

praktycznie dostępnym sposobem na uniknięcie strat spowodowanych przez chorobę Pacheca.

Z praktycznego punktu widzenia, ze względu na rolę papugi jako źródła zakażenia psittakozą dla człowieka, w każdym przypadku musi być wykluczona ta choroba. Pewna zbieżność objawów z chorobą Pacheca utrudnia diagnozę. W przebiegu PPD brak jest typowych objawów klinicznych. Zmiany anatomopatologiczne nie są również charakterystyczne. Z tego względu rutynową metodą rozpoznawania choroby Pacheca jest badanie histopatologiczne. Stwierdzenie typowych ciałek wtrętowych przemawia w każdym przypadku za chorobą Pacheca. Pewne rozpoznanie uzyskuje się po izolacji i identyfikacji wirusa. Duże znaczenie pomocnicze może mieć również wykonanie badania w mikroskopie elektronowym. W diagnozie różnicowej należy wykluczyć psittakozę (barwienie metodą Macchia-vello dla wykazania ciałek LCL w bezpośrednich rozmazach z płynu osierdziowego) i inne choroby bakteryjne. Również zatrucia (zw. fosforu, ołów itp.) powinny być zawsze brane pod uwagę w diagnozie różnicowej.

#### Piśmiennictwo

1. Biggs P. M.: *Develop. Biol. Standard.* 52, 3, 1982.
2. Cavil J. P.: Pacheco's parrot disease. w Petrak M. L.:

- *Disease of cage and aviary birds*, Lea and Febiger, Philadelphia, 381, 1969.
3. Cho B. R., McDonald T. L.: *Avian Dis.* 24, 268, 1980.
4. Cooper R., Howard E. B.: *Proc. 26 th. West. Poultry Dis. Conf. Davis*, 24, 1977.
5. Dharma D. N., Sudana G.: *Avian Dis.* 27, 301, 1983.
6. Durham P. J. K., Gumbrell R. C., Clark R. G.: *N. Z. Vet. J.* 25, 168, 1977.
7. Ehrsan H., Hauser B., Metzler A.: *Schweizer Arch. Tierheilk.* 120, 23, 1978.
8. Gaskin J. M., Raphael B., Major A., Halls G.: *Proc. Am. Assoc. Zoo Vet. Seattle, Washington*, 24, 1981.
9. Gilbert Y., Chantal J., Jouglar J. Y., Gerard H., Lacheretz A., Picavet D.: *Revue Med. Vet.* 135, 303, 1984.
10. Godwin J. S., Jacobson E. R., Gaskin J. M.: *J. Zoo Anim. Med.* 13, 127, 1982.
11. Hirai K., Hitchner S. B., Calnek B. W.: *Avian Dis.* 23, 148, 1979.
12. Hitchner S. B., Hirai K.: *Avian Dis.* 23, 139, 1979.
13. Kaleta E. F.: *Tierärztl. Praxis* 11, 67, 1983.
14. Kaleta E. F., Marschall H. J., Heffels U., Mikami T.: *Zentbl. Vet. Med. Reihe B.* 27, 405, 1980.
15. Kalimer G.: *Avian Dis.* 19, 640, 1975.
16. Martin H. T., Early J. L., Bridger J. C.: *Vet. Rec.* 105, 256, 1979.
17. Meulemans G., Dekegel D., Peeters J., Halen P.: *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 6, 455, 1978.
18. Miller T. D., Millar D. L., Naqi S. A.: *Avian Dis.* 23, 753, 1979.
19. Neuhybel P., Beranek L.: *Veterinarstvi* 31, 321, 1981.
20. Panigrahy B., Grumbles L. C.: *Avian Dis.* 23, 808, 1981.
21. Randall C. J., Dagless M. D., Jones H. G. R., McDonald J. W.: *Avian Path.* 8, 299, 1979.
22. Senne D. A., Pearson J. E., Millert D., Gustafson G. A.: *Avian Dis.* 27, 731, 1983.
23. Simpson C. F., Gaskin J. M., Handley J. E.: *J. infect. Dis.* 131, 390, 1975.
24. Simpson C. F., Hanley J. E.: *Avian Dis.* 21, 209, 1977.
25. Vindevogel H., Duchatel J. P., Burtonboy G.: *Annls Med. Vet.* 122, 167, 1978.
26. Vindevogel H., Pastoret P. P., Lercy P., Coignoul: *Avian Path.* 9, 385, 1980.
27. Winterell G.: *Prakt. Tierarzt.* 58, 321, 1977.

Adres autora: dr wet. Piotr Szeleszczuk, ul. J. Miklaszewskiego 4 m. 25, 02-776 Warszawa

ADAM DZIERZAWSKI, ELIZA CZERWIŃSKA

## Wyniki namnażania wirusa choroby Aujeszky w hodowli głębinowej i stacjonarnej

Puławskie Zakłady Przemysłu Bioweterynaryjnego, 34-100 Puławy

Dokładne, a jednocześnie precyzyjne i krótkie zdefiniowanie pojęcia „biotechnologia” nie jest łatwe, bowiem funkcjonuje wiele definicji tej rozwijającej się i mającej coraz większe znaczenie praktyczne dyscypliny (2). Za Europejską Federacją Towarzystw Biotechnologicznych można przyjąć, że biotechnologia — to połączenie niektórych działów biochemii, mikrobiologii, genetyki i nauk inżynierskich w celu technologicznego, badawczego i praktycznego wykorzystania drobnoustrojów, komórek roślinnych i zwierzęcych oraz ich składników (6). Rozpatrując to zagadnienie w świetle produkcji szczepionek tak ludzkich, jak i zwierzęcych ujawnia się dominujące znaczenie mikrobiologii, gdyż mikrobiolog „opracowuje” nowe szczepy drobnoustrojów, dobiera ich właściwości pod względem przydatności praktycznych. Mikrobiologia przemysłowa — opracowuje wydajne technologie służące do namnażania dużych ilości potrzebnych antygenów, które poddane wnikliwej kontroli metodami mikrobiologicznymi, mogą znaleźć zastosowanie w zapobieganiu i leczeniu wielu chorób (1). Zastosowanie nowoczesnych tech-

nik (bioreaktorów z pełnym oprzyrządowaniem regulacyjnym i kontrolnym) pozwala na precyzyjne kierowanie procesami termodynamicznymi, biologicznymi i chemicznymi, co jest gwarancją otrzymania właściwego produktu. Zastosowanie biotechnologii pozwala na uzyskanie lepszych wyników produkcyjnych i ekonomicznych w porównaniu do wyników zwykle otrzymywanych z zastosowaniem metod klasycznych (4).

Z dobrymi wynikami stosowano dotychczas namnażanie w hodowli głębinowej mikroorganizmów, wykorzystywanych następnie do sporządzania szczepionek przeciwko pomorowi drobiu (5), kleszczowemu zapaleniu mózgu (5), brucelozie (3), wenezuelskiemu zapaleniu mózgu koni (5), wścieklicznie (7). W badaniach własnych opracowano metodę namnażania na fibroblastach kurzych szczepionkowego wirusa choroby Aujeszky (ChA) z wykorzystaniem do tego celu fermentora. Następnie porównano wyniki namnażania wirusa oraz właściwości immunogenne antygenów uzyskanych w hodowli głębinowej i stacjonarnej.

Materiał i metody

Fibroblasty zarodka kurzego uzyskiwano na drodze trypsynizacji 10-dniowych zarodków kurzych 0,25% roztworem trypsyny w buforze fosforanowym. Po odwirowaniu przy 2000 obrotów/min. i starannym przepłukaniu zakładano równolegle: hodowle głębinowe o różnej ilości zawieszonych komórek i hodowle stacjonarne w celu porównania uzyskanych wyników. Do hodowli głębinowych stosowano płyn składający się z 45% płynu Hanksa z zawartością 0,5% hydrolizatu laktoalbuminy + 45% zbuforowanego roztworu ekstraktu drożdżowego i 5% surowicy cielęcej. Do 1 l płynu dodawano antybiotyki w ilości 100 000 jednostek penicyliny krystalicznej i 100 mg streptomycyny. W hodowli stacjonarnej jako płynu wzrostowego używano płynu Earle'a z dodatkiem 10% surowicy cielęcej, oraz antybiotyki w ilościach jak podano wyżej. Podane składy płynów ustalono w doświadczeniach wstępnych. Hodowle zakażano atenuowanym szczepem wirusa choroby Aujeszky Buk TK-900 stosowanym obecnie do produkcji szczepionki Suivac A. Hodowle głębinowe prowadzono w polskim fermentorze IF-84 o pojemności całkowitej 35 l przy napełnieniu do 1/3 objętości. W czasie trwania procesu nie stosowano napowietrzania. Hodowle mieszano dwupoziomowym mieszadłem łopatkowym przy szybkości 100—120 obrotów/min.

Dla określenia dynamiki namnażania wirusa hodowle o gęstości 2 400 000 komórek w 1 ml zakażano inoculium o objętości 60 ml wirusa ChA o mianie  $10^{7,5}$  TCID<sub>50</sub>/ml. Próbkę pobierano co 6 godzin i mianowano na hodowli zarodka kurzego. Wyniki obliczano metodą Reeda-Muencha. Hodowle stacjonarne zakładane były w butelkach Roux 0,5 l i probówkach. Otrzymane dwoma metodami antygeny użyto do przygotowania serii doświadczalnych szczepionek liofilizowanych, które następnie sprawdzano na immunogenność i nieszkodliwość według metod przyjętych przy kontroli szczepionki Suivac A. Warchlaki o ciężarze ciała 40 kg podzielono na 3 grupy: czterem podano szczepionkę przeciwko chorobie Aujeszky przygotowaną metodą obecnie stosowaną w produkcji, następnie cztery otrzymały szczepionkę uzyskaną w hodowli głębinowej, natomiast dwa pozostałe warchlaki stanowiły kontrolę. Miano przeciwciał w surowicy warchlaków szczepionych i kontrolnych badano metodą seroneutralizacji na hodowli tkankowej zarodka kurzego.

Wyniki i omówienie

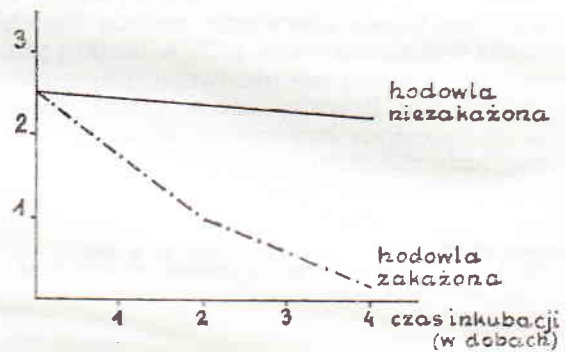
Przeprowadzone badania wykazały zależność między uzyskiwanym końcowym mianem wirusa a takimi parametrami, jak: pH, gęstość hodowli, temperatura i czas namnażania, szybkość obrotów mieszadła oraz ilość tlenu rozpuszczonego w płynie wzrostowym przyswajającym przez komórki. Optymalną gęstość hodowli komórek prowadzonych metodą hodowli głębinowej ustalono sprawdzając miano wirusa w hodowlach o wybranych gęstościach. Wyniki przedstawiono w tab. 1.

Najwyższy wzrost miana wirusa uzyskano w hodowlach o gęstości 2 500 00 komórek w 1 ml płynu. Hodowle gęściejsze i rzadsze przy stałej wielkości dawki zakażającej dawały znacznie niższe przyrosty miana. W pobieranych okresowo próbkach określano żywotność komórek oraz prowadzono ich obserwacje. W hodowlach nie zakażonych już po 6 godz. obserwowano skłonność komórek do agregowania początkowo po 2—3, po 24 godz., po 4—5—6, a po 48 godz. dochodzącą do 7—8 komórek. Żywotność w agregatach była dobra i utrzymywała się na osiągniętym poziomie do 96 godziny inkubacji. Ilość

Tab. 1. Wyniki namnażania wirusa ChA w hodowlach o różnej gęstości komórek w 1 ml

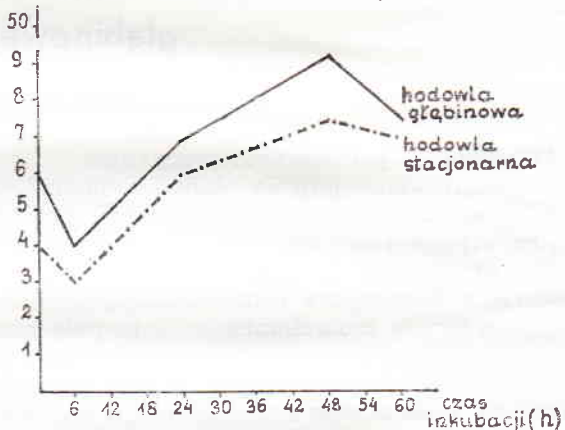
Rodzaj hodowli	Gęstość hodowli (komórki w 1ml)	Miano namnożonego wirusa w (log. TCID <sub>50</sub> )
Stacjonarna	2500 000	10 <sup>7,5</sup>
Głębinowa	4500 000	10 <sup>8,2</sup>
Głębinowa	2400 000	10 <sup>9,2</sup>
Głębinowa	1700 000	10 <sup>7,2</sup>

Gęstość hodowli w (ml z kom./1ml)



Ryc. 1. Żywotność komórek w hodowlach niezakażonych i zakażonych

Miano wirusa log TCID<sub>50</sub> w 1 ml



Ryc. 2. Namnożenie wirusa ChA w hodowli głębinowej i stacjonarnej

powstałych komórkowych agregatów nie zmniejszyła się przy intensywnym mieszaniu nawet do 300 obrotów/min. Po 96 godzinach inkubacji obserwowano obumieranie tak pojedynczych komórek hodowli, jak również niektórych komórek w agregatach. Natomiast w hodowlach zakażonych liczba żywych komórek zmniejszała się równolegle wraz z namnażaniem się wirusa osiągając powyżej 3 doby wartości bliskie zeru (ryc. 1).

Tab. 2. Miana przeciwciał neutralizujących wirus ChA w surowicach warchlaków kontrolnych i uodpornionych szczepiankami z hodowli głębinowej i hodowli stacjonarnej

Grupa	Liczba zwierząt	Miano przeciwciał		
		A	B	C
K	2	0	0	0
D-1	4	0	1:40	1:80
D-2	4	0	1:40	1:96

Objaśnienia: K — warchlaki kontrolne nie szczepione, D-1 — warchlaki uodpornione z hodowli głębinowej, D-2 — warchlaki uodpornione z hodowli stacjonarnej, A — przed szczepieniem, B — 3 tygodnie po szczepieniu, C — po 3 tygodniach po rewakcytacji.

W hodowlach zakażonych obserwowano również zmianę pH. Po 48 godzinach od zakażenia pH dochodziło do wartości 6,7—6,8 i dalsze utrzymanie go na tym poziomie wymagało napowietrzania. W hodowlach nie zakażonych w porównaniu z zakażonymi notowano mniejsze obniżenie pH.

Charakter namnażania się wirusa ChA w hodowli stacjonarnej, jak i głębinowej w obserwowanych podziałach czasowych był podobny, lecz osiągał zawsze wyższe wartości w hodowli głębinowej, jak to przedstawiono na ryc. 2. W obu hodowlach po pierwszych 6 godzinach inkubacji obserwowano spadek mian. Następnie miano stopniowo wzrastało osiągając maksimum po 48 godzinach od chwili zakażenia. Maksymalne miano wirusa ChA w hodowli głębinowej osiągnęło wartość  $\log 10^{9,2}$  TCID<sub>50</sub> w 1 ml i było większe od maksymalnego miana uzyskanego metodą tradycyjną o 1,7 log (ryc. 2). Wartość miana przeciwciał neutralizujących wirus choroby Aujeszkiego w surowicach świń przed szczepieniem (A), w 3 tygodnie po szczepieniu (B) i po 3 tygodniach po rewakcytacji (C) przedstawiono w tab. 2.

Kontrolna grupa wykazywała zerowy poziom miana przeciwciał przez cały okres obserwacji. Grupa druga (D-1), której podano szczepionkę przygotowaną metodą tradycyjną zareagowała wzrostem miana przeciwciał, którego dalszy przyrost notowano po rewakcytacji. Podobnie zachowały się miana przeciwciał zwierząt (grupa D-2), którym podano szczepionkę przygotowaną z antygenem otrzymanego w hodowli głębinowej. Badany poziom przeciwciał odpornościowych był w obu grupach zwierząt podobny i osiągał średnią wartość 1:80 do 1:96. Podobne wartości mian w obu grupach uodpornianych zwierząt wskazują, że immunogenność antygeny przygotowanego metodą hodowli głębinowej jest tożsama z wartością immunogenną antygeny uzyskanego metodą hodowli stacjonarnej.

#### Wnioski

1. Opracowano warunki namnażania wirusa ChA w fermentorze IF-84. Wartość i ilość otrzy-

manego metodą hodowli głębinowej antygeny zależna jest od gęstości hodowli, wielkości inokulum i warunków namnażania.

2. Namnażanie w hodowli głębinowej daje możliwość uzyskania wyższych mian wirusa w jednostce objętości w porównaniu z hodowlą stacjonarną.

3. Wartość uodporniająca otrzymanego antygeny jest podobna jak antygeny otrzymanego metodą stacjonarną.

#### Pismienictwo

1. Bull A. T., Holt G., Lilly M. D.: A raport commissioned by the Organization for Economic Corporation and Development. London, December, 1981.
2. Gółębiowski T.: Mat. konf. nauk.-tech., Wrocław, VI, 1985, s. 5.
3. Hanschild A. H. W., Pionick H.: Can. Microbiol. 7, 431, 1961.
4. Hepner L.: VI International Fermentation Symposium Appendix 1 A, 731, 1981.
5. Nowoczatowski A. S., Miszyn L. M.: Wop. Wirus. 5, 566, 1968.
6. Sedlaczek L.: Post. Mikrobiol. 23, 75, 1984.
7. Sokol F., Kubert E., Wiktors T. J., Humler K., Koprowski H.: J. Virol. 1, 898, 1968.

Adres autora: dr Adam Dzierżawski, ul. Kollataja 16/9, 24-100 Puławy

#### Державский А., Червинская Э. — Результаты размножения вируса болезни Ауески в глубинной и стационарной культуре

Разработали метод размножения вакцинарного вируса болезни Ауески на куриных фибробластах с применением ферментатора отечественного производства, заменяя применяемые до сих пор колбы Ру. Привели основные параметры размножения вируса в ферменторе. Сравнительные исследования (в глубинной и стационарной культуре) показывают, что размножение вируса в глубинной культуре происходит исправнее, без понижения иммуногенной ценности антигена. Антиген, полученный 2 методами, применили для изготовления вакцин, похожего образом предохранявших иммунизируемых животных.

#### Dzierżawski A., Czerwińska E. — The results of Aujeszky's disease virus propagation in a suspension of single cells or in monolayer cultures

The technique of vaccinal strain of Aujeszky's disease virus propagation in a suspension of chicken fibroblasts was elaborated. The elementary parameters of the virus propagation were given. Comparative examinations of findings with the data obtained in monolayer cultures (Roux flasks) showed that the propagation of the virus in a cell suspension was better without any decrease of immunogenic properties of the antigen. The antigens obtained by the two methods were used to prepare vaccines. The results of vaccination in pigs showed good protective effects in the both cases.

#### JONES R. S., SEYMOUR C. J.: Obserwacje kliniczne nad stosowaniem isofluranu u psów i u koni (Clinical experiences with isoflurane in dogs and horses). Vet. Rec. 119, 8—10, 1986 (1)

Isoflurane, preparat stosowany do narkozy wziewnej użyto u 22 psów i 21 koni w różnego rodzaju zabiegach chirurgicznych. We wszystkich przypadkach uzyskano bardzo dobre efekty. Układ krążenia i układ oddechowy zachowują się w narkozie izofluranowej identycznie jak w narkozie halotanowej. Dzięki właściwościom preparatu uzyskano zarówno odpowiednie nasilenie narkozy, jak i brak działania ubocznego. U psów czas ustępowania narkozy wynosił średnic 3,5±2,7 minut.

G.