

GRAŻYNA PAPROCKA

Ocena namnażania wirusa pryszczycy w hodowli komórek oraz środków inaktywujących w celu uzyskania skutecznej szczepionki przeciwpryszczycowej

Zakład Badania Pryszczycy w Zduńskiej Woli Instytutu Weternarii w Puławach,
ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

Stosowane w praktyce szczepionki przeciwpryszczycowe różnią się rodzajem użytego adiuwantu (4, 18), metodą namnażania wirusa (12, 13, 21, 23), jak również sposobem jego inaktywacji (16). Do niedawna powszechnie używano wirusa inaktywowanego formaliną namnożonego w nabłonku języków bydłych (metoda Frenkla, 9). Obecnie najszersze zastosowanie mają szczepionki zawierające wirus namnożony w hodowli komórek. W ostatnich latach w piśmiennictwie pojawiło się szereg prac poświęconych zastosowaniu skuteczniejszych od formaliny środków inaktywujących, do których należą pochodne etylenoiminy (1, 6, 14, 24).

Produkcja szczepionki z wirusa namnożonego w hodowli komórek umożliwia ograniczenie ilości białka balastowego i skuteczną eliminację zakażeń ubocznych, ponadto zmniejsza niebezpieczeństwo wydostania się wirusa poza zakład produkujący szczepionkę oraz ogranicza wydatki i koszty techniczne związane z zakażeniem i ubojem zwierząt.

Celem podjętych badań było sprawdzenie nieszkodliwości, aktywności i skuteczności szczepionki sporządzonej z wirusa pryszczycy namnożonego w hodowli komórek nerki cielęcej, inaktywowanego acetyletylenoiminą (AEI), w porównaniu do preparatu inaktywowanego formaliną.

Materiał i metody

Hodowle komórkowe. W badaniach zastosowano hodowle komórek nerki cielęcej w butlach obrotowych. Podłoże wzrostowe stanowił płyn Hanksa z dodatkiem 0,5% hydrolizatu laktoalbuminy, 10% inaktywowanej surowicy cielęcej i 1% Tryptic soy broth oraz antybiotyki (100 j. penic./ml, 100 mcg streptomycyny/ml). Zawiesinę komórkową w ilości 50 ml, zawierającą w 1 ml około 4×10^5 komórek, rozlewano do 500 ml butelek cylindrycznych, używanych do przechowywania podłoża do hodowli komórek. Wykorzystano aparat rotacyjny, wykonany przez Wytwórnę Surowic i Szczepionek w Warszawie, umieszczony w ciepłarni CWE-2; pozwalał on na poruszanie od 1 do 8 butelek z szybkością 4 obrotów na godzinę. Czas wzrostu hodowli wynosił 4–5 dni. Jako podłoża utrzymującego używano płynu Earle'a, produkcji Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie.

Szczepy wirusowe. Badania przeprowadzono ze szczepami typów O, A, C. Szczep typu O był pasażowany 5-krotnie przez nabłonek języka bydła, a jego miano infekcyjne wynosiło $10^{8,0}$ TCID₅₀/ml, szczep typu A stanowił 12 pasaż w nabłonku języka bydła i jego miano infekcyjne wynosiło $10^{8,2}$ TCID₅₀/ml, szczep typu C posiadał miano infekcyjne $10^{7,5}$ TCID₅₀/ml

i był pasażowany 16-krotnie w nabłonku języka bydła. Hodowle zakażano wirusem pryszczycy typu O, A i C dawką 0,5–0,8 TCID₅₀ na komórkę. Skład populacji szczepów ujednolicono metodą klonalną, wzorując się na pracy Mayra (11). Badane szczepy zidentyfikowano za pomocą surowic odpornościowych metodą seroneutralizacji i w odczynie wiązania dopełniacza (OWD).

Szczepionki. Przygotowano szczepionki o takim samym składzie, podanym niżej, inaktywowane 0,05% formaliną lub 0,05% acetyletylenoiminą (AEI) w oparciu o metodę podaną przez Mowata (14). Inaktywacja przebiegała w temp. 26°C. Przebieg inaktywacji badano określając dynamikę unieczynniania wirusa metodą mianowania w hodowli komórek nerki cielęcej. Szczepionki zawierały około 60% antygenu wirusowego o mianie infekcyjnym $10^{7,0}$ TCID₅₀/ml dla typu O, $10^{7,5}$ TCID₅₀/ml dla typu A i C. Ponadto w skład każdej serii szczepionki wchodziło około 35% wodorotlenku glinu, 5% glicerolu i 0,5% saponiny.

Zwierzęta doświadczalne. Nieszkodliwość i skuteczność szczepionek badano na bydle w wieku 1–2 lat. Przed przystąpieniem do badań pobierano próbki krwi od bydła i określano poziom przeciwciał zobojętniających.

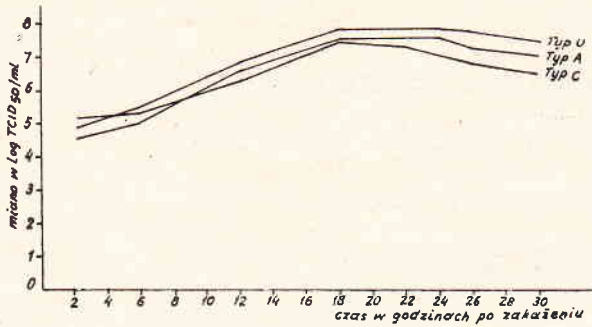
Badanie nieszkodliwości przeprowadzono na bydle, wstrzykując 1 dawkę (to jest 5 ml) monowalentnej badanej szczepionki w błonę śluzową języka. Czwartego dnia po szczepieniu dojęzykowym bydło szczepiono podskórnie, wprowadzając do fałdu szyjnego przedpiersiowego 15 ml szczepionki. Po 10 dniach obserwacji zwierzęta poddawano ubojowi i badaniu poubojowemu. Nieszkodliwość szczepionek badano również w hodowli komórek nerki cielęcej metodą podaną przez Dannacher i wsp. (2).

Po zakończonej ocenie w kierunku nieszkodliwości, badano właściwości immunogenne szczepionki. Dawka uodporniająca wynosiła 5 ml. Stopień nabytej odporności badano po 21 dniach od szczepienia. Zwierzęta szczepione i kontrolne zakażano dawką 10 000 IDB₅₀ homologicznego wirusa; inoculum wstrzykiwano w błonę śluzową języka.

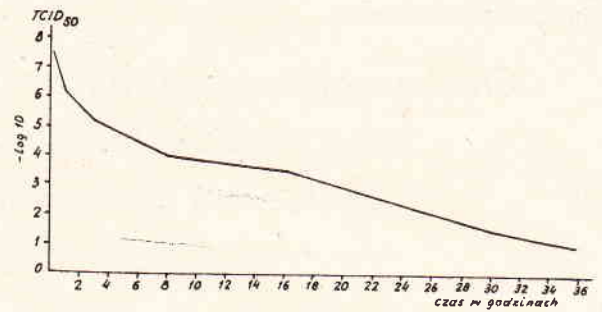
Badania serologiczne. Odczyn zobojętniania wykonywano wg techniki opisanej przez Mayra (11). Miana surowic obliczano jako 50% dawkę zobojętniającą wg wzoru Reeda i Muencha (17).

Wyniki i omówienie

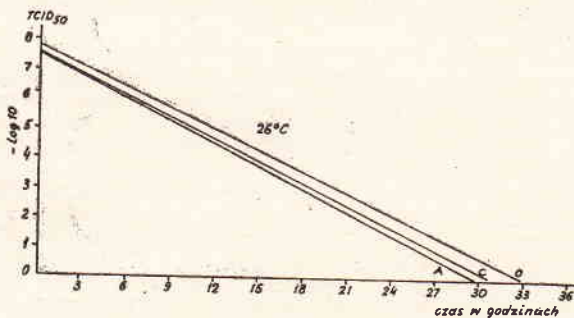
Wyniki badań cyklu replikacyjnego wirusa pryszczycy w hodowli komórek nerki cielęcej przedstawione na ryc. 1 wykazały, że badane szczepy wirusa typu A i O osiągały zawsze najwyższe wartości miana TCID₅₀ po 18–24 godzinach namnażania w temperaturze 37°C. Najwyższe miano dla typu C stwierdzono po 18 godzinach inkubacji, natomiast po 24 godzinach następował spadek stężenia cząstek wirusa. Wyniki te są zbliżone do uzyskanych przez Ubertiniego i wsp. (22). Sellers (19) i Graves (8) określili czas zbioru wirusa na 18–



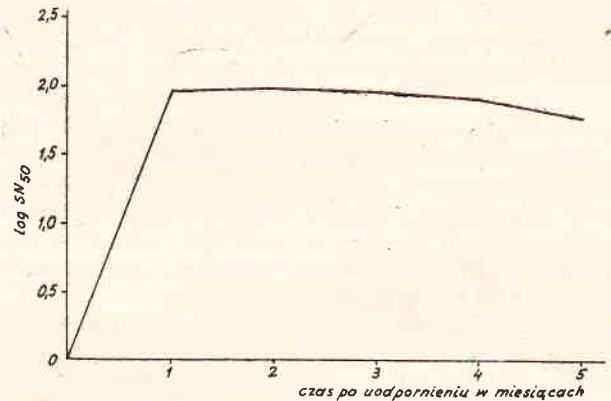
Ryc. 1. Dynamika namnażania wirusa pryszczycy w hodowli komórek nerki cielęcej w aparacie rotacyjnym



Ryc. 3. Dynamika inaktywacji wirusa pryszczycy typu O 0,05% formaliną (temperatura 26°C)



Ryc. 2. Dynamika inaktywacji wirusa pryszczycy typu A, C, O 0,05% acetyletylenoiminą (AEI) (temperatura 26°C)



Ryc. 4. Poziom przeciwciał SN w surowicy bydła uodpornionego szczepionką typu O inaktywowaną acetyletylenoiminą (AEI)

42 godziny, Patty i May (15) na 24 godziny, a Dinter i Phillipson (3) na 36 godzin. Różnice wyników świadczą o tym, że czas inkubacji dla uzyskania maksymalnego plonu wirusa jest różny dla różnych jego szczepów i rodzajów hodowli.

Wyniki badań dotyczące inaktywacji wirusa pryszczycy AEI lub formaliną przedstawiono na ryc. 2 i 3. Uzyskane dane wykazały, że niezbędny czas inaktywacji przy użyciu 0,05% AEI w temp. 26°C dla typu O wirusa pryszczycy wynosił 33 godziny, dla typu C 31 godzin, a dla typu A 30 godzin. W literaturze światowej dane dotyczące inaktywacji przy zastosowaniu AEI są dość zróżnicowane, w zależności od stężenia AEI, temperatury, jak również specyficznych właściwości szczepów wirusa (5, 7, 20). W przypadku użycia 0,05% formaliny w temp. 26°C całkowitą inaktywację wirusa typu A, C, O uzyskano po 48 godzinach. Wszystkie serie szczepionek doświadczalnych, zarówno inaktywowanych formaliną, jak i AEI, były nieszkodliwe.

Wyniki oceny właściwości uodporniających szczepionek typu O, A i C ilustruje tab. 1. Jak wynika z przedstawionych danych użyte do doświadczeń szczepy wirusa pryszczycy typu O, A i C, namnożone w hodowli komórek nerki cielęcej, posiadały dobre właściwości immunogenne. Najwyższą aktywność posiadała szczepionka typu O, po zastosowaniu której wartość $\bar{x} \log SN_{50}$ wynosiła 1,99. Zbliżone

Tab. 1. Poziom przeciwciał u krów szczepionych szczepionką przeciwko pryszczycy sporządzoną z wirusa namnożonego w rotacyjnej hodowli komórek nerki cielęcej

Rodzaj szczepionki	Numery ewidencyjne zwierząt	Wyniki badania serologicznego ($\log_{10} SN_{50}$) *
Typ A	6452	1,85
	6411	1,93
	3112	1,87
	6500	1,95
		$\bar{x}g=1,90$
Typ C	3541	1,65
	3083	1,50
	3092	1,50
	3517	1,73
		$\bar{x}g=1,59$
Typ O	1212	2,10
	1010	1,95
	1404	2,10
	1368	1,80
		$\bar{x}g=1,99$

Objaśnienie: * w surowicach pobranych przed szczepieniem przeciwciał nie stwierdzono ($\log_{10} SN_{50} \leq 0,35$).

właściwości uodporniające cechowały szczepionkę typu A, średnia geometryczna z miana badanych surowic wynosiła 1,9. Nieco słabsze właściwości uodporniające posiadała szczepionka typu C; po jej zastosowaniu wykazano

przeciwciała SN o mianach, których średnia geometryczna wynosiła 1,59.

Jak wynika z ryc. 4 po zastosowaniu szczepionki typu O przygotowanej z wirusa namnożonego w hodowli komórek nerki cieliczej stwierdzono co najmniej 5 miesięczny okres trwania odporności u szczepionego bydła. Badania poziomu przeciwciał zobojętniających w surowicach uodpornionych zwierząt przez ten okres wskazują na wysoką wartość $\bar{x}glog SN_{50}$ przeciwciał przeciwko wirusowi pryszczycy, która wynosiła po 1, 2, 3, 4, 5 miesiącach od szczepienia odpowiednio 1,99; 2,02; 1,95; 1,91; 1,53. Badania Maćkowiaka i wsp. (10) wykazały, że po jednokrotnym szczepieniu bydła przeciwciała zobojętniające osiągają najwyższy poziom w okresie 3—6 tygodni i opadają w ciągu 3—4 miesięcy.

Tabela 2 przedstawia wyniki doświadczeń dotyczących porównania właściwości immunogennych szczepionek typu O inaktywowanych formaliną lub acetyletylenoiminą (AEI). Uzyskane rezultaty badań świadczą o braku znaczących różnic między właściwościami uodporniającymi szczepionek przygotowanych z użyciem wymienionych środków inaktywujących. Po szczepieniu 1 dawką szczepionki formolowej uzyskana wartość $\bar{x}glog SN_{50}$ przeciwciał przeciwko wirusowi pryszczycy wynosiła 1,90, natomiast po szczepieniu 1/4 dawki tej szczepionki 1,76. Po zastosowaniu 1 dawki szczepionki inaktywowanej acetyletylenoiminą średnia geometryczna mian wynosiła 2,06, a po zastosowaniu 1/4 dawki tej szczepionki 1,85. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że wszystkie zwierzęta uodpornione 1/4 dawki szczepionki formolowej oraz inaktywowanej acetyletylenoiminą były odporne na zakażenie doświadczalne wykonane po 21 dniach. Uzyskane wyniki potwierdzają dane Duranda i wsp. (5), który również nie stwierdzili różnicy między właściwościami uodporniającymi szczepionek przygotowanych z użyciem formaliny i acetyletylenoiminy. Wg tych autorów zastosowanie AEI wydaje się przede wszystkim zmniejszać ryzyko infekcyjności i rokuje nadzieję na otrzymanie szczepionki o absolutnej nieszkodliwości. Inni autorzy wykazali, że AEI nie zmienia struktury antygenowej wirusa pryszczycy. Immunogenność szczepionek inaktywowanych przy użyciu AEI była analogiczna, lub niekiedy znacznie wyższa, od inaktywowanych formaliną (cyt. za 16).

W tab. 3 przedstawiono wyniki badań właściwości uodporniających szczepionek typu O inaktywowanych formaliną lub acetyletylenoiminą (AEI) po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 4°C. Jak wynika z danych tab. 3, u zwierząt uodpornionych szczepionką inaktywowaną AEI nie stwierdzono żadnych zmian chorobowych w wyniku doświadczalnego zakażenia, średnia geometryczna mian wy-

Tab. 2. Porównanie właściwości immunogennych szczepionek inaktywowanych formaliną lub acetyletylenoiminą (AEI)

Rodzaj szczepionki	Dawka szczepionki	Numery ewidencyjne zwierząt	Wyniki badania serologicznego ($\log_{10} SN_{50}$) *	Wyniki zakażenia doświadczalnego	
Szczepionka typu O inaktywowana formaliną	1	1218	1,71	00000	
		1195	1,71	00000	
		2824	2,10	00000	
		2829	2,10	00000	
	1/4	2802	1,71	00000	
		4303	1,95	00000	
		4438	1,65	00000	
		4383	1,71	00000	
				$\bar{x}g = 1,90$	
				$\bar{x}g = 1,76$	
Szczepionka typu O inaktywowana AEI	1	4431	2,10	00000	
		4439	1,95	00000	
		493	2,10	00000	
		1260	2,10	00000	
	1/4	3362	1,87	00000	
		3363	1,95	00000	
		2822	1,65	00000	
		2757	1,95	00000	
				$\bar{x}g = 2,06$	
				$\bar{x}g = 1,85$	
Kontrola		84	$\leq 0,35$	+++++	
		87	$\leq 0,35$	+++++	

Objaśnienia: * W surowicach pobranych przed szczepieniem przeciwciał nie stwierdzono ($\log_{10} SN_{50} \leq 0,35$), 0 brak miejscowych i uogólnionych objawów zakażenia, + obecność zmian: pierwszy znak + przedstawia zmiany miejscowe na błonie śluzowej języka, następane oznaczają uogólnione zmiany chorobowe na kończynach.

Tab. 3. Wyniki badania właściwości uodporniających szczepionek inaktywowanych acetyletylenoiminą (AEI) lub formaliną po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 4°C

Rodzaj szczepionki	Numery ewidencyjne zwierząt	Wyniki badania serologicznego ($\log_{10} SN_{50}$) *	Wyniki zakażenia doświadczalnego
Szczepionka typu O inaktywowana AEI	B 75838	1,50	00000
	7911	1,64	00000
	B 4210	1,70	00000
	a 9345	1,70	00000
			$\bar{x}g = 1,63$
Szczepionka typu O inaktywowana formaliną	9918	1,34	00000
	7878	0,75	+++++
	1780	1,20	00000
	B 1789	0,60	+++++
			$\bar{x}g = 0,97$
Kontrola	4337	$\leq 0,35$	+++++
	9337	$\leq 0,35$	+++++
	1566	$\leq 0,35$	+++++

Objaśnienia: * W surowicach pobranych przed szczepieniem przeciwciał nie stwierdzono ($\log_{10} SN_{50} \leq 0,35$), 0 brak miejscowych i uogólnionych objawów zakażenia, + obecność zmian: pierwszy znak + przedstawia zmiany miejscowe na błonie śluzowej języka, następane oznaczają uogólnione zmiany chorobowe na kończynach.

nosiła 1,60. Natomiast po zastosowaniu szczepionki inaktywowanej formaliną u 2 sztuk bydła wystąpiły objawy chorobowe, a miano przeciwciał zobojętniających wynosiło poniżej 1,0 log. Pozostałe zwierzęta, u których nie stwierdzono objawów chorobowych, posiadały poziom przeciwciał SN znacznie niższy aniżeli uzyskany po uodpornieniu zwierząt szczepionką inaktywowaną AEI. Wyniki te wskazują zatem na większą przydatność acetyletylenoiminy jako środka inaktywującego, zapewniającego lepsze właściwości uodporniające szczepionki w czasie 1 rocznego przechowywania.

Wnioski

1. Szczepy A, O, C wirusa pryszczycy namnożone w rotacyjnej hodowli komórek nerki cielęcej osiągają najwyższe wartości miana TCID₅₀ po 18 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C.

2. Acetyletylenoimina (AEI) w koncentracji 0,05% w temperaturze 26°C inaktywuje wirus pryszczycy w ciągu 30, 31, 33 godzin odpowiednio dla typu A, C, O; natomiast zastosowanie formaliny wymaga przedłużenia czasu inaktywacji do 48 godzin.

3. Namnożone w rotacyjnej hodowli komórek nerki cielęcej szczepy wirusa pryszczycy posiadają dobre właściwości immunogenne.

4. Okres trwania odporności po zastosowaniu szczepionki przygotowanej z wirusem namnożonym w rotacyjnej hodowli komórek nerki cielęcej wynosi co najmniej 5 miesięcy.

5. Ocena szczepionek inaktywowanych formaliną lub acetyletylenoiminą (AEI) wykonana po 21 dniach od szczepienia świadczy o braku znamienych różnic między ich właściwościami uodporniającymi.

6. Zastosowanie szczepionek inaktywowanych formaliną lub acetyletylenoiminą (AEI) po 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 4°C świadczy o wyższej wartości immunogennej szczepionek inaktywowanych acetyletylenoiminą.

Piśmiennictwo

1. Bauer K.: Zbl. Bakt. I Orig. 213, 285, 1970.
2. Dannacher G., Fedida H., Thomas J. P., Condert M.: Rec. Méd. vét. 12, 1395, 1970.
3. Dinter Z., Philipson L.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 109, 893, 1962.
4. Doel T. R., Staple R. F.: J. Biol. Stand. 10, 185, 1982.
5. Durand M., Guilloteau B., Giraud M., Guerche M., Pesson M., Prunet P.: Bull. Off. int. Epizoot. 69, 429, 1968.
6. Ercegovac D., Panjevic D., Dolric D., Studen M., Lolin M.: Vet. Glasn. 30, 411, 1976.
7. Giraud M., Berson J. P., Loquerie R., Guerche J., Prunet D., Dhennin L.: Bull. Acad. vét. Fr. 43, 333, 1970.
8. Graves I. H.: Am. J. vet. Res. 24, 183, 1963.
9. Kobusiewicz T., Szkilnik S.: Medycyna Wet. 20, 589, 1964.
10. Mačković C., Lang R., Fontaine J., Camand R., Petermann H. G.: Bull. Off. int. Epizoot., 53, 781, 1969.
11. Mayr A., Bachmann P. A., Bibrack B., Witmann G.: Virologische Arbeitsmethoden. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1977.
12. Meignier B.: Bull. Off. int. Epizoot., 91, 29, 1979.
13. Dubouclard C.: Bull. Off. int. Epizoot. 91, 3, 1979.
14. Mowat G. N.: Bull. Off. int. Epizoot., 77, 987, 1972.
15. Patty R. E., May H. J.: Am. J. vet. Res. 22, 926, 1961.

16. Mat. konf. naukowo-koordynacyjnej RWPG — Budapeszt 1982.
17. Reed L., Muehch H.: Am. J. Hyg., 27, 493, 1938.
18. Röhrer H., Olechnowitz A. F.: Maul- und Klauenseuche (MKS), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1980.
19. Sellers R. F.: Arch. ges. Virusforsch. 9, 621, 1960.
20. Spier R. E., Staple F., Prince M., Rowe L., Fietton B., Mowat G. N.: Bull. Off. int. Epizoot. 85, 995, 1976.
21. Ubertini B., Nardelli L., Barei S., Panina G.: Zbl. Vet. Med. 10, 93, 1963.
22. Ubertini B., Nardelli L., Barei S., Panina G., Lodetti E.: Rep. Meet. Res. Group FAO Brescia 24—26 Sept. (App. I), 16, 1969.
23. Van Wezel A. L.: Develop. biol. Standard. 31, 143, 1977.
24. Warrington R. E., Culiffe H. R., Bachrach H. L.: Am. J. vet. Res., 34, 1087, 1973.

Adres autora: dr Grażyna Paprocka, ul. Spacerowa 70, 98-220 Zduńska Wola

Папроцкая Г. — Оценка размножения вируса ящура в культуре клеток и инактивирующей средств для получения эффективной противоящурной вакцины

Оценено иммуногенные свойства штаммов вируса ящура типа А, О, С, размноженных в ротационной культуре клеток телячьей почки. Для инактивации вируса применено формалин или ацетилэтиленоимин (АЕИ). Через 21 день после вакцинации не отмечено существенной разницы между иммунизирующими свойствами вакцин, изготовленных с применением упомянутых инактивирующих средств. Наивысшую активность показала вакцина типа О (\bar{x} — 1,99) и типа А (\bar{x} — 1,90). Для вакцин типа С среднее геометрическое титров составляло 1,59. Дальнейшая оценка иммунизирующих свойств вакцин, инактивированных формалином или АЕИ, проведенная после 12 месяцев их хранения в темп. 4°C, показала высшую иммуногенную ценность вакцин, инактивированных АЕИ. У животных, иммунизированных той вакциной, \bar{x} составляло 1,6, и не отмечено болезненных изменений в результате экспериментальной инфекции. По применению же вакцины, инактивированной формалином, у 2 голов скота появились болезненные изменения (титр противотел ниже 1,0). Остальные животные, у которых не показано болезненных изменений, обладали также низким уровнем противотел SN (1,2; 1,34).

Paprocka G. — Assessment of FMD virus propagation in cell culture system and inactivating preparations in order to obtain an effective vaccine

Assessment of immunogenic properties of A, O, and C serotypes of FMD virus, propagated in rotary kidney cell culture system, was conducted. In order to inactivate the virus formaldehyde and acetyl-ethyleneimine (AEI) were used. After 21 days since vaccination there was not found any significant difference between the immunogenic properties of the vaccines inactivated with the above preparations. The highest activity had the vaccine of O type (\bar{x} log — 1.99) and type A (\bar{x} log — 1.90). Concerning the vaccine of type C a mean geometric titre was 1.59. The immunogenic evaluation of the vaccines performed again after 12 months of their storage at 4°C showed that the vaccine inactivated with AEI possessed higher immunogenic properties. In animals immunized with the vaccine \bar{x} log was 1.6 and there was not found any clinical signs of the disease due to experimental infection. The use of the vaccine killed with formaldehyde did not protect the animals from the disease; two animals showed the signs of the disease and antibody titres were below 1.0. The other animals who did not fall ill revealed low seroneutralizing antibody titres (1.2 and 1.34).