

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 нелиофилизированную 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 нелиофилизированной вакциной. Более слабую иммуногенность лиофилизированного 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 prześledzono zachowanie się badanego szczepu (B-184) na poziomie 8 i 43 pasażu w HKNZB pod wpływem Dithiothreitolu (DTT).

Jedną z cech biologicznych, charakteryzujących mutanty niepatogenne jest oporność na inaktywację Dithiothreitem. 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,

184 i 1048 sprawdzone uprzednio na obecność wirusa IBR,

— standardowy szczep szczepionkowy otrzymany od dr Bartha z Centralnego Instytutu Weterynarii w Budapeszcie, stanowiący szczep odniesienia,

— subkulturę komórek nerki zarodka bydła (HKNZB) oraz pierwotną hodowlę komórek nerki królika (HKNK). Prowadzono je według ogólnie przyjętych zasad, stosując jako płyn wzrostowy płyn Hanksa z dodatkiem hydrolizatu laktoalbuminy, 10% surowicy cielęcej oraz antybiotyków. Płyn utrzymujący składał się w równej objętości z płynu Hanksa i Parkera \*),

— Dithiothreitol (DTT) produkcji Calbiochem, Los Angeles, California.

Klonowanie szczepu B-184 wykonano w sposób następujący. Jednowarstwową HKNZB do metody łyśinek przygotowywano w butelkach Legroux. Po uzyskaniu 100% pokrycia dna butelki warstwą komórek płyn wzrostowy zlewano, komórki przemywano dwukrotnie PBS i zakażano szczepem wirusa IBR. Następnie inkubowano przez 1 h w temperaturze 37°C, przemywano PBS, pokrywano warstwą odżywczą agaru i inkubowano w temperaturze 37°C. Po uzyskaniu w hodowli kontrolnej efektu cytopatycznego warstwę agaru odżywczego pokrywano warstwą agaru barwiącego. Po zakrzepnięciu agaru butelki na 24 h wstawiano do termostatu (temp. 37°C). Po tym okresie na tle różowo zabarwionej warstwy tkanki ukazywały się jasne, okrągłe pola — łyśinki. Dla uzyskania jednolitego genetycznie materiału „łyśinkę” wycinano wraz z agarem i przenoszono z butelki do probówki wirówkowej zawierającej 1 ml PBS, wstrząsano przez 5 min. i wirowano przez 15 min. przy 1000 obr./min. Płynem nad osadu w ilości 0,5 ml zakażano jedną butelkę Legroux z hodowlą HKNZB, a po uzyskaniu efektu cytopatycznego sprawdzano miano namnożonego wirusa. Plakowanie wykonano trzykrotnie. Materiał do dalszych badań otrzymywano namnażając klonowany szczep wirusa w butelkach Roux. Po uzyskaniu 80% efektu cytopatycznego wirus schładzano, zamrażano w temperaturze suchego lodu z alkoholem i rozmrażano. Płyn wirowano przez 20 min. przy 3000 obr./min., zlewano do ampułek i przechowywano w suchym lodzie.

Maksymalny zbiór wirusa w zależności od okresu inkubacji prowadzono w odstępach 18, 24, 36, 42 i 60 godzin po zakażeniu. Namnożony wirus w poszczególnych przedziałach czasowych mianowano metodą kolejnych rozcieńczeń. Miano TCID<sub>50</sub> obliczano metodą Kärbera.

Odczyn seroneutralizacji wykonano metodą alfa, mieszając stałą objętość surowicy w rozcieńczeniu 1:4 i dziesięciokrotne rozcieńczenia wirusa.

Inaktywację szczepu B-184 na poziomie 8 i 43 pasaży w hodowli HKNZB przy użyciu DTT o stężeniu 0,001 M i 0,002 M i pH 7,8 w temp. 37°C przeprowadzono w sposób następujący.

W dniu wykonania próby sporządzano jak wyżej wymienione końcowe stężenia roztworu DTT w 0,1 M buforze Trisu. Przygotowane roztwory mieszano w równych objętościach z wirusem B-184 (pasaż 8 i 43) o mianie 10<sup>5,5</sup> TCID<sub>50</sub>. Kinetykę inaktywacji określano po 15, 30, 45 i 60 minutach po ekspozycji DTT. Pobrane mieszaniny wirusa w wyżej podanych odstępach czasowych po inkubacji w temperaturze 37°C wysiewano na HKNZB stosując 10-krotne rozcieńczenia zawiesin. Każdym rozcieńczeniem zakażano 5 probówek. Po 5 dniach inkubacji miano wirusa TCID<sub>50</sub> obliczano metodą Kärbera.

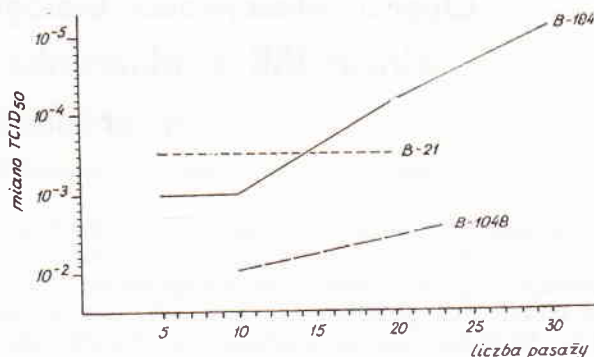
Doświadczenia na cielętach miały na celu ocenę stopnia atenuacji i nieszkodliwości oraz właściwości antygenowych szczepu B-184 na poziomie 43 pasaży przy użyciu różnych dróg wprowadzenia. Badania przeprowadzono na cielętach w wieku 10 tygodni, wolnych od przeciwciał. Dwukrotne szczepienie cieląt

w odstępach 3-tygodniowych wykonano w 3 grupach doświadczalnych.

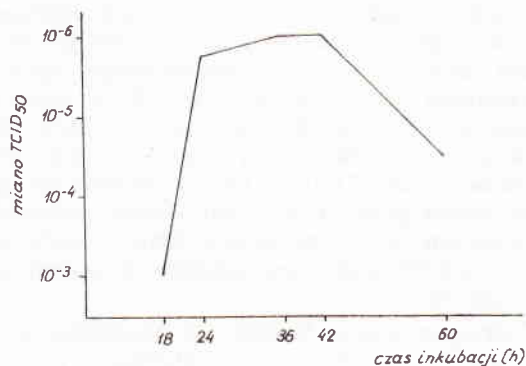
Pierwsza grupa otrzymała zawiesinę szczepu B-184 dwukrotnie donosowo w ilości 1 ml do każdego otworu nosowego. Druga grupa otrzymała 2 ml donosowo i 5 ml podskórnie. Trzecia grupa — 5 ml dwukrotnie podskórnie. Miano wirusa wynosiło 10<sup>5,5</sup> TCID<sub>50</sub>/1 ml. Równocześnie identyczny układ doświadczeń wykonano ze szczepem węgierskim o mianie 10<sup>5,5</sup> TCID<sub>50</sub>/1 ml. Stanowił on szczep odniesienia.

## Wyniki i omówienie

Wszystkie badane szczepy wirusa IBR wykazywały zmiany cytopatyczne w HKNZB po 48 h, a po 72 h uzyskiwano 80% efektu cytopatycznego. Spośród badanych szczepów w toku kolejnych pasaży najsilniej replikował się szczep B-184. Wyniki przedstawia ryc. 1. Najwyższe miano wirusa B-184 uzyskuje się w HKNZB po 36—42 h jego namnażania, po zastosowaniu dawki infekcyjnej 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>. Wyniki przedstawia ryc. 2.



Ryc. 1. Miano TCID<sub>50</sub> badanych szczepów terenowych w zależności od liczby pasaży

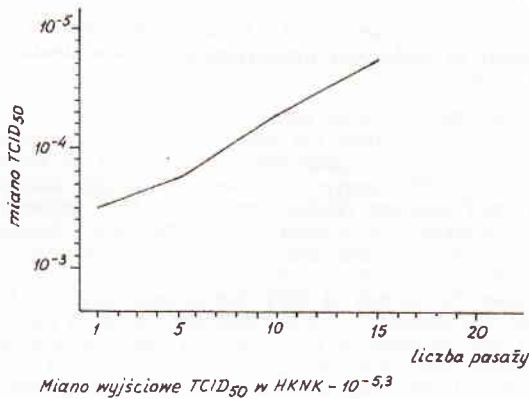


Ryc. 2. Miano TCID<sub>50</sub> wirusa IBRB-184/PL w zależności od czasu inkubacji

Szczep B-184 na podłożu heterologicznym (nerka królika) w pierwszych pasażach wykazał spadek miana o 2 log w stosunku do miana wyjściowego. Stopniowy wzrost miana w toku prowadzonych pasaży oraz obserwowane nasilenie się zmian cytopatycznych jak i destrukcja po 48 h od zakażenia, wskazują na zdol-

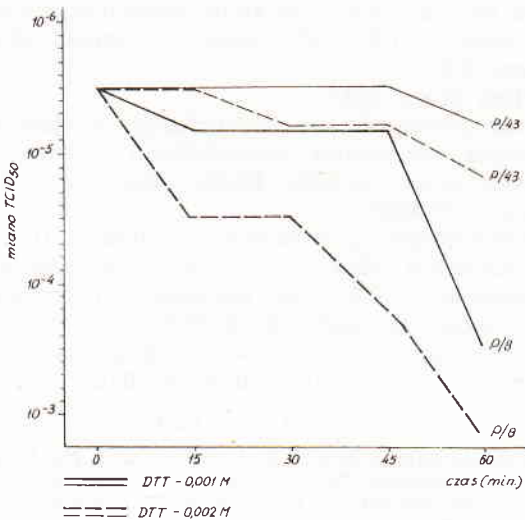
\*) Płyny do hodowli komórek pochodziły z Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie.

ność adaptacji szczepu B-184 do podłoża heterologicznego i możliwość wykorzystania nietypowego gospodarza do badań nad profilaktyką była dla omawianego wirusa (ryc. 3).



Ryc. 3. Miano TCID<sub>50</sub> szczepu B-184/PL w HKNK w zależności od liczby pasaży

Wyniki testów dla markera DTT wykazały, że pasaż 43 szczepu 184 był bardziej odporny na redukcję miana po zadziałaniu DTT niż pasaż 8. Inaktywacja przebiegała szybciej przy stężeniu 0,002 M DTT. Różnica między mianem wyjściowym 10<sup>5,5</sup> TCID<sub>50</sub> po 60-minutowej ekspozycji DTT 0,001 M dla pasażu 8 wynosiła 2 log, a dla pasażu 43 — 0,3 log. Pod wpływem działania DTT o stężeniu 0,002 M i czasu ekspozycji jak wyżej — różnice wynosiły dla pasażu 8 — 2,7 log, a dla pasażu 43 — 0,7 log.



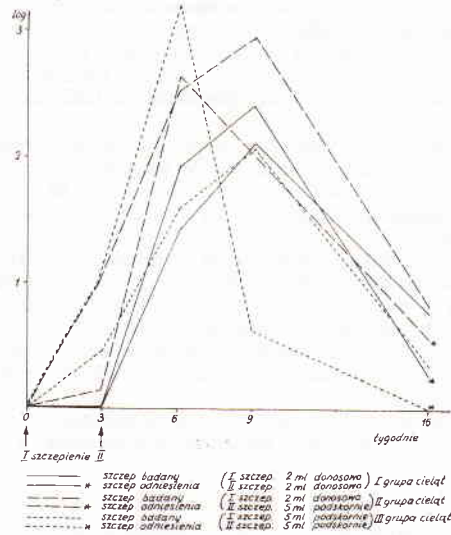
Ryc. 4. Wyniki testów dla markera DTT

Wyniki testów dla markera DTT w poszczególnych okresach czasowych przedstawia ryc. 4.

Według Gainera i wsp. (2) efekt działania DTT widoczny w mikroskopie elektronowym polega na rozerwaniu płaszcza virionu prawdo-

podobnie spowodowanym rozerwaniem S-S wiązań w cystynie.

Stopień atenuacji i nieszkodliwości oraz właściwości antygenowe szczepu 184 na poziomie 43 pasażu określono dynamiką powstawania i utrzymywania się przeciwciał u szczepionych cieląt. Wyniki ilustruje ryc. 5. Z ryciny wyni-



Ryc. 5. Średnie miana przeciwciał dla wirusa IBR w surowicy krwi cieląt w — log

ka, że w 21 dni po pierwszym szczepieniu stwierdzono najniższe wartości miana. W 3 tygodnie po drugim szczepieniu wartości wydane wzrastały, uzyskując średnie miana od —log 1,48 do —log 2,52. Najwyższe średnie wartości miana obserwowano w 42 dni po drugim szczepieniu i wynosiły one od —log 2,06 do —log 2,94. W końcowym okresie obserwacji, w 91 dni po rewakcytacji, poziom przeciwciał obniżył się i zamykał w granicach od —log 0,34 do —log 0,80. Niskie wartości mian w 21 dni po pierwszym szczepieniu (—log 0,01 do —log 1,05) znajdują potwierdzenie w pracach Shippera i Kellinga (6), którzy po jednorazowym szczepieniu jedynie u 20% szczepionych szczepionkami atenuowanymi cieląt stwierdzili obecność przeciwciał odpornościowych dla wirusa IBR.

Z porównań poziomu przeciwciał seroneutralizujących w użytych układach doświadczalnych najwyższe wartości uzyskano po zastosowaniu szczepień donosowych i rewakcytacji podskórnej. Równolegle wykonane próby porównania poziomu przeciwciał po szczepieniu szczepem badanym i szczepem odniesienia nie wykazywały zasadniczych różnic.

W wyniku szczepień u cieląt nie obserwowano reakcji poszczepiennych.

Pismienictwo

1. Carver D., Seto D.: J. Virol. 2, 1842, 1968.  
2. Gainer J., Long J., Hill P., Capss J.: Virology 45, 91, 1971.

3. Hare J., Chan J.: Virology 34, 481, 1968.
4. Kita J.: Medycyna Wet. 12, 123, 1978.
5. Klingeborn D., Dinter Z.: Appl. Microbiol. 6, 1121, 1972.
6. Shipper A., Kelling C.: Can. J. Comp. Med. 39, 402, 1975.

Adres autora: prof. dr Janina Oyrzanowska-Poplewska, ul. Bielańska 3 m. 10, 00-086 Warszawa.

Ойжаповская-Поплевская Я., Кита Е., Прандота Я. — Оценка биологических свойств отечественных штаммов вируса IBR с указанием направлений использования их в специфической профилактике.

Среди изолированных штаммов вируса IBR выбрали штамм, наиболее соответствующий требованиям специфической профилактики. Штамм, обозначенный символом 184, подвергли клональной селекции, а также аттенуированию к HKNZB и адаптации к HKNK.

Посредственно оценку степени аттенуирования штамма провели, применяя маркер Dithiothreitol (DTT) с концентрацией 0,001 M и 0,002 M в буфере Tris. Период экспозиции DTT составлял 15, 30, 45 и 60 мин.

Разница между исходным титром  $10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub> и после экспозиции 60-минутной DTT (0,001 M) для пассажа 8 составляла — 2 лог, а для пассажа 43 — 0,3 лог. Под влиянием же действия DTT с концентрацией 0,002 M и времени экспозиции, как выше, эти различия составляли для пассажа 8 — 2,7 лог, а для пассажа 43 — 0,7 лог.

Степень аттенуирования и безвредности, а также антигенные свойства штамма оценивали в биоло-

гической пробе на телятах. Наивысшие средние значения титра наблюдали через 2 дня после второй вакцинации и сосавляли они от — 2,06 лог до — 2,94 лог.

Наивысшие значения титров получили после внутриносовой вакцинации и подкожной ревакцинации.

Oyrzanowska-Poplewska J., Kita J., Prandota J. — Appraisal of biological properties of native strains of IBRS virus.

Out of IBRS strains isolated in Poland the virus designated as number 184 was cloned and attenuated through cell cultures passages and adapted to HKNK cell culture. The degree of attenuation was assessed using DTT marker (Dithiothreitol) at the concentration of 0.001M and 0.002M in a 0.1M Tris solution. The time of exposure was 15, 30, 45 and 60 minutes. The difference in titers before exposure ( $10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>) and after the action of DTT for 60 min (0.001M) was for the 8th passage — 2 log and for the 43rd passage — 0.3 log. In case of DTT used at the concentration of 0.002M the data were 2.7 log and — 0.7 log, respectively. The degree of attenuation and harmlessness and antigenic properties were examined on calves. The highest mean values of titers were observed after 40 days since the second injection and they were from 2.06 to 2.94 log. The highest titers were noticed after intranasal injections and then after subcutaneous revaccination.

MARIAN BINEK, MAREK NIEMIAŁTOWSKI, ZBIGNIEW SZYMKIEWICZ, DANUTA KLIMUSZKO, TADEUSZ JAKUBOWSKI

## Wykrywanie enterotоксин *Escherichia coli* w pętłach jelitowych świń i komórkach CHO

Z Zakładów: Bakteriologii, Wirusologii i Epizootologii Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie

Badania Smitha i Halls (14) wykazały, że kontrolowane przez plazmid Ent wytwarzanie enterotоксин wpływa w znacznym stopniu na chorobotwórczość dla prosiąt szczepów *Escherichia coli* (5, 12, 13). Obecność czynników kolonizujących, na przykład K88 (9), połączona z wytwarzaniem enterotоксин powoduje, że szczepy *Escherichia coli* posiadające te cechy są najczęstszą przyczyną kolibakteriozy u prosiąt (6). W Polsce największy procent enterotоксичных szczepów *Escherichia coli* stwierdzono wśród szczepów posiadających także antygen K88 (11).

Enterotоксинy można wykryć:

1. metodą pętli jelitowych (ILT), zmodyfikowaną przez Smitha i Halls (12, 13).
2. określeniem efektu cytotоксичного w nowotworowych komórkach nadnerczy myszy (Y-1) (3) lub w komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO) (4),
3. próbą na oseskach myszy (2).

W pętłach jelitowych świń można wykryć obecność toksyny ciepłochwiejnej (LT) i ciepłostajnej (ST). Metoda oznaczania enterotоксин w komórkach CHO lub Y-1 pozwala wykryć jedynie toksynę LT, natomiast na oseskach myszy tylko ST.

Niektórzy autorzy (10) uważają, że próby oceny na oseskach myszy dają tylko niewielki

procent wyników pozytywnych w przypadku szczepów izolowanych od świń. Szczepy *Escherichia coli* izolowane od świń wytwarzają z reguły toksyny LT i ST, rzadko natomiast samą toksynę ST.

Celem pracy było:

1. zaadaptowanie w warunkach krajowych metod oznaczania enterotоксин wytwarzanych przez szczepy *Escherichia coli* izolowane od świń,
2. porównanie przydatności metody ILT i oznaczania efektu cytotоксичного w komórkach CHO do określenia enterotоксичności szczepów *Escherichia coli*.

Przedstawione wyniki stanowią kontynuację badań podjętych w Instytucie w 1978 r. (15).

### Materiał i metody

Przygotowanie hodowli *Escherichia coli*. Do badań użyto 20 szczepów *Escherichia coli*, w tym 6 szczepów standardowych i 14 izolowanych z przypadków kolibakteriozy świń.

Do oznaczania enterotоксин metodą pętli jelitowych używano 18-godzinna, żywą kulturę *Escherichia coli* inkubowaną w 37°C w bulionie wzbogaconym. W celu uzyskania enterotоксинy ST szczepy *Escherichia coli* hodowano w podłożu TSB z dodatkiem glukozy w ciągu 18 godz. w 37°C. Skład podłoża TSB (pH 7,4): 15 g tryptone Difco, 5 g soytone Difco, 1 g wyciągu drożdżowego Difco, 5 g chlorku sodu i woda destylowana do 1000 ml. Następnie kulturę bakteriyną inaktywowano przez ogrzewanie w łaźni wod-