrebnych i 5 jałowych),

grupa II — obejmowała 4 źrebne klacze szczepione dwukrotnie nieliofilizowaną szczepionką (po 10 ml),

grupa III — obejmowała 4 źrebne klacze szczepione dwukrotnie dwiema ampułkami liofilizowanej szczepionki (8 ml), której miano wynosiło  $10^5$  TCID<sub>50</sub>,

grupa IV — obejmowała 4 źrebne klacze szczepione dwukrotnie 6 ampułkami szczepionki liofilizowanej (24 ml) o mianie  $10^5$  TCID<sub>50</sub>.

Wszystkie klacze przebywały przez cały czas trwania doświadczenia we wspólnej stajni, były razem wypuszczane na padoki, istniały więc między nimi ścisłe kontakty bezpośrednie i pośrednie.

Przed pierwszym szczepieniem, dwa tygodnie po każdym szczepieniu oraz 8 miesięcy po drugim szczepieniu od klaczy pobierano krew i surowicę badano w odczynie seroneutralizacji w hodowli komórek IBRS-2 używając atenuowanego szczepu RAC-H.

4. Badanie szczepionki w mikroskopie elektronowym.

Kroplę płynu zawierającego cząstki wirusa zagęszczone przez wirowanie przy szybkości 22 000 g przez 60 min., kładziono na miedziane siatki 100-meszone, pokryte błoną formwarową, napyłoną węglem. Po 1 minucie siatki płukano przez trzykrotne zanurzenie w każdym z 3 szklanych naczynek, wypełnionych wodą bidestylowaną. Po odciągnięciu wody bibułą filtracyjną siatki barwiono negatywowo 1% wodnym roztworem soli sodowej kwasu fosforowolframowego (PTA), o pH 7,0 przez 45 sek. w komorze wilgotnej. Siatki osuszano bibułą filtracyjną i natychmiast oglądano w mikroskopie elektronowym JEM 6C lub JEM 100B. Zdjęcia wykonano na szklanych płytkach EU 2 firmy ORWO przy powiększeniach 17 000–100 000X.

### Wyniki i omówienie

#### Stopień atenuacji szczepu

Wszystkie chomiki zakażone atenuowanym szczepem wirusa przeżyły trzy miesiące nie wykazując żadnych objawów chorobowych, po czym zostały zabite. W ich wątrobach nie

stwierdzono zmian świadczących o zakażeniu wirusowym. Chomiki zakażone nieatenuowanym szczepem RAC-H padały w ciągu 3 dni, a w ich wątrobach stwierdzono wewnątrzjądrowe ciała wtretowe.

U żadnej ze szczepionych klaczy nie zaobserwowano jakichkolwiek reakcji miejscowych i ogólnych tak po pierwszym, jak i po drugim szczepieniu. Wszystkie ciężarne klacze wyzrebiły się w terminie. Jedynie jedno źrebię (od klaczy z III grupy) było słabe i padło po kilku dniach z objawami bakteryjnego zapalenia płuc i opłucnej. Badania pośmiertne nie wykazały zmian histopatologicznych, które mogłyby przemawiać za pierwotnym zakażeniem wirusem *rhinopneumonitis equorum*.

#### Immunogenność dla koni

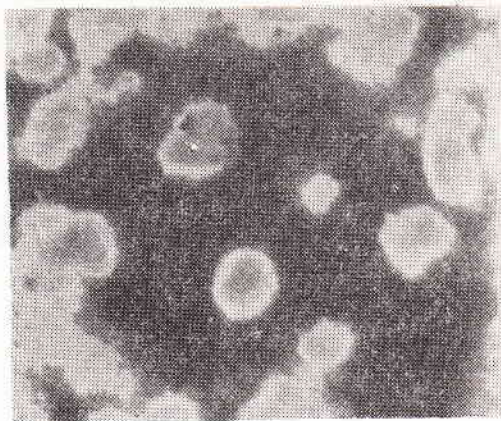
Miana przeciwciał w surowicach pobranych przed szczepieniami, jak i w różnych okresach po szczepieniach przedstawia tab. 1.

Kontakt zwierząt szczepionych i nieszczepionych

U żadnej z klaczy kontrolnych, przebywających razem z końmi szczepionymi, nie stwierdzono pojawienia się w surowicy przeciwciał przeciw wirusowi *rhinopneumonitis equorum* (tab. 1).

Badanie szczepionki w mikroskopie elektronowym

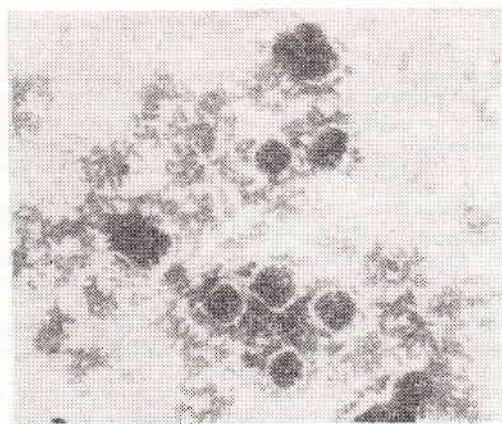
W preparatach wykonanych ze szczepionki nieliofilizowanej przeciwko wirusowemu ronieniu klaczy oraz ze szczepu liofilizowanego bez zawieszalników, z którego tę szczepionkę przygotowano, napotkano liczne cząstki wirusowe o kształtach zbliżonych do form kulistych i wymiarach wahających się od 2284 Å do 2850 Å. Wszystkie one charakteryzowały się obecnością otoczki elektronowo mniej gęstej, niż część rdzenia wirusa (ryc. 1, 2).



Ryc. 1. Cząstki wirusa w barwionym negatywno w preparacie przygotowanym z płynnej szczepionki przeciwko wirusowemu ronieniu klaczy (Pow. 20 000X)

W preparatach przygotowanych z liofilizowanej szczepionki Equivac RP zidentyfikowano liczne cząstki wirusowe, z których część miała kształt i wymiary identyczne z cząsteczkami napotkanymi w poprzednich preparatach (ryc. 3A). Znaczna część cząstek wykazywała cechy uszkodzenia, polegające na zniszczeniu otoczki i częściowym rozpadzie części rdzennej (ryc. 3B). Napotkano również liczne agregaty cząstek wirusowych o zróżnicowanej wielkości i kształcie (ryc. 3C). Wokół większości cząstek stwierdzono dodatkowo odcinkowe lub pierścieniowe przejaśnienia, których nie napotkano wokół cząstek wirusowych w preparatach przygotowanych z innego materiału niż liofilizowana szczepionka Equivac RP.

Szczepionka Equivac RP, zarówno w postaci liofilizowanej, jak i nieliofilizowanej okazała się w pełni bezpieczna dla źrebnych klaczy. Można ją stosować nawet w końcowych miesiącach ciąży bez ryzyka spowodowania poronienia. Obserwacja ta jest o tyle cenna, że przy tzw. szczepieniach interwencyjnych, gdy w stadzie źrebnych klaczy pojawiają się ronienia spowodowane wirusem *rhinopneumonitis equorum*, niejednokrotnie zachodzi konieczność szczepienia klaczy w bardzo zaawansowanej ciąży. Obserwacje poczynione w jednej ze stadnin wykazały, że nieliofilizowana szczepionka Equivac RP była doskonale tolerowana również przez klacze będące w dziewiątym miesiącu ciąży. Szczepionka okazała się także w pełni nieszkodliwa dla nieszczepionych koni, w tym również źrebnych klaczy, przebywających razem z końmi szczepionymi. Jak wynika z tab. 1 u klaczy kontrolnych, mimo ścisłych kontaktów z końmi szczepionymi, nie dochodziło do wytwarzania przeciwciał przeciwko wirusowi *rhinopneumonitis equorum*. A zatem wirus szczepionkowy nie przenosił się z koni szczepionych na nieszczepione. Jest to niewątpliwie zaletą preparatu, gdyż możliwość pasażu atenuowanego szczepu na gospodarzu homologicznym może prowadzić do odzyskania patogennych cech wirusa.



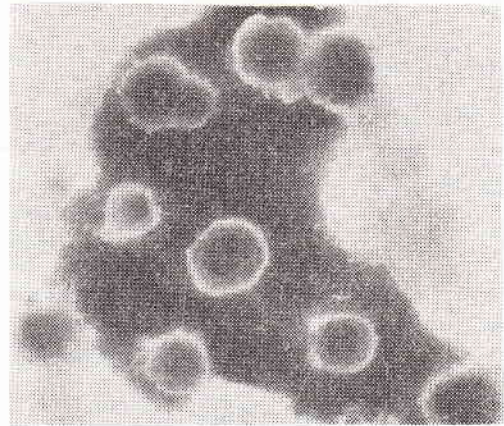
Ryc. 2. Szczep terenowy wirusa ronienia klaczy, z którego przygotowano szczepionkę. Barwienie negatywne. (Pow. 19 000X)

Immunogenność szczepionki była różna w zależności od jej formy: liofilizowanej i nie-liofilizowanej (tab. 1). Klacze szczepione nie-liofilizowaną szczepionką reagowały silniejszą i dłużej trwającą odpowiedzią serologiczną. Na częściowe wytłumaczenie tego spostrzeżenia pozwoliły badania w mikroskopie elektronowym. Ujawniły one w liofilizowanym preparacie agregaty cząstek wirusowych oraz przejaśnienia wokół nich, będące najprawdopodobniej wynikiem opłaszczenia wirionów przez substancje stabilizujące. Ponadto w znacznej części cząstek wirusowych stwierdzono rozpad części rdzennej oraz zniszczenie otoczki. Jak wykazało uodpornienie chomików podjednostkami wirusa *rhinopneumonitis equorum* właśnie otoczka wirusa jest odpowiedzialna za stymulowanie odporności i jedynie te chomiki przeżywały challenge, które były uodpornione frakcją zawierającą materiał otoczki (18).

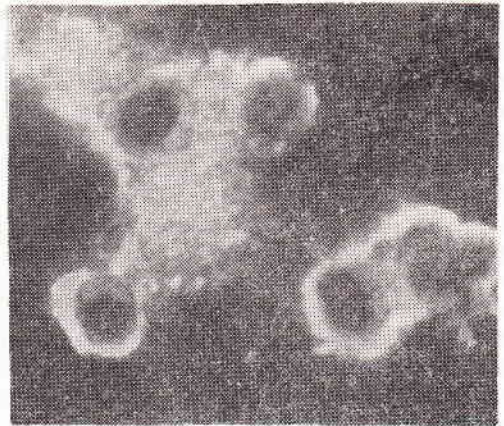
Mleko i sacharoza są zawieszalnikiem powszechnie stosowanymi przy liofilizacji wielu szczepionek, w tym również preparatów zawierających wirusy z grupy *Herpesvirus*. Proces liofilizacji zawsze wywiera pewien ujemny wpływ na zarazek zawarty w szczepionce, czego wyrazem jest zwykle w takich okolicznościach obniżenie miana wirusa. Nieoczekiwane jednak było tak znaczne uszkodzenie cząstek wirusowych, ujawnione przez nas w liofilizowanym preparacie. Jak się wydaje czynnikiem wywołującym te uszkodzenia był nie tyle sam proces liofilizacji, co poprzedzające go kilkakrotne zamrażanie i odmrażanie szczepionki, wynikające z kompletowania jej puli, mianowania i transportu. Wirus *rhinopneumonitis equorum* jest bardzo wrażliwy na zmiany temperatury otoczenia, zwłaszcza na przekroczenie punktu topnienia lodu (19). Można więc przypuszczać, że zmniejszenie liczby zamrożeń przed liofilizacją pozwoli podnieść wartość immunogenną zliofilizowanego preparatu. Badania w tym kierunku są w toku i pierwsze wyniki zdają się potwierdzać to przypuszczenie.

Odpowiedź serologiczna klaczy szczepionych nieliofilizowaną szczepionką była stosunkowo silna i długotrwała (tab. 1). Rodzi się pytanie w jakim stopniu odzwierciedla ona rzeczywistość niewrażliwość zwierząt na zakażenie. Wiadomo bowiem, że przy infekcjach wywołanych wirusami z grupy *Herpesvirus*, takich, jak na przykład choroba Aujeszky'ego, czy też zakaźne zapalenie jamy nosowej i tchawicy bydła (IBR), poziom przeciwciał nie zawsze koreluje z odpornością (1, 22, 26). Również i u chomików uodpornionych inaktywowanym wirusem *rhinopneumonitis equorum* nie udało się wykazać korelacji pomiędzy poziomem przeciwciał a niewrażliwością na doświadczalne zakażenie (21). Podobnie u klaczy posiadających we krwi nawet wysoki poziom przeciwciał neutralizujących, po zakażeniu zjadliwym wirusem *rhinopneumonitis equorum* może dojść do wirerii

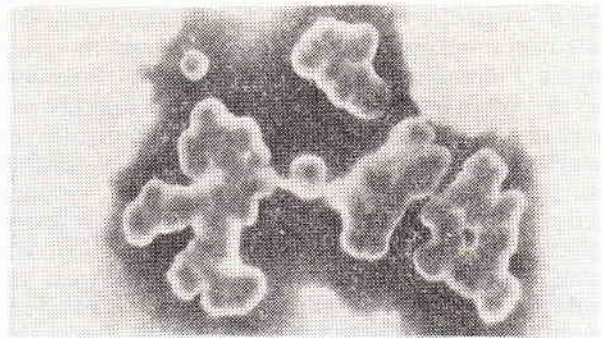
i do infekcji płodu, kończącej się poronieniem (10). Przeciwciała w surowicy nie są bowiem jedyną obroną organizmu konia przed tym wirusem. Obserwacje własne (12) oraz innych autorów (13, 23) wskazują na udział odporności komórkowej w zwalczaniu tego zakażenia. Niewątpliwą rolę odgrywa też miejscowa oporność błon śluzowych dróg oddechowych, przez które



Ryc. 3. Cząstki wirusa ronicenia klaczy w barwionych negatywowo preparatach przygotowanych z liofilizowanej szczepionki EQUIVAC RP. Wokół większości cząstek występują dodatkowe, odcinkowe lub pierścieniowe przejaśnienia  
3A — cząstki nieuszkodzone (Pow. 20 000×)



3B — cząstki z częściowo rozpadłą otoczką i częścią rdzenną (Pow. 20 000×)



3C — agregaty cząstek (Pow. 19 000×)

Tab. 1. Miana przeciwciał neutralizujących w surowicach klaczy szczepionych i kontrolnych

Nr klaczy	Miesiąc ciąży przy I szczep.	Dawka i rodzaj szczepionki	Miano przeciwciał			
			przed I szczep.	14 dni po I szczep.	14 dni po II szczep.	8 mies. po II szczep.
1	V	klacze nieszczepione	< 1/4	< 1/4	< 1/4	< 1/4
2	VI		< 1/4	< 1/4	< 1/4	< 1/4
3	VII		< 1/4	< 1/4	< 1/4	< 1/4
4	VIII		< 1/4	< 1/4	< 1/4	< 1/4
5	VIII		< 1/4	< 1/4	< 1/4	< 1/4
6	jałowa		< 1/4	< 1/4	< 1/4	< 1/4
7	jałowa		< 1/4	< 1/4	< 1/4	< 1/4
8	jałowa		< 1/4	< 1/4	< 1/4	< 1/4
9	jałowa		< 1/4	< 1/4	< 1/4	< 1/4
10	jałowa		< 1/4	< 1/4	< 1/4	< 1/4
11	V	2×10 ml szczepionki nie-liofilizowanej	< 1/4	1/512	1/512	< 1/4
12	VII		< 1/4	1/128	1/512	1/16
13	V		< 1/4	1/512	1/512	1/256
14	VI		< 1/4	1/380	1/512	1/256
15	VI	2×8 ml szczepionki liofilizowanej	< 1/4	1/8	1/32	1/4
16	IX		< 1/8	1/32	1/32	< 1/4
17	V		< 1/4	1/5	< 1/4	< 1/4
18	V		< 1/4	1/8	1/32	< 1/4
19	V	2×24 ml szczepionki liofilizowanej	< 1/4	1/32	1/32	< 1/4
20	VII		< 1/4	1/8	1/5	< 1/4
21	VI		< 1/4	1/8	1/256	< 1/4
22	V		< 1/4	1/4	< 1/4	< 1/4

najczęściej wnika zarazek (4). Ostatnio podkreśla się też rolę makrofagów w obronie organizmu przed tym wirusem (7). Stan niewrażliwości klaczy na zakażenie jest więc najprawdopodobniej wynikiem współdziałania wielu różnych mechanizmów immunologicznych. Do dziś nie udało się znaleźć wykładnika *in vitro*, korelującego w pełni ze stanem odporności konia na *rhinopneumonitis equorum*. Wyniki prób zmierzających do znalezienia takiego wykładnika wykazują duże rozbieżności. Bryans (5) twierdzi, że miano przeciwciał seroneutralizujących 1:80 zabezpiecza klacz przed poronieniem, podczas gdy Burrows i wsp. (6) podają za wystarczające miano 1:25.

W praktyce jedynymi metodami odzwierciedlającymi wartość szczepionki przeciwko *rhinopneumonitis equorum* są zatem badania *in vivo* — próba challenge'u lub długotrwała obserwacja epizootologiczna. Challenge na źrebnych klaczach jest doświadczeniem kosztownym, wymagającym specjalnych izolatorów i wreszcie przebiegającym w nienaturalnych warunkach, przez co jego wyniki nie zawsze dają się jednoznacznie ocenić. W tej sytuacji jedyną dostępną drogą oceny skuteczności szczepionki są wieloletnie epizootologiczne obserwacje efektów jej stosowania w ogniskach zakażenia. Obserwacje takie są przez nas od pewnego czasu prowadzone, a ich wyniki będą stanowiły przedmiot odrębnego opracowania.

## Piśmiennictwo

- Bartha A.: Magy. Allatorv. Lap. 17, 321, 1962.
- Beckenhauer W. H., Bass E. P.: J. Am. med. Ass. 163, 1182, 1973.
- von Bente Ch., Petzoldt K.: Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 90, 176, 1977.
- Bryans J. T.: J. Am. vet. med. Ass. 155, 294, 1969.
- Bryans J. T.: Equine Infectious Diseases. IV. Vet. Publ. Inc., Princeton 1978.
- Burrows R., Goodridge D. w: Bryans J. T., Gerber H.: Equine Infectious Diseases. III, Karger 1973.
- Darlington R. W. w: Bryans J. T., Gerber H.: Equine Infectious Diseases. IV, Vet. Publ. Inc., Princeton 1978.
- Dott E. R., Crowe M. E. W., Bryans J. T., McCollum W. H.: Cornell Vet. 43, 387, 1953.
- Dott E. R., Bryans J. T.: Cornell Vet. 53, 24, 1963.
- Dott E. R., Bryans J. T.: Cornell Vet. 53, 249, 1963.
- Dutta S. K., Shipley W. D.: Am. J. vet. Res. 36, 445, 1975.
- Frymus T., Woyciechowska St., Schollenberger A., Poliwocia A.: Zentbl. VetMed. B. 25, 431, 1978.
- Gerber J. D., Marion A. E., Bass E. P., Beckenhauer W. H.: Can. J. comp. Med. 41, 471, 1977.
- Kawakami Y., Shimizu T. w: Bryans J. T., Gerber H.: Equine Infectious Diseases. IV, Vet. Publ. Inc., Princeton 1978.
- Mayr A., Pette J., Petzoldt K., Wagener K.: Zentbl. VetMed. B 15, 406, 1968.
- Mayr A., Thein P., Scheid R. w: Bryans J. T., Gerber H.: Equine Infectious Diseases. IV, Vet. Publ. Inc., Princeton 1978.
- Mitchell D., Papp-Vid G., Girard A. w: Bryans J. T., Gerber H.: Equine Infectious Diseases. IV, Vet. Publ. Inc., Princeton 1978.
- Papp-Vid G., Derbyshire J. B.: Can. J. comp. Med. 42, 219, 1978.
- Petzoldt K.: Equine Herpesvirusinfektionen. VEB G. Fischer Verlag, Jena 1974.
- Purdy C. W., Ford J. S., Porter R. C.: Am. J. vet. Res. 39, 377, 1978.
- Scheid R.: Untersuchungen zur Inaktivierung des Rhinopneumonitisvirus bei Erhalt der immunisierenden Eigenschaften. Praca dokt., München 1975.
- Skoda R., Wittmann G.: Zentbl. VetMed. B. 20, 127, 1973.
- Wilks C. R., Coggins L.: Am. J. vet. Res. 38, 117, 1977.
- Woyciechowska St.: Med. dośw. 12, 255, 1960.
- Woyciechowska St., Kita J., Frymus T.: Medycyna Wet. (w druku).
- Zuscheck F., Chow T. E.: J. Am. vet. med. Ass. 139, 236, 1961.

Adres autora: prof. dr hab. S. Woyciechowska, ul. Bruna 10 m. 30, 02-594 Warszawa.

Войцеховская С., Кита Е., Фрымус Т., Гурский Е., Михалек Т., Хмелевская А. — **Вакцина против rhinopneumonitis equorum** — исследования безвредности и иммуногенности для жеребных кобыл.

Woyciechowska S., Kita J., Frymus T., Górski J., Michalak T., Chmielewska A. — **Vaccine against rhinopneumonitis equorum—appraisal of harmlessness and immunogenicity for mares in foals.**

Опираясь на аттенуированный штамм RAC-H вируса rhinopneumonitis equorum, разработали вакцину против вирусных абортов кобыл. Степень аттенуирования штамма исследовали на сирийских хомяках, а затем на 12 жеребных кобылах, 4 из которых получили двукратно внутримышечно нелиофилизованную вакцину, а 8 кобыл — лиофилизированный препарат. Вакцина оказалась безвредной для жеребных кобыл. Вирус не переносился с вакцинированных на невакцинированных лошадей. Все вакцинированные кобылы среагировали образованием серонейтрализующих противотел, причем эти противотела достигали значительно высшего уровня и удерживались дольше у кобыл, иммунизированных нелиофилизованной вакциной. Более слабую иммуногенность лиофилизованного препарата старались выяснить, исследуя обе формы вакцины в электронной микроскоп.

The vaccine based on the viral strain RAC-H of rhinopneumonitis equorum has been elaborated. The degree of attenuation of the strain was assessed on hamsters and then on 12 mares in foals: four animals were given the vaccine twice intramuscularly and eight horses received the same vaccine in the form of lyophilized preparation. The vaccine proved to be harmless for mares in foals. The virus was not transmitted from vaccinated to unvaccinated horses. All the mares vaccinated responded producing seroneutralizing antibodies, however the levels of antibodies were higher in animals vaccinated with the non-lyophilized vaccine. The authors tried to explain this fact examining the both preparations under an electron microscope.

JANINA OYRZANOWSKA-POPLEWSKA, JERZY KITA, JAN PRANDOTA

## Ocena właściwości biologicznych krajowych szczepów wirusa IBR z ukierunkowaniem wykorzystania ich w profilaktyce swoistej

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie

Badania zmierzały do oceny przydatności izolowanych terenowych szczepów wirusa zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy bydła (IBR) do badań nad profilaktyką zakażeń tym wirusem. Badania przeprowadzono w dwóch etapach.

Etap pierwszy obejmował próby atenuacji krajowych szczepów wirusa IBR do hodowli komórek nerki zarodka bydła (HKNZB) oraz adaptacji do heterologicznej hodowli komórek nerki królika — żywiciela niewrażliwego. Kryterium doboru najodpowiedniejszego spośród izolowanych szczepów wirusa IBR w zakresie wymogów profilaktyki swoistej stanowił czas pojawiania się 50% efektu cytopatycznego oraz wysokość miana TCID<sub>50</sub>. Dla uzyskania do dalszych badań genetycznie jednolitego materiału, ze szczepem, który najintensywniej replikował się w HKNZB wykonano selekcję klonalną metodą lysinek.

W drugim etapie badań dla charakterystyki biologicznej i oceny stopnia atenuacji prześlędzono zachowanie się badanego szczepu (B-184) na poziomie 8 i 43 pasaży w HKNZB pod wpływem Dithiothreitolu (DTT).

Jedną z cech biologicznych, charakteryzujących mutanty niepatogenne jest oporność na inaktywację Dithiothreiolem. Związki między opornością na redukcję DTT a właściwościami apatogennymi niektórych mutantów wirusów wykazali między innymi Gainer i wsp. (2) dla wirusa choroby Aujeszky'ego, Carner i wsp. (1) dla *Poxvirus vaccinia* i *Paramyxovirus*

Hare (3) dla *Papavavirus polyoma*, a Klingeborn i Dinter (5) dla wirusa zakaźnego ronienia klaczy.

Zastosowanie szeregu metod pozwalających na określenie cech genetycznych (markerów) szczepów wirusowych daje często możliwość odróżniania *in vitro* szczepów zjadliwych od szczepów atenuowanych. Szczepowe właściwości biologiczne mają duże znaczenie teoretyczne i praktyczne. Pozwalają prześledzić w jakich warunkach można uzyskać mutanty apatogenne, określić różne istniejące zależności dla różnych szczepów wirusa oraz stopień wrażliwości w stosunku do naturalnie wrażliwego gospodarza. Znajdują one również praktyczne zastosowanie przy opracowaniu szczepionek żywych opartych na genetycznie jednorodnym materiale. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleźliśmy badań dotyczących wpływu DTT na wirus zakaźnego zapalenia jamy nosowej i tchawicy bydła (IBR).

Stopień atenuacji *in vivo* oraz ocenę właściwości antygenowej wybranego na podstawie wyników pierwszego etapu badań szczepu B-184 wykonano na 10-tygodniowych cielętach.

### Materiał i metody

Do badań użyto:

— terenowe szczepy B-21, B-184 i B-1048 oznaczone w pracy symbolami 21, 184, 1048 wirusa IBR wyizolowane przez Kitę (4). Szczepy zostały wyosobnione z jamy nosowej cieląt z klinicznymi objawami zapalenia narządu oddechowego. Do badań użyto izolaty 21,