

ELŻBIETA SAMOREK-SALAMONOWICZ, HANNA CZEKAJ

## Wpływ liofilizacji i przechowywania na przeżywalność szczepu B-38 wirusa choroby Derzsyego

Zakład Anatomii Patologicznej Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

### Summary

#### Effect of lyophilization and storage on B-38 strain of Derzsy's disease virus properties

Vaccine B-38 strain of Derzsy's disease virus (DDV) was used in the study. The virus was lyophilized after the multiplication in the culture of GEF. Sucrose — glutamine, gelatine — sucrose, peptone — lactose and SPGA solutions were applied as stabilizers. The lyophilizates were kept at 4°C for 24 months. The concentrations of the virus in the samples were estimated periodically. It was found that peptone — lactose stabilizer was the most effective protector of DDV from inactivation. The virus was dissolved in Eagle's fluid, PBS and commercial solvent. The dissolved vaccine was kept at 4°C, 21°C and -20°C for 24 h. The titre of the vaccine was determined immediately after the dissolving and then after 2, 4, 6 and 24 h. Storage of the vaccine at 21° or 4°C for more than 2 h resulted in a significant drop of its titre. Eagle's fluid used as a solvent did not differ significantly from the commercial solvent.

Konieczność używania czynników ochronnych podczas procesów wysuszenia i zamrażania materiałów wirusowych jest powszechnie znana (1, 5). Przy produkcji tzw. szczepionek żywych zastosowanie odpowiednich osłaniaczy w procesie liofilizacji gra pierwszoplanową rolę, bowiem szczepionki muszą zawierać odpowiednio wysoką koncentrację żywych cząstek wirusowych, a także musi istnieć możliwość przechowywania ich przez okres co najmniej paru miesięcy. W zależności od materiału wirusowego używane są różne osłaniacze (1, 3, 4, 5). Osłaniaczem takim może być normalna surowica, odłuszczone mleko, roztwór żelatyny, białek, peptonu itp.

Celem pracy było poznanie wpływu warunków liofilizacji i przechowywania szczepionki przeciwko chorobie Derzsyego na przeżywalność wirusa szczepionkowego.

### Materiał i metody

Wirus. Użyto szczepu B-38 wirusa choroby Derzsyego (DDV), zaadaptowanego do hodowli fibroblastów zarodka gęsi. Szczep ten uzyskano od dr J. Kisarięgo (Akademia Nauk, Budapeszt). TCID<sub>50</sub> tego szczepu wynosiło 10<sup>6,5</sup> w 0,2 ml.

Hodowla fibroblastów zarodka gęsi (GEF). Sporządzano ją z 12—14-dniowych zarodków gęsi wg ogólnie przyjętych zasad. Jako podłoża wzrostowego używano płynu Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy cielęcej.

Określenie miana infekcyjnego wirusa. Sporządzano kolejne dziesięciokrotne rozcieńczenia materiału wirusowego w płynie wzrostowym, od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-8</sup>. Po 0,05 ml każdego rozcieńczenia przenoszono do baseneków płytki Cooka, do których uprzednio wiano po 0,15 ml zawiesiny komórek GEF, o gęstości 0,8 × 10<sup>6</sup> komórek/ml. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C, w atmosferze wilgotnej z dodatkiem 5% CO<sub>2</sub>. Po 7 dniach inkubacji mikroskopowo oceniano występowanie efektu cytopatycznego. Miano wirusa obliczano metodą Reeda — Muencha.

Stabilizatory używane w procesie liofilizacji. Użyto następujących stabilizatorów:

- |   |           |
|---|-----------|
| a) stabilizator sacharozowo-glutaminowy o składzie: |           |
| fosforan jednopotasowy                              | — 0,13 g  |
| sacharoza   | — 18,65 g |
| glutaminian sodu                                    | — 0,75 g  |
| surowica cielęca                                    | — 2,5 ml  |

- |  |             |
|--|-------------|
| H <sub>2</sub> O bidest.                           | ad 250,0 ml |
| b) stabilizator żelatynowo-sacharozowy o składzie: |             |
| żelatyna spożywcza                                 | — 4,2 g     |
| sacharoza  | — 1,87 g    |
| H <sub>2</sub> O bidest.                           | ad 250,0 ml |
| c) stabilizator peptonowo-laktozowy o składzie:    |             |
| pepton   | — 5,0 g     |
| laktoza  | — 25,0 g    |
| fosforan dwusodowy · 12 H <sub>2</sub> O           | — 7,205 g   |
| fosforan jednopotasowy                             | — 0,220 g   |
| H <sub>2</sub> O bidest.                           | ad 250 ml   |
| d) stabilizator SPGA o składzie:                   |             |
| sacharoza  | — 18,65 g   |
| fosforan dwupotasowy                               | — 0,337 g   |
| fosforan jednopotasowy                             | — 0,110 g   |
| glutaminian sodu                                   | — 0,24 g    |
| albumina bydłęca                                   | — 2,5 g     |
| H <sub>2</sub> O bidest.                           | ad 250 ml   |

Określenie optymalnych parametrów liofilizacji szczepionkowego szczepu B-38 wirusa choroby Derzsyego. Zawiesinę fibroblastów zarodka gęsi (GEF) w płynie wzrostowym rozlewano po 20 ml do butelek Legroux. Równocześnie zakażano je wirusem DD, w dawce po 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>. Hodowle inkubowano w temperaturze 39,5°C przez 72 h. Po tym czasie hodowle trzykrotnie zamrażano i odmrażano. Uzyskany materiał wirusowy wirowano (1000 obrotów/min.) przez 10 min., a następnie badano na jałowość. Po skontrolowaniu czystości bakteriologicznej określano miano infekcyjne wirusa mikrometodą na płytkach Cooka. Wynosiła ona 10<sup>6,65</sup> TCID<sub>50</sub> w 1 ml. Następnie materiał wirusowy mieszano w stosunku 1:1 z poszczególnymi stabilizatorami, rozlewano do ampulek liofilizacyjnych i poddawano liofilizacji. Po liofilizacji ampulki umieszczano w temp. 4°C. Koncentrację wirusa określano przed oraz 1/2, 1, 4, 5, 6, 12, 18 i 24 miesiące po liofilizacji. W tym celu pobierano po 3 ampulki z każdym stabilizatorem, materiał wirusowy rekonstruowano płynem utrzymującym, po czym określano TCID<sub>50</sub> wirusa.

Wybór rozpuszczalnika do szczepionki oraz określenie przeżywalności wirusa w rozpuszczonej szczepionce.

Materiał wirusowy zliofilizowany ze stabilizatorem peptonowo — laktozowym rozcieńczano w 50 ml płynu Eagle'a lub PBS, by uzyskać z 1 ampulki (1 ml) 100 dawek szczepionki. Rozcieńczoną szczepionkę mianowano zaraz po rozpuszczeniu, a następnie po 2, 4, 6 i 24 h przechowywania w temperaturze pokojowej (około 21°C), w temperaturze 4°C oraz w temperaturze -20°C. Jako kontroli użyto szczepionki rozpuszczonej w rozpuszczalniku komercyjnym firmy IFFA — Merieux, służącym do rozcieńczania szczepionki Palmivax.

### Wyniki i omówienie

Wyniki badań nad przeżywalnością wirusa po liofilizacji przedstawiono w tab. 1. Najmniejszy spadek koncentracji wirusa w ciągu 24 miesięcy przechowywania uzyskano w próbkach, w których stosowano stabilizator peptonowo — laktozowy. Sam proces liofilizacji, przy zastosowaniu tego stabilizatora, spowodował zmniejszenie log miana wirusa o 0,2, następnie w ciągu 6 miesięcy miano wirusa utrzymywało się na nie zmienionym poziomie. Po 12 miesiącach przechowywania log miana TCID<sub>50</sub> wynosił 5,21 (spadek o 0,84 log), a po 24 miesiącach TCID<sub>50</sub> wynosiło 4,2 log (spadek o 1,85 log w stosunku do miana wyjściowego). Natomiast dla pozostałych osłaniaczy zmniejszenie log miana wirusa, notowane 2 tygodnie po liofilizacji wynosiło od 1,0 (dla

Tab. 1. Przeżywalność wirusa choroby Derzsyego szczepu B-38, po liofilizacji

Miesiące przechowywania	Stabilizatory*			
	1	2	3	4
	log TCID <sub>50</sub> /1 ml			
0	6,05	6,05	6,05	6,05
1/2	4,25	4,05	5,85	5,05
1	4,85	4,05	5,85	5,05
4	4,25	4,05	5,78	5,08
5	4,81	3,82	5,93	4,81
6	4,80	4,50	5,81	4,80
12	4,60	4,13	5,21	4,30
18	4,20	4,00	4,80	4,01
24	3,60	3,60	4,20	3,81

Objaśnienia: \* stabilizatory: 1 — sacharozowo-glutaminowy, 2 — żelatynowo-sacharozowy, 3 — peptonowo-laktozowy, 4 — SPGA.

Tab. 2. Przeżywalność wirusa choroby Derzsyego szczepu B-38, w rozpuszczonej szczepionce

Rozpuszczalnik	Temperatura przechowywania	Okres po rozpuszczeniu				
		0h	2h	4h	6h	24h
		log TCID <sub>50</sub> /0,5 ml				
Płyn Eagle'a	4°		3,54	3,54	2,91	2,22
	21°	3,58	2,88	1,62	1,58	0,52
	-20°		3,51	3,49	3,61	3,48
PBS	4°		3,41	3,21	2,43	2,08
	21°	3,52	2,65	2,14	1,13	0,23
	-20°		3,42	3,21	2,89	2,84
Rozpuszczalnik komercyjny	4°		3,58	3,24	2,86	2,41
	21°	3,58	2,67	2,28	1,83	0,65

stabilizatora SPGA) do 2,0 (dla stabilizatora żelatynowo-sacharozowego), a po 24 miesiącach od 2,25 (stabilizator SPGA) do 2,45 (stabilizator sacharozowo-glutaminowy).

W tab. 2 przedstawiono wyniki badań nad przeżywalnością wirusa w rozpuszczonej szczepionce. W rozpuszczonej szczepionce następował szybki spadek koncentracji żywych cząstek wirusa. Po rozpuszczeniu szczepionki w płynie Eagle'a i przechowywaniu przez 2 h w temperaturze pokojowej obserwowano zmniejszenie log miana infekcyjnego wirusa o 0,7, po 24 h log miana wirusa obniżył się o 3.

Szczepionka rozpuszczona w PBS jeszcze szybciej ulegała inaktywacji. Już 2 h po rozpuszczeniu w temperaturze pokojowej miano jej wynosiło 10<sup>2,65</sup> TCID<sub>50</sub> w 1 dawce, dłuższe zaś przechowywanie prowadziło do prawie zupełnej inaktywacji (24 h).

W temperaturze 4°C następował powolniejszy spadek liczby cząstek infekcyjnych wirusa szczepionkowego. Po 24 h przechowywania notowano zmniejszenie log mian o około 1.

W rozpuszczalniku kontrolnym firmy IFFA — Merieux przeżywalność wirusa szczepionkowego była zbliżona do przeżywalności w płynie Eagle'a. Badania w temperaturze -20°C nie wykonano, ponieważ producent podaje w instrukcji, że rozpuszczalnika tego nie wolno zamrażać.

Możliwość uzyskiwania drogą liofilizacji szczepionek o długim terminie ważności jest sprawą bardzo istotną. Jednakże proces liofilizacji może powodować spadek infekcyjności niektórych wirusów, dlatego też ważny jest dobór odpowiedniego płynu osłaniającego. Osłaniacz taki powinien być starannie dobrany do każdego rodza-

ju wirusa. W doświadczeniach nad liofilizacją szczepionkowego szczepu wirusa choroby Derzsyego zastosowano 4 różne stabilizatory używane do produkcji szczepionek wirusowych.

Stabilizator sacharozowo-glutaminowy używany jako osłaniacz przy liofilizacji szczepionki przeciwko odrze (4) był mniej przydatny niż stabilizator peptonowo-laktozowy, bowiem występowały znaczne spadki miana infekcyjnego wirusa DD. Również stosowanie SPGA (2) używanego z powodzeniem do liofilizacji cell-free wirusa choroby Mareka, powodowało obniżenie TCID<sub>50</sub> wirusa DD. Podobnie zachowywał się osłaniacz żelatynowo-sacharozowy stosowany do liofilizacji wirusa zapalenia wątroby kacząt (DHV) (3). Powodował on spadek żywotności wirusa DD w zależności od czasu przechowywania, od 2 do 2,45 log. Natomiast żywotność wirusa DD liofilizowanego w obecności stabilizatora peptonowo-laktozowego utrzymywała się do 12 miesięcy na prawie nie zmienionym poziomie (spadek miana TCID<sub>50</sub> o 0,2 log — 2 tygodnie po liofilizacji, 0,84 log — 12 miesięcy po liofilizacji). Po 2 latach przechowywania liofilizatu miano TCID<sub>50</sub> było niższe od wyjściowego o 1,85 log.

W badaniach nad wyborem rozpuszczalnika do szczepionki zastosowano płyn Eagle'a, PBS oraz dla kontroli zagraniczny rozpuszczalnik komercyjny. Przechowywanie rozpuszczonej szczepionki ponad 2 h w temperaturze pokojowej lub 4°C powodowało znaczne obniżenie jej miana.

Jak wynika z danych piśmiennictwa (6) minimalna dawka uodparniająca szczepionki przeciwko chorobie Derzsyego wynosi 10<sup>2,5</sup> TCID<sub>50</sub>. W związku z dość szybkim inaktywowaniem cząstek wirusowych w rozpuszczonej szczepionce wydaje się, że należy zużyć ją w ciągu 2 h od momentu rozpuszczenia. Płyn Eagle'a zastosowany jako rozpuszczalnik nie różnił się znacząco od rozpuszczalnika komercyjnego.

## Wnioski

1. Stabilizator peptonowo-laktozowy w sposób zadowalający chroni wirus szczepionkowy DDV przed inaktywacją w czasie liofilizacji, jak i w okresie 24 miesięcy przechowywania w temperaturze 4°C.

2. Płyn Eagle'a zastosowany jako rozpuszczalnik do szczepionki przeciwko chorobie Derzsyego nie odbiega znacząco od rozpuszczalnika firmy IFFA — Merieux.

3. Przechowywanie rozpuszczonej szczepionki w temperaturze pokojowej lub w 4°C ponad 2 h powoduje znaczny spadek jej miana.

## Piśmiennictwo

1. Bovarnick M. R., Miller J. C., Snyder J. C.: J. Bact. 59, 509, 1950.
2. Calnek B. W., Hitchner S. B., Adlinder H. K.: Applied Microbiol. 20, 723, 1970.
3. Gaździniński P.: Uzyskanie atenuowanego szczepu wirusa zapalenia wątroby kacząt i ocena jego przydatności do uodparniania. Praca dokt., Instytut Weterynarii, Puławy, 1979.
4. Górski J.: Pol. Arch. Wet. 16, 121, 1973.
5. Greiff D., Richtsel W.: Cryobiology. Academic Press, London, New York, 1966.
6. Kisary J.: Avian Pathol. 6, 327, 1977.

Adres autora: dr hab., profesor, Elżbieta Samorek-Salamonowicz, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

# ***CLINACOX PREMIX 0.5%***

lub

## ***CLINAMIX***

(przedmieszka do pasz, produkowana przez firmę ROLPASZ, Gdańsk)

**to nowa szansa w profilaktyce kokcydiozy u kurcząt  
brojlerów, kurcząt odchowywanych na nioski i indyków**

Clinacox można stosować zarówno w I jak i w II fazie odchowu

Clinacox jest nieszkodliwy dla środowiska, działa również na formy rozwojowe  
kokcydii

Clinacox nawet pięciokrotnie przedawkowany nie wywołuje ujemnych skutków

Clinacox nie wykazuje interakcji z lekami i stymulatorami wzrostu używanymi do  
produkcji pasz

**Substancja aktywna - DICLAZURIL - produkcji firmy**

**JANSSEN BELGIA**

**Wyłączny dystrybutor na Polskę - firma CIBA-GEIGY**

**Oddz. w Warszawie ul. Al. Witosa 31**