

JOANNA ŁASKRZEWSKA, JANUSZ WAWRZKIEWICZ

Badania nad uzyskaniem stabilnego antygenu diagnostycznego „Avipestignostu”

Z Puławskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego Biowet w Puławach
Z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego
AR w Lublinie

W wyniku masowych szczepień prowadzonych od wielu lat w naszym kraju, rzekomy pomór drobiu przestał być problemem w hodowli drobiu. Zapotrzebowanie na szczepionkę, pomimo niskiej ceny, stale maleje. Należy zatem liczyć się z pewnym niebezpieczeństwem ponownego wystąpienia przypadków chorobowych w wyniku znacznego ograniczenia lub zaprzestania szczepień profilaktycznych. Zakład produkcyjny musi być więc przygotowany, by w każdej chwili przekazać do dyspozycji służby weterynaryjnej zarówno szczepionkę, jak i antygen diagnostyczny. Dlatego też coraz częściej produkowane są preparaty w postaci liofilizowanej, co zapewnia im znacznie dłuższą trwałość i umożliwia przechowywanie przez szereg miesięcy, a nawet lat.

Okres ważności preparatów zależy od wielu czynników, między innymi od koncentracji wyjściowej zarodka, warunków liofilizacji, wilgotności resztkowej, warunków przechowywania liofilizatów oraz stosowanego osłaniacza. Jest rzeczą znaną, że osłaniacz odpowiedni dla jednych wirusów wykazuje często małą przydatność dla innych. Do najpopularniejszych osłaniaczy, zwanych też nośnikami, zalicza się surowicę zwierzęcą, odtłuszczone mleko, roztwory żelatyny, peptonu, glukozy, sacharozy, a ostatnio i dekstranu. Na trwałość preparatów mają wpływ także takie czynniki, jak: pH osłaniacza, jego ciśnienie osmotyczne i obecność różnych jonów (6).

Celem niniejszej pracy było uzyskanie antygenu diagnostycznego zwanego Avipestignostem w postaci zlokalizowanej i określenie jego terminu ważności.

Materiał i metody

Do badań użyto niejadliwego szczepu LaSota wirusa ND namnożonego na 10-dniowych zarodkach kurzych, zakażonych dawką około 10^4 ID₅₀. Po 72-godzinnej inkubacji w temperaturze 37,5 — 37,8°C, przy wilgotności 60—70%, zarodki chłodzono przez 24 godziny w temperaturze 4°C. Z kolei pobierano płyn omocznioowo-owodniowy i próbki poddawano procesowi liofilizacji.

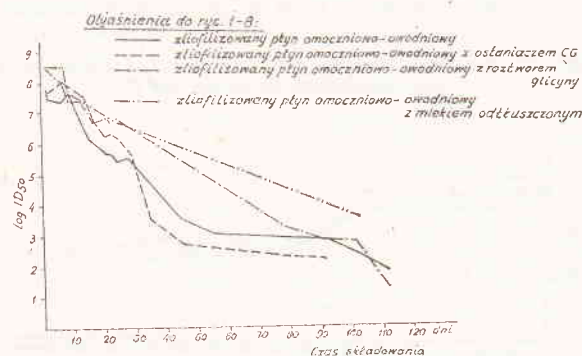
Jako osłaniacze (nośniki) do liofilizacji zastosowano:

- 2% roztwór glicyny — glikokolu (4),
- mleko odtłuszczone,
- nośnik CG stosowany jako osłaniacz do liofilizacji wirusa nosówki o następującym składzie: sacharoza — 74,62 g, KH₂PO₄ — 0,51 g, K₂HPO₄ — 1,25 g, glutaminian potasu — 3,0 ml, neomycyna 125 mg, Aqua bidest. ad 1000,0 ml.

Wykonanie liofilizacji. Zebrane płyny omocznioowo-owodniowe, zawierające wirus, po zmieszaniu z poszczególnymi osłaniaczami poddano liofilizacji w aparacie firmy Usifroid. Preparaty zamrażano przez nawiew powietrza w temperaturze od -50°C do -55°C. Początkowa temperatura podczas pierwszej fazy liofilizacji (wysuszania wstępnego) wynosiła -30°C. Po procesie sublimacji w drugiej fazie (dosuszania) przeprowadzanej w tych samych aparatach temperatura wynosiła +20°C do +24°C. Zatapienie wykonywano w atmosferze azotu. Ciśnienie końcowe w aparacie liofilizacyjnym wynosiło 0,03 Pa, natomiast wilgotność resztkowa wynosiła 1—1,5%. Miano ID₅₀ antygenu diagnostycznego określano bezpośrednio po liofilizacji, a następnie w różnych przedziałach czasowych w zależności od temperatury przechowywania liofilizatu. W tym celu poszczególnymi rozcieńczeniami wirusa zakażano po 5 zarodków, które po 3 dniach inkubacji niezależnie od żywotności schładzano w temp. 4°C. Następnie pobierano płyn omocznioowo-owodniowy, badano w kierunku własności hemaglutynacyjnych i obliczano ID₅₀ wg metody Reeda i Muencha (7). Miano hemaglutynacyjne (HA) poszczególnych preparatów określano przy użyciu płynu fizjologicznego NaCl oraz 0,75% zawiesiny czerwonych krwinek kurzych, pobranych co najmniej od 3—4 kur.

Wyniki i omówienie

Do badań użyto antygen diagnostyczny w postaci wirusa ND, namnożonego na zarodkach kurzych i zawartego w płynie omocznioowo-owodniowym z dodatkiem 3 różnych osłaniaczy. Liofilizaty te przetrzymywano w różnych temperaturach i badano w celu określenia stopnia żywotności puli wirusowej i jej przydatności do odczynów HA. Wyniki badania miana ID₅₀ oraz HA w zależności od temperatury i okresu przechowywania ilustrują ryc. 1—8.



Ryc. 1. Krzywa miana ID₅₀ antygenu LaSota przechowywanego w temp. 37°C

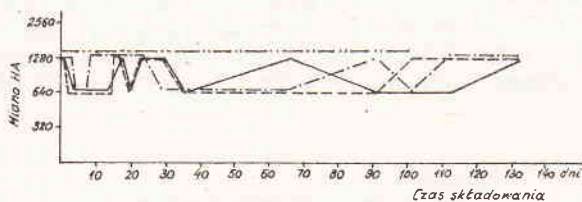
Przeprowadzone badania wykazały, że:

- wirus NDV poddany liofilizacji bez osłania-
cza, jak i pod osłoną użytych nośników,
i przetrzymywany w 37°C przez 3 miesią-
ce, uległ w silnym stopniu inaktywacji; jego
miano spadło bowiem aż o około 5 log,
- ten sam wirus zliofilizowany i przetrzymy-
wany w temperaturze pokojowej (19°C)
inaktywował się w małym stopniu w ciągu
3 miesięcy we wszystkich badanych prób-
kach niezależnie od użytego osłaniacza jak
również bez nośnika; znaczniejszy spadek
żywołności zaobserwowano dopiero po 266
dniach, kiedy to miano wirusa obniżyło się
o 2–3 log,
- w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ wirus NDV zacho-
wywał swą żywołność na tym samym po-
ziomie przez 458–490 dni tylko w obecno-
ści osłaniacza CG oraz mleka odtłuszczone-
go; dodatek glikokolu nie wpływał na sto-
pień zachowania żywołności badanego wi-
rusa,
- przechowywanie wirusa NDV w -18°C
przez 458 dni nie powodowało spadku jego
żywołności w obecności nośnika CG oraz
osłaniacza glikokolowego; nieznaczny spa-
dek żywołności zanotowano tylko w próbce
bez osłaniacza (kontrola).

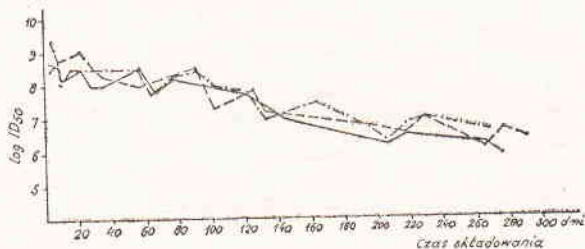
Miano HA wirusa utrzymywały się prawie
na tym samym poziomie w granicach 640—
1280 przez cały okres trwania badań nieza-
leżnie od obecności osłaniacza i temperatury
składowania.

Dyskusja

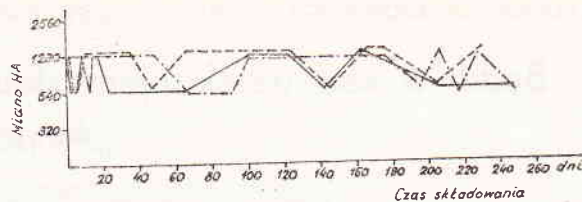
Badania nad aktywnością liofilizowanego
preparatu NDV opartego na szczepie LaSota
w obecności mleka kwaśnego oraz mleka od-
tłuszczonego sproszkowanego przeprowadzili
w Polsce Chruściel i Jastrzębski (2). Autorzy



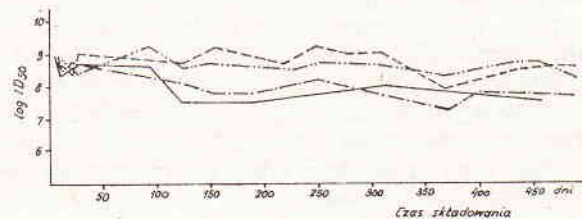
Ryc. 2. Krzywa miana HA antygeny LaSota prze-
trzymywanego w temp. 37°C



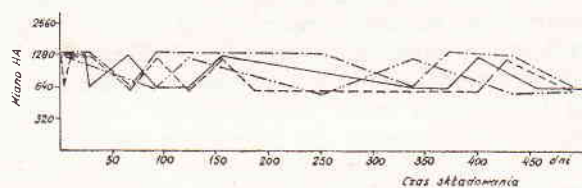
Ryc. 3. Krzywa miana ID_{50} antygeny LaSota prze-
trzymywanego w temp. 37°C



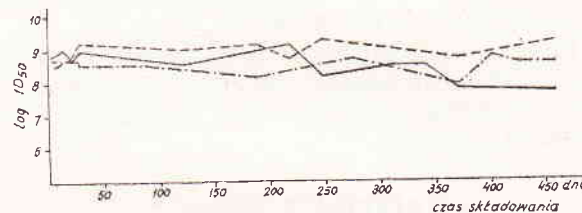
Ryc. 4. Krzywa miana HA antygeny LaSota prze-
trzymywanego w temp. 19°C



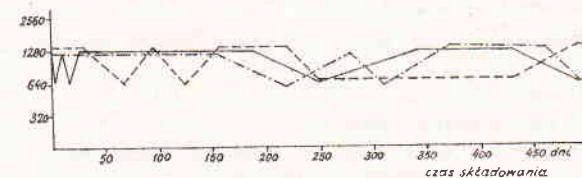
Ryc. 5. Krzywa miana ID_{50} antygeny LaSota prze-
trzymywanego w temp. 4°C



Ryc. 6. Krzywa miana HA antygeny LaSota prze-
trzymywanego w temp. 4°C



Ryc. 7. Krzywa miana ID_{50} antygeny LaSota prze-
trzymywanego w temp. -18°C



Ryc. 8. Krzywa miana HA antygeny LaSota prze-
trzymywanego w temp. -18°C

ci podali zarówno sposób produkcji szczepionki, jak i warunki liofilizacji i wykazali, że w obecności tych nośników miano ID_{50} spadło zaledwie o około 1,5 log, po 6—9 miesięcznym przechowywaniu w 4°C, zaś miano HA utrzymywało się w tym czasie na stałym, wysokim poziomie. Nieco gorsze wyniki otrzymała Borzemska i wsp. (1), którzy oceniali wyniki liofilizacji szczepionki NDV (szczep F-107 Asplin) bez osłaniaczy. Przechowując tę szczepionkę w temperaturze -10°C nie stwierdzili spadku miana wirusa, natomiast nieznacznie obniżyło się miano HA. Temperatura pokojowa okazała się niekorzystna do składowania szczepionki, która traciła swą ważność po 5 miesiącach.

Wyniki badań własnych dotyczące utrzymywania się miana ID_{50} wirusa są najbardziej zbliżone do danych przedstawionych przez Chruściela i Jastrzębskiego (2). Jest to prawdopodobnie wynikiem zastosowania bardzo zbliżonych parametrów liofilizacji i tego samego szczepu wirusa. Przetrzymywanie liofilizatów w 37°C miało na celu wykazanie stopnia inaktywacji wirusa w warunkach zdecydowanie niekorzystnych. Na ogół przyjmuje się, że jeden dzień przetrzymywania wirusa w 37°C odpowiada około 1 miesiącowi składowania w 4°C.

Porównując wyniki badań własnych zaobserwowano spadek żywotności wirusa NDV przetrzymwanego w 37°C już po około 2 tygodniach niezależnie od użytego osłaniacza, natomiast w 4°C miano wirusa obniżyło się dopiero po 122—150 dniach i to tylko w odniesieniu do wirusa zawartego w samym płynie omocznio-owo-odwodniowym.

Dodanie do wirusa osłaniacza CG lub mleka przedłużyło zachowanie żywotności szczepów LaSota na tym poziomie przez co najmniej 458 dni, co odpowiadałoby około 15 dniom składowania w 37°C. Tak więc przy użyciu odpowiedniego nośnika stwierdza się wprost proporcjonalny stosunek 1 : 30 pomiędzy temperaturą składowania w 37°C i w 4°C a żywotnością wirusa NDV. Jeszcze lepsze wyniki zanotowano w przypadku badania właściwości hemaglutynacyjnych wirusa. Miano HA szczepu wirusowego nie obniżało się bowiem w sposób istotny, niezależnie od rodzaju osłaniacza, nawet przy przetrzymywaniu liofilizatów w 37°C przez okres 133 dni. Jeżeli wymieniona korelacja zachodząca pomiędzy temperaturą a żywotnością wirusa jest adekwatna również i dla miana HA, wówczas trwałość preparatu diagnostycznego Avipestignostu przechowywanego w 4°C i liofilizowanego zwłaszcza w obecności mleka odtłuszczonego jako osłaniacza, wynosi około 12 lat. Chruściel i Jastrzębski (2) nie prowadzili badań pod tym kątem, niemniej jednak zaobserwowali również utrzymywanie się początkowego miana HA na stałym poziomie przez cały okres trwania doświadczenia tj. 2 lat.

Wnioski

1. Liofilizowany preparat diagnostyczny Avipestignost może być przechowywany w 4°C przez kilka lat bez obawy spadku miana hemaglutynacyjnego.

2. Spośród 3 badanych nośników najlepsze właściwości ochronne wykazuje mleko odtłuszczone; nieco gorsze wyniki uzyskuje się po zastosowaniu nośnika glikokolowego lub CG.

3. Żywotność szczepu LaSota wirusa ND utrzymuje się w preparacie liofilizowanym w obecności badanych osłaniaczy i składowanym w 4°C ponad 12 miesięcy na stałym i niezmiennym wysokim poziomie.

Piśmiennictwo

1. Borzemska W., Marek K., Twardowski K.: *Medycyna Wet.* 17, 463, 1961.
2. Chruściel Cz., Jastrzębski T.: *Medycyna Wet.* 20, 161, 1964.
3. Dóyle T. M.: *J. comp. Path.* 40, 144, 1927.
4. Imamura S., Matsui H., Ashizawa J.: *Jap. J. exp. Med.* 44, 191, 1974.
5. Jaroszek W.: *Nowości Wet.* 4, 449, 1974.
6. Newmann K.: *Brundriss der Gefriertrockung.* Frankfurt, 1955.
7. Reed L. J., Muench H.: *Am. J. Hyg.* 27, 493, 1938.
8. Wisłocki S.: *Acta microbiol. pol.* 2, 14, 1953.

Adres autora: mgr Joanna Łaskarzewska, ul. Kollataja 47/41, 24-100 Puławy.

Ласкажевская И., Вавржкiewicz Я. — Исследования по получению стабильного диагностического антигена „Avipestignost”.

Проведенные исследования имели целью получение антигена Avipestignost в лиофилизованном виде и определение сроков его важности. Для исследования был использован диагностический антиген в виде вируса ND, размноженный на куриных зародышах и содержащийся в аллантоидно-амниотической жидкости с прибавкой трех различных обволакивающих средств. В качестве их были применены: раствор глицина, обезжиренное молоко и носитель. Эти лиофилизаты держали в разных температурах и исследовали для определения степени жизнеспособности вирусного фонда и его пригодности для реакций HA. Из полученных данных вытекает, что лиофилизированный препарат „Avipestignost” в присутствии исследуемых обволакивающих средств может храниться в темп. 4°C сверх 12 месяцев без отрицательного влияния на жизнеспособность штамма LaSota вируса ND и несколько лет без опасений относительно понижения гематтлютинационного титра.

Łaskarzewska J., Wawrzekiewicz J. — **Examinations on the stable diagnostic antigen Avipestignost.**

The examinations were performed to obtain a stable diagnostic antigen in the form lyophilized. As an antigen there was used NDV propagated in chicken embryonated eggs contained in the chorio-amniotic liquid with the addition of three different carriers (glycocoll, milk, CG-composition). Lyophilized virus was stored at various temperatures and its titer and usefulness haemagglutination test were determined. The authors came to the conclusion that the viral preparation Avipestignost stored at 4°C preserved the high titer for over 12 months, and haemagglutination capacity lasted for several years without any decrease of its value.