

MARIAN TRUSZCZYŃSKI
Puławy

Naukowe podstawy kontroli biopreparatów stosowanych w zwalczaniu zakaźnych chorób zwierząt

Zakres i znaczenie poruszonego problemu

Pod nazwą biopreparatów rozumie się w niniejszym opracowaniu szczepionki i surowice odpornościowe używane w immunoprofilaktyce, a niekiedy również immunoterapii zakaźnych chorób zwierząt. Do grupy tej zalicza się też preparaty diagnostyczne, to jest antygeny i surowice, stosowane w rozpoznawaniu zakaźnych chorób lub identyfikacji wywołanych przez nie chorobotwórczych drobnoustrojów.

W polskim piśmiennictwie weterynaryjnym nie spotyka się prawie wcale opracowań na temat zasad kontroli jakości, czyli nieszkodliwości i skuteczności biopreparatów, stosowanych w weterynarii. Jest to natomiast ważny dział mikrobiologii i immunologii stosowanej.

Wykonywanie możliwie najbardziej doskonałej pod względem metodycznym kontroli biopreparatów, a zwłaszcza szczepionek, ważne jest z różnych względów.

Preparat podawany dużej liczbie zwierząt w ramach akcji szczepiennych, jeżeli zawiera zjadliwe lub potencjalnie zdolne do wywołania choroby zarazki — może powodować masowe zachorowania i upadki, a tym samym poważne straty ekonomiczne.

Natomiast szczepionka o niedostatecznych właściwościach uodporniających wywołuje zbyt niską lub niepełną odporność poszczepioną. To zaś może być bardziej niebezpieczne niż nie stosowanie szczepień profilaktycznych. Stwarza się bowiem iluzję, że zwierzęta są uodpornione. W związku z tym zaniedbuje się inne sposoby ochrony zwierząt przed infekcją. Przy wytworzeniu się częściowej odporności powstają dogodne warunki do pojawienia się nosicieli i siewców zarazka. Częściowa odporność sprzyja też naturalnej selekcji nowych serotypów zarazka, przeciw którym nie chroni zastosowana szczepionka.

Z tych względów wykonywanie kontroli szczepionek jest czynnością niezmiernie odpowiedzialną. Prowadzenie zaś prac naukowo-badawczych nad doskonaleniem metod kontroli posiada bardzo duże znaczenie gospodarcze.

Analogiczne stwierdzenia dotyczą kontroli biopreparatów diagnostycznych. Dopuszczanie do użytku preparatów o małej zdolności wykrywania zwierząt zakaźnych stanowi istotną przeszkodę w zwalczaniu poszczególnych chorób zakaźnych.

Dodać należy, że tylko wtedy dysponuje się biopreparatami wysokiej jakości, kiedy — mimo osiągnięcia zadowalającej w danej chwili

jakości — podejmuje się dalsze badania nad ich doskonaleniem. To samo dotyczy metod ich kontroli.

Liczba stosowanych w praktyce różnych biopreparatów rośnie z każdym rokiem. Niemożliwe jest zatem omówienie szczegółowych metod kontroli każdego z nich. Celem artykułu jest zatem podanie ogólnych zasad oraz zwrócenie uwagi na aspekt organizacyjny tego zagadnienia.

Wdrażanie biopreparatów do praktyki

Każdy biopreparat nim zostanie przekazany do użytku stanowi przedmiot prac naukowo-badawczych. W ich zakres wchodzi określenie biologicznych właściwości drobnoustroju, który ma stanowić szczep produkcyjny. Należy też ustalić warunki jego optymalnego namnażania. Trzeba opracować wymogi przechowywania, zapewniające stabilność jego właściwości. W przypadku szczepów atenuowanych konieczne jest określenie nieszkodliwości szczepu produkcyjnego dla zwierząt, które mają być uodporniane, w tym wykluczenie możliwości rewersji właściwości chorobotwórczych. Szczep taki musi być nieszkodliwy też dla innych gatunków zwierząt i człowieka. Ważnym etapem badań jest opracowanie technologii produkcji i kontroli biopreparatu.

Nieszkodliwość i skuteczność szczepionek względnie surowic odpornościowych oraz wartość rozpoznawczą preparatów diagnostycznych określa się z zasady najpierw w warunkach laboratoryjnych, a następnie sprawdza się także w ramach poszczególnych doświadczeń terenowych. Jeśli wyniki przeprowadzonych prób stanowią podstawę do przekazania biopreparatu do produkcji i użytku służby weterynaryjnej — wtedy wskazanym jest stopniowe jego wprowadzanie, pod kontrolą zakładu naukowego i nie od razu na całym obszarze kraju. Tego typu postępowanie jest niezbędne w celu wykluczenia awarii występujących niekiedy w następstwie użycia biopreparatów, które zostały zbadane w sposób niewystarczający.

Kontrola seryjna i preparaty odniesienia czyli standardy

Niezależnie od scharakteryzowanych badań, w odniesieniu do większości przekazanych do produkcji biopreparatów konieczne jest wykonanie dla każdej ich serii tzw. kontroli seryjnej na brak zanieczyszczeń drobnoustrojami, nieszkodliwość i skuteczność.

Na potrzebę stworzenia naukowych podstaw seryjnej kontroli biopreparatów i ujednoczenia, czyli standaryzacji wymogów i metod kontroli, jako jeden z pierwszych zwrócił uwagę Ehrlich (cyt. wg 3). Za swe pionierskie prace z tego zakresu został wyróżniony w 1908 roku nagrodą Nobla. Zauważył on wahania w aktywności biologicznej poszczególnych serii biopreparatu, mimo wytwarzania go zawsze tą samą metodą. Wykazał również osobnicze różnice zwierząt we wrażliwości na podany preparat i w zdolności nabywania odporności poszczepiennej. Z obserwacji tych wypłynęły odpowiednie wskazania, dotyczące konieczności używania do kontroli biopreparatu możliwie jednolitego pod względem genotypowym i fenotypowym materiału zwierzęcego. W uzyskaniu tego materiału istnieją jednak znaczne trudności.

Duże wartości w uściśleniu metod kontroli biopreparatów miało stworzenie pojęcia preparatu odniesienia, czyli standardu. W stosunku do niego porównuje się w tych samych warunkach doświadczalnych oceniany preparat. Zasada ta została zainicjowana przez Priggego w 1935 roku (cyt. wg 3).

Standardy muszą być zabezpieczone przed zmianami ich aktywności biologicznej. Stosuje się w tym celu środki konserwujące, liofilizację lub niskie temperatury.

Dane, które charakteryzują standardy biopreparatów zamieszcza się w opracowaniach o zasięgu międzynarodowym. Wydawane są one przez Międzynarodową Organizację Zdrowia (WHO), Międzynarodowy Urząd Epizootii (OIE), a w odniesieniu do pomoru bydła, pleuropneumonii bydła, przyszczycy, pomoru afrykańskiego świń i rzekomego pomoru drobiu również przez Światową Organizację Wyżywienia i Rolnictwa (FAO).

Standardy są magazynowane w laboratoriach uznanych w skali międzynarodowej za referencyjne i udostępniane na żądanie krajowym laboratoriom, odpowiedzialnym za kontrolę biopreparatów. Te ostatnie mieszczą się zazwyczaj w centralnych instytucjach naukowo-badawczych, jak np. w Polsce w Instytucie Weterynarii, a w Wielkiej Brytanii w Central Veterinary Laboratory, Weybridge, lub specjalnych instytucjach kontroli biopreparatów, które są m. in. w ZSRR, NRD lub WRL.

Upowszechnianie standaryzacji w skali międzynarodowej

Zagadnieniu standaryzacji biopreparatów poświęcone są specjalne kongresy, sympozja i konferencje naukowe. Pierwsze tego typu spotkanie odbyło się w 1955 roku w Lyonie. W ramach Międzynarodowego Stowarzyszenia Towarzystw Mikrobiologicznych (International Association of Microbiological Societies = IAMS) utworzona została grupa robocza, zwana

Stałą Sekcją do Spraw Standaryzacji. Po X Kongresie IAMS w Meksyku Sekcja została przemianowana na Komisję o nazwie Międzynarodowe Stowarzyszenie Standaryzacji Biologicznej (International Association of Biological Standardization). Głównym zadaniem wymienionego Stowarzyszenia jest popieranie rozwoju i stosowania standaryzowanych technik produkcji i kontroli biopreparatów oraz metod rozpoznawania zakaźnych chorób zwierząt. Współpracuje ono ze Światową Organizacją Zdrowia w organizacji badań i przekazywaniu do stosowania międzynarodowych standardów biologicznych i tym podobnych odczynników referencyjnych. Międzynarodowe Stowarzyszenie Standaryzacji Biologicznej jest też wydawcą czasopisma o nazwie *Developments of Biological Standardization*. Ogłaszane są w nim prace dotyczące standaryzacji biopreparatów, zwłaszcza te, które referowane są na sympozjach organizowanych przez Towarzystwo. W organizacji ich uczestniczy, zależnie od zakresu tematycznego — WHO, OIE i FAO.

Przy udziale organizacji międzynarodowych wydawane są też opracowania monograficzne, dotyczące standaryzacji. Przykładowo pod auspicjami FAO i WHO, w ramach Komitetu Ekspertów d/s Brucelozy, została wydana monografia pt. *Laboratory Techniques in Brucellosis* (wydanie 2, Genewa 1975).

Niektóre normy i wymogi o charakterze standaryzacyjnym, odnoszące się do biopreparatów, zostały umieszczone w Farmakopei Europejskiej. Dotyczy to głównie preparatów stosowanych w medycynie a tylko nielicznych biopreparatów weterynaryjnych. Istnieje potrzeba liczniejszych opracowań z tej dziedziny. Działanie w tym kierunku wydaje się nasilać (11).

Zagadnienia standaryzacji i opracowania norm biopreparatów stanowią też przedmiot zainteresowania poszczególnych państw. Przykładowo w Wielkiej Brytanii podstawą kontroli biopreparatów, stosowanych w medycynie i weterynarii, jest tzw. *Medicines Act* z 1968 roku. Preparaty używane w weterynarii są pod kątem wymogów produkcji i kontroli omówione również w *Therapeutic Substances Order of the Diseases of Animal Acts* (2).

Zagadnieniem standaryzacji i kontroli biopreparatów zajmują się przez swoje agendy specjalistyczne również organizacje o charakterze polityczno-gospodarczym jak RWPG i EWG.

Najwszechstronnej w aspekcie potrzeb weterynarii prowadzi działalność dotyczącą standaryzacji biopreparatów Międzynarodowy Urząd Epizootii (OIE). W jego ramach działa Komisja Standaryzacji Produktów Biologicznych akceptowanych przez OIE. Autor tego opracowania jest jej wiceprzewodniczącym. Współpracuje ona z Komisją d/s Kodeksu Zoosanitarnego OIE. Kodeks ten zawiera zalecenia do wykorzystania przez centralne administracje weterynaryjne poszczególnych państw. Zmierzają

one do zapobiegania i zwalczania chorób zaraźliwych w skali międzynarodowej, ze szczególnym uwzględnieniem obrotu zwierzętami między poszczególnymi państwami. W zbiorze założeń znajdują się załączniki (annexy), które zawierają wytyczne i wymogi standaryzacyjne w odniesieniu do szeregu szczepionek i surowic odpornościowych oraz preparatów diagnostycznych i metod rozpoznawania chorób zakaźnych.

Kontrola na zanieczyszczenie biopreparatów obcą mikroflorą

Biopreparaty muszą być w zasadzie wolne od drobnoustrojów zanieczyszczających, w tym bakterii tlenowych i beztlenowych, grzybów, wirusów (m.in. wirusów onkogennych), drobnoustrojów z grup *Mycoplasmatales*, *Rickettsiales* i *Chlamydiales*. Zależnie od tego czy namnożenie zarazka, stanowiącego pożądany antygen uodporniający, odbywa się na podłożach bakteriologicznych, w zarodkach kurzych, hodowli tkanek lub komórek — kierunek badań i dobór pożywek wykrywających zanieczyszczenia wymienionymi drobnoustrojami jest inny. Dąży się do ujednoczenia dla każdego biopreparatu odpowiedniego zestawu metod wykrywania niepożądanych drobnoustrojów. Prowadzi się też prace eksperymentalne, powiązane z oceną matematyczną, nad określeniem liczby próbek danej serii biopreparatu, po zbadaniu której istnieje maksymalna pewność, że wszystkie jej egzemplarze są wolne od zanieczyszczeń natury mikrobiologicznej. Generalnie rzecz ujmując, zaleca się zbadanie np. 1% całkowitej liczby ampulek względnie fiolek wchodzących w skład badanej serii lub co najmniej 4, a maksymalnie 10 egzemplarzy (10).

Kontrola na nieszkodliwość

Bardzo ważnym elementem kontroli szczepionek i surowic odpornościowych jest określenie ich nieszkodliwości dla tego gatunku zwierzęcia, u którego mają być stosowane. Chodzi o to, by nie wywoływały one odczynów miejscowych i ogólnych, które powodują poważniejsze zaburzenia w zdrowiu. Należy też bezwzględnie zapewnić niemożność szerzenia się chorób zakaźnych w następstwie podawania szczepionek i surowic odpornościowych. Wykrycie w nich czynnika infekcyjnego jest zwłaszcza wtedy trudne, kiedy znajduje się on na granicy wykrywalności.

Wybuchy chorób zakaźnych w następstwie podawania niewłaściwie skontrolowanej szczepionki są obecnie niezmiernie rzadkie, zwłaszcza jeśli się bierze pod uwagę ilość akcji szczepiennych i liczbę szczepionych zwierząt. Znacznie częściej natomiast niesłusznie podejrzewa się związek między stosowaniem szczepionki a wystąpieniem choroby wtedy, kiedy faktycznie zaistnieje wyłącznie zbieżność przypadkowa między akcją szczepienną a inną przyczyną za-

każenia. Fakt ten nie powinien jednak osłabiać dalszych przyczyn, zmierzających do wykluczenia w drodze seryjnej kontroli nieszkodliwości przekazywanego do użytku biopreparatu. Chodzi nie tylko o zapobieżenie infekjom, wywołującym chorobę, które minifestują się wyraźnymi objawami klinicznymi. Te infekcje są stosunkowo łatwe do wykrycia. Główny nacisk należy położyć na metody ujawniania infekcji o przebiegu utajonym. Wywołane są one zwłaszcza przez wirusy powolne, mogące występować w komórkach zwierzęcych, które wchodzą w skład żywych szczepionek wirusowych. Chodzi m.in. o wirusy nowotworowe, które wywołują białaczki ssaków i ptaków oraz o adenowirusy ptasie.

W celu maksymalnego zwiększenia czułości metod kontroli nieszkodliwości szczepionek, na podstawie doświadczeń i matematycznych kalkulacji określa się liczbę próbek każdej serii, które muszą być poddawane badaniu na zwierzętach lub w hodowli komórek, zależnie od rodzaju biopreparatu. Stawiane są też określone wymogi co do liczby i jakości zwierząt, na których przeprowadza się kontrolę nieszkodliwości. Ze względów ekonomicznych badanie nieszkodliwości szczepionek lub surowic odpornościowych przeprowadza się na ograniczonej liczbie zwierząt. Nie powinna być ona za mała, gdyż wtedy wzrasta możliwość niewykrycia czynnika szkodliwego. Oprócz wyrównanej i dobrej kondycji — zwierzęta używane w kontroli biopreparatów na nieszkodliwość, nie mogą posiadać przeciwciał lub innych czynników odpornościowych swoście neutralizujących drobnoustroje, ich antygeny lub toksyny, zawarte w szczepionce. Pożądane jest, by w miarę możliwości były to zwierzęta wolne od zarazków chorobotwórczych czyli tzw. zwierzęta SPF (specyfic pathogen free). W celu możliwie wczesnego stwierdzenia nawet częściowego odzyskania zjadliwości u atenuowanych szczepów szczepionkowych używa się zwierząt, którym podano środki immunosupresyjne.

Każda seria szczepionki, jak wspomniano powinna być zbadana na nieszkodliwość na tym gatunku zwierzęcia, dla którego jest przeznaczona. Oprócz tego, zależnie od rodzaju szczepionki, wykonywane są próby na zwierzętach laboratoryjnych, najczęściej na myszkach lub świnkach morskich. Badane preparaty podaje się parenteralnie, podskórnie, domięśniowo lub dootrzewnowo. Zwierzęta obserwuje się na ogół 7 dni (10), a niekiedy dłużej, w którym to czasie nie powinny one paść, ani też wykazywać objawów chorobowych.

W celu wykrycia dodatkowych czynników patogennych stosuje się neutralizację, przy użyciu swoistych surowic, atenuowanych drobnoustrojów, których obecność w szczepionce została przewidziana. Preparat taki dodaje się do hodowli wrażliwych komórek, które następnie bada się na wystąpienie efektu cytopatycz-

nego. Jego brak wskazuje, że nie występują w badanej szczepionce czynniki mikrobiologiczne, zdolne do wywołania takiego efektu. Badanie powinno być powtarzane w kilku kolejnych pasażach. Jednak nawet w takiej sytuacji nie ma bezwzględnej pewności co do braku zanieczyszczenia szczepionki innymi drobnoustrojami niż pożądane. Lecz prawdopodobieństwo obecności obcej mikroflory chorobotwórczej zmniejsza się bardzo wydatnie. Można je jeszcze bardziej obniżyć korzystając w produkcji szczepionek z zarodków kurzych lub komórek zwierzęcych uzyskanych od zwierząt będących pod stałą kontrolą weterynaryjną. Coraz częściej używa się w tym celu zwierzęta typu SPF.

W szczepionkach inaktywowych, w zasadzie, zarówno drobnoustrój, który służy do uodpornienia, jak też ewentualnie inne mikroflora towarzysząca, podlegają działaniu środka inaktywującego, który pozbawia je patogenności. Niestety nie zawsze udaje się uzyskać wystarczającą inaktywację czynnika chorobowego. Proces ten nie może być bowiem prowadzony zbyt daleko, gdyż wtedy zniszczeniu ulegają też antygeny uodporniające i szczepionka traci skuteczność. Wyłania się zatem problem czułości metod wykrywania pozostających w szczepionce cząstek patogennych. Trudności w tym zakresie ilustrują następujące przykłady.

Próba biologiczna każdej serii szczepionki może być wykonana w warunkach laboratoryjnych najwyżej na kilku do kilkunastu zwierzętach gatunku, dla którego jest przeznaczona. Zwłaszcza bowiem takie zwierzęta jak bydło i trzoda chlewna są drogie i brakuje pomieszczeń dla większej ich liczby. Niekiedy zatem szczepionki, które w warunkach laboratoryjnych okazały się dla zwierząt nieszkodliwe — zastosowane w warunkach terenowych — powodowały mniejszego lub większego stopnia odczynu poszczepienne, do infekcji czynnej i choroby zaraźliwej włącznie. Jako przyczyny tego uważa się m. in. gorsze warunki bytowania zwierząt w terenie niż w pomieszczeniach instytutów naukowo-badawczych i związany z tym różny poziom odporności naturalnej na infekcję. Kolejnym powodem jest większa możliwość spotkania w terenie, wśród dużych populacji zwierzęcych, osobników o większej wrażliwości na zakażenie. U takich zwierząt nawet małe dawki nieinaktywowanego drobnoustroju mogą namnożyć się i wywołać chorobę. Stają się one następnie źródłem zakażenia dla innych osobników grupy szczepionej, które nie zdołały jeszcze uodpornić się po podaniu szczepionki, lub nawet znajdują się w tzw. negatywnej fazie odporności, cechującej się zwiększoną wrażliwością na infekcję.

Na przykładzie inaktywowanej szczepionki przeciw pryszczycy stwierdzono (4, 5), że podskórne jej podanie bydłu stanowi znacznie mniej czułą metodę wykrywania w niej obecności zakaźnego wirusa pryszczycy niż iniekcja szczepionki do błony śluzowej języka w 25 punktach.

Włączenie zatem tej metody do kontroli nieszkodliwości stanowiło postęp. Jednak, jak wynika z eksperymentów i matematycznych kalkulacji Hyslopa i Skinnera (6) nawet przy dożyłkowym podaniu szczepionki istnieje pewna, wprawdzie bardzo mała, możliwość niewykrycia wszystkich cząstek infekcyjnych wirusa. Opracowano zatem kolejną metodę kontroli nieszkodliwości szczepionki. Użyto do niej osesków mysich. Jednak i ta próba — choć nieco czulsza niż na bydło, nie okazała się doskonałą. Stwierdzono, że jeżeli 100 myszek zostało zaszczepionych dawką 0,05 ml szczepionki kontrolowanej i nie stwierdzono w tej grupie upadków lub zachorowań, to mimo tego istnieje możliwość (przy $P=0,05$), że 3% tak badanych próbek może zawierać infekcyjne cząstki wirusa. To równa się 0,0296 jednostkom infekcyjnym na dawkę mysia, a tym samym 3 dawkom infekcyjnym na 5 ml szczepionki. W takiej dawce podawana jest trójwalentna szczepionka przeciwpryszczycowa jednej krowie (7).

Istotnym postępem w stosunku do prób na bydło i mysich oseskach było wprowadzenie hodowli komórek w celu kontroli na nieszkodliwość szczepionki przeciwpryszczycowej. Metoda ta jest znacznie czulsza niż poprzednio wymienione próby. Umożliwia też zbadanie większej liczby próbek szczepionki danej serii niż dwa uprzednio podane testy (1, 9). Próba ta została udoskonalona przez zastosowanie elucji wirusa z komponentów szczepionki i jego koncentracji przy pomocy glikolu etylenowego. Uzyskany eluat bada się następnie w hodowli komórek na obecność czynnika cytopatycznego (cyt. wg 7).

Reasumując to zagadnienie należy stwierdzić, że równoczesne stosowanie w serwicznej kontroli nieszkodliwości szczepionki przeciwpryszczycowej wszystkich trzech wymienionych metod i uzyskanie wyniku ujemnego, gwarantuje z bardzo dużym prawdopodobieństwem uniknięcie odczynów poszczepiennych i nierozprzestrzenianie drogą szczepień profilaktycznych zjadliwego wirusa pryszczycy.

Kontrola na skuteczność

Podstawową zasadą kontroli skuteczności szczepionek jest badanie odporności przeciwzakaźnej u szczepionych zwierząt. W świetle poprzednio podanych stwierdzeń, wskazujących na wahania aktywności tego samego biopreparatu w poszczególnych seriach oraz różnice osobnicze zwierząt, na których określa się dany preparat — wskazane jest włączenie do kontroli na skuteczność biopreparatów standardowych, stanowiących preparat odniesienia. Ze względu na pracochłonność, tego typu porównawcze badania nie mogą być wykonywane z każdą serią danej szczepionki. Należy jednak uwzględnić je możliwie często. Jak dotychczas, liczba uznanych w skali międzynarodowej standardowych biopreparatów, sporządzonych dla celów weterynaryjnych, jest stosunkowo mała. W Central Veterinary Laboratory w Weybridge (Anglia), dostęp-

ne są standardy (2): szczepionki przeciw różycy, brucelozie ze szczepem S₁₉, inaktywowanej oraz atenuowanej szczepionki przeciw rzekomemu pomorowi drobiu, przeciw chorobom wywołanym przez drobnoustroje z rodzaju *Clostridium*, choroby Mareka i zakażnemu zapaleniu oskrzeli, jak też surowic przeciw nosówce, chorobie Rubartha i różycy świń.

Badanie biopreparatów na skuteczność obejmują kontrolę szczepu produkcyjnego i szczegółowe, z uwzględnieniem prób laboratoryjnych i terenowych, badanie skuteczności produktu końcowego. Obejmuje ono również kontrolę poszczególnych etapów cyklu produkcyjnego z uwzględnieniem warunków zakładu produkcyjnego. Tego rodzaju kontrole nie są stosowane w przypadku każdej serii biopreparatu, a głównie w trakcie jego wdrażania do praktyki i potem w odniesieniu do niektórych serii szczepionki.

Oprócz tego rodzaju czynności w odniesieniu do każdej serii większości szczepionek stosuje się kontrolę seryjną na skuteczność.

Jednym z elementów kontroli skuteczności szczepionki jest badanie produkcyjnego szczepu, polegające na określeniu jego genetycznych markerów, związanych ze zdolnością wywołania wysokiego poziomu odporności przeciwzakażnej u tego gatunku zwierzęcia, dla którego szczepionka jest przeznaczona. Należy też ustalić, czy cechy te są stabilne w kolejnych pasażach. Szczep taki powinien być następnie głęboko zamrożony w celu zapobieżenia zmienności, prowadzącej do utraty istotnych dla jakości szczepionki właściwości. Nie należy korzystać w produkcji szczepionki ze zbyt odległych pasażów szczepu produkcyjnego w stosunku do pierwszej jego generacji czyli szczepu macierzystego. Jako największą uważa się liczbę około 10-ciu pasażów, zależnie od szczepu.

Oprócz badania skuteczności szczepionki na gatunku zwierzęcia, dla którego jest ona przeznaczona — w pewnych przypadkach (np. szczepionka przeciw pryszczycy, przeciw wściekliczynie), bądź równolegle, a niekiedy nawet wyłącznie — prowadzone są próby na skuteczność na innych gatunkach zwierząt. W grę wchodzi jako tańsze zwierzęta laboratoryjne, zwłaszcza świnki morskie lub myszki. Zależnie od rodzaju szczepionki ustala się liczbę zwierząt szczepionych oraz nie szczepionych. Te ostatnie stanowią wskaźnik, czy użyty do zakażenia (challenge) zwierząt szczep jest chorobotwórczy. W przypadku większości biopreparatów, zwłaszcza wirusowych, do prób na skuteczność zalecane jest stosowanie zwierząt wolnych od przeciwciał swoistych dla drobnoustrojów, przeciw którym ma być wytworzona odporność przeciwzakaźna.

W związku z kontrolą na skuteczność ustala się dawki podawanej szczepionki, które powinny być równe tym, które stosuje się w terenie oraz znacznie od nich mniejsze. Szczepionka musi bowiem zawierać w momencie kontroli znacznie więcej dawek uodporniających niż to jest

konieczne do uodpornienia zwierzęcia, dla którego jest przeznaczona. Ten nadmiar potencjału immunogennego (ang. — potency) jest nieodzowny w związku z koniecznością przechowywania szczepionek przez różne okresy do momentu zastosowania. W tym czasie, zwłaszcza w przypadku szczepionek żywych, maleją ich właściwości uodporniające. U szczepionek inaktywowanych proces ten jest znacznie powolniejszy. Z podanymi zjawiskami łączy się pojęcie okresu ważności szczepionek. Jest to okres, w czasie którego można je uznać za skuteczne (ang. — shelf life czyli dopuszczalny okres magazynowania).

W celu ustalenia ważności szczepionki na przestrzeni określonego czasu, oprócz podawania jej w rozcieńczeniach zwierzętom, stosuje się również jej termostatowanie (temp. 37°) w ciągu 24—72 godzin lub nawet dłużej — do 7 dni. Potym okresie musi ona wykazywać zadowalające właściwości uodporniające.

Z reguły po 3 tygodniach następuje zakażenie zarówno zwierząt szczepionych, jak też nie szczepionych, zjadliwym szczepem zarazka, przeciw któremu nastąpiło uodpornienie. Do zakażenia używa się szczepów o ściśle określonych właściwościach chorobotwórczych, w dawkach, które są przedmiotem uprzednich ustaleń w oparciu o odpowiednie doświadczenia. Z reguły w dawce stosowanej do zakażenia znajduje się stosunkowo duża liczba LD₅₀ lub ID₅₀ (np. 10 000 lub więcej) zarazka. Do ustalenia LD₅₀ względnie ID₅₀ stosuje się metodę Reeda i Muencha lub inne. Szczepionkę uznaje się za skuteczną, jeśli zwierzęta nie szczepione padną lub wystąpią u nich objawy charakterystyczne dla danej choroby, a zwierzęta szczepione, wszystkie lub w dużym odsetku, pozostaną zdrowe.

Szczepienie grup zwierząt kolejnymi rozcieńczeniami szczepionki lub surowicy odpornościowej pozwala określić dawkę, przy użyciu której uodpornia się 50% szczepionych zwierząt. Określa się ją jako PD₅₀. W celu jej obliczenia używa się różnych metod statystycznych jak Reeda i Muencha, analizy probitu, Kärber i innych (8).

Obok badań na zwierzętach uodpornianych a następnie zakażanych określoną liczbą LD₅₀, do oceny skuteczności szczepionek stosuje się też próbę seroneutralizacji. W tym celu pobiera się surowicę od zwierząt, które 2—3 tygodnie temu otrzymały szczepionkę. W surowicy tej określa się właściwości neutralizacyjne w stosunku do wirusów, bakterii lub toksyn, które stanowią materiał immunogeny. Do oceny stosuje się wspomniane uprzednio metody statystyczne.

W pewnych przypadkach w ocenie skuteczności szczepionek, zwłaszcza z uwzględnieniem odporności komórkowej, zastosowanie znalazła próba hamowania migracji makrofagów.

Przy niektórych szczepionkach atenuowanych, np. przeciw różycy świń, lub inaktywowanych, stosowanych przeciw niektórym chorobom zakaźnym, nie każda seria szczepionki badana jest

na skuteczność. Badania tego rodzaju przeprowadza się okresowo, ze szczególnym uwzględnieniem szczepu produkcyjnego.

Antygeny i surowice diagnostyczne

Osobny dział kontroli biopreparatów stanowi kontrola antygenów i surowic diagnostycznych. Obejmuje ona podobnie, jak przedstawione w odniesieniu do kontroli skuteczności szczepionek bardzo ściśle określenie właściwości szczepów drobnoustrojów używanych do produkcji antygenów lub surowic diagnostycznych. Sposób ich przechowywania jest również taki sam jak podano uprzednio. Niezbędne jest też określenie standardowych podłoży koniecznych do namnażania szczepów produkcyjnych. Standaryzacji podlegają również metody określania swoistości i aktywności tychże preparatów. Obok testów serologicznych wykorzystuje się ocenę wyników w oparciu o metody matematyczne.

W skali międzynarodowej zostały stworzone dla niektórych z preparatów diagnostycznych standardy. W Central Veterinary Laboratory (2) znajdują się obecnie do wykorzystania w skali międzynarodowej: drugi standard międzynarodowy surowicy anty-*Brucella* — *Br. abortus*, surowica anty-*M. gallisepticum* oraz szczep służący jako swoisty dla niej antygen, surowica anty-*S. pullorum* wraz ze szczepem *S. pullorum* standard i variant, surowica i szczep rzekomego po-

moru drobiu jak też influenzy koni. Dostępne są tuberkuliny PPD ludzka i ptasia.

Jak dotychczas antygeny diagnostyczne nie zostały ujęte ani w ramy Farmakopei Europejskiej ani też wspomnianego Medicines Act. Brakuje szeregu standardów. Konieczne jest opracowanie licznych metod, umożliwiających standaryzację antygenów i surowic diagnostycznych. Badania te są wprawdzie podejmowane, jednakże jak dotąd, dotyczą tylko nielicznych chorób zakaźnych. W odniesieniu do pozostałych są one w toku i wymagają jeszcze długoletnich badań. Badania tego rodzaju są jednakże niezbędne w celu usprawnienia diagnostyki chorób zakaźnych, która obok profilaktyki swoistej jest ważnym elementem ich zwalczania.

Piśmiennictwo

1. Anderson E. C., Capstick P. B., Mowat G. N., Leech F. B.: J. Hyg. Camb. 68, 159, 1970.
2. Brinley Morgan W. J.: 8 Conf. O.I.E. Reg. Comm. Eur. Hamburg 4-7 July 1978, Rep. No 101.
3. Ewald F. W., Moos M.: 8 Conf. O.I.E. Reg. Comm. Eur. Hamburg 4-7 July 1978, Rep. No 103.
4. Henderson W.M.: J. Hyg. Camb. 50, 182, 1952.
5. Henderson W. M.: J. Hyg. Camb. 50, 195, 1952.
6. Hyslop N., Skinner H. H.: Bull. Off. int. Epizoot. 61, 1091, 1964.
7. Pay T. W. F. P.: Br. vet. J. 134, 76, 1978.
8. Pay T. W. F. P., Parker M. J.: Rev. biol. Standard. 35, 369, 1977.
9. Pay T. W. F. P., Telling R. C., Kitchener B. L., Southern J.: Rep. Meet. Res. Group Standing tech. Comm. Eur. Comm. control FMD. Tübingen. 1971, s. 81.
10. Pilet Ch., Person J. M.: Rec. Méd. vét. 154, 559, 1978.
11. Schneider W.: 8 Conf. O.I.E. Red. Comm. Hamburg 4-7 July 1978, No 105.

Adres autora: prof. dr Marian Truszczyński, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy.

EMA POLITYŃSKA-BANAŚ, DANUTA CIOSEK, ANTONI DZIĄBA

Serotypy hemolitycznych szczepów *E. coli* wyizolowanych od prosiąt w latach 1971-1976

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie
Z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Weterynarii w Puławach

Badania serologiczne szczepów *E. coli*, wyizolowanych z przypadków chorobowych, zarówno od świń, jak i innych gatunków zwierząt oraz człowieka, mają znaczenie praktyczne, szczególnie z epidemiologicznego i epizootycznego punktu widzenia (3). Między innymi są one istotne jako badania wstępne, poprzedzające dobór szczepów *E. coli* do celów produkcji szczepionki. W związku z tym, celem obecnej pracy było określenie serologiczne szczepów *E. coli* wyizolowanych od prosiąt, pochodzących z różnych ferm Tuczku Przemysłowego Trzody Chlewnej w Polsce.

Materiał i metody

Zwierzęta doświadczalne. Badaniom poddano prosięta w wieku ok. 3 miesiące, zgrupowane w fermach Tuczku Przemysłowego Trzody Chlewnej w Polsce (fermy H, M, Ż, J, St. N, M). Do badań bakteriologicznych pobierano materiał od wszystkich prosiąt znajdujących się w chlewni lub w boksie, u których stwierdzono objawy charakterystyczne dla formy jeli-

towej kolibakteriozy. U zwierząt tych występowała biegunka łącznie z brakiem lub zmniejszeniem apetytu oraz osowiałość i w niektórych przypadkach obniżoną wewnętrzną ciepłotą ciała.

Szczepy bakteryjne. Przedmiotem badań było 190 hemolitycznych szczepów *E. coli*, wyizolowanych od prosiąt, pochodzących z hodowli, w których stwierdzano przypadki spontanicznej kolibakteriozy, w latach 1971/2, 1975 i 1976. Szczepy izolowano z prób kału i wymazów z odbytnicy badanych prosiąt według następującego schematu: każdy badany materiał posiewano metodą sektorkową na agar z krwią; po 24-godzinnej inkubacji odsiewano drogą losową z każdej płytki po 3 kolonie hemolitycznych szczepów *E. coli* również metodą sektorkową na podłoże MacConkey'a. Z oczyszczonych w ten sposób szczepów zakładano czyste hodowle hemolitycznych szczepów *E. coli*, po 3 dla każdego badanego materiału. Do chwili badań serologicznych szczepy przechowywano na agarze zwykłym.

Badania biochemiczne. Wyizolowane szczepy sprawdzano na krótkim szeregu biochemicznym obejmującym podłoże Kliglera, Christensena, 10% laktozę pod parafiną oraz podłoże na indol (17, 20). Badania serologiczne polegały na określaniu u wyizolowanych szczepów *E. coli* antygeny O i antygeny K. Antygen O