

© - Státní zdravotnické nakladatelství - 1967

Ústav pro lékařskou mikrobiologii a imunologii fakulty všeobecného lékařství KU, Praha

IMUNIZACE VEPŘŮ PROTI TĚŠÍNSKÉ CHOROBE INAKTIVOVANOU A AVIRULENTNÍ VAKCÍNOU Z TKÁŇOVÝCH KULTUR

Porovnání výsledků

B. KORYCH, F. PATOČKA

Vakcíny proti viru Kloboukovy obrny (těšínské nemoci prasat) používající inaktivovaný virus z mozkomíšních suspenzí (1—13), případně živý virus (14), jsou postupně nahrazovány vakcínami používajícími virus z tkáňových kultur (15—30). Relativně malá účinnost prvních byla úspěšně zvětšena použitím tkáňového viru zvýšením kvanta virového antigenu, který je ve vakcíně.

Získání avirulentního kmene Kloboukovy obrny (31, 32) umožnilo použití aktivního viru bez jakékoliv alterace antigenní struktury inaktivační procedurou, event. se zachovanou schopností množit se v některých buňkách organismu mimo CNS. I když imunizační schopnost avirulentního viru v porovnání s virem inaktivovaným byla lepší (22), zůstává zatím nevyřešena optimální cesta aplikace vakcíny. Optimálním imunizačním způsobem by byla aplikace vakcíny cestou odpovídající patogenezí přirozeně probíhajícího onemocnění (33, 34).

Tato práce porovnává imunizační schopnost formolem a beta-propiolaktosem inaktivovaného viru s imunizační schopností avirulentního klonu A3b viru Kloboukovy obrny aplikovaného intranazálně a perorálně. Výsledky imunizace jsou ověřovány vyhodnocením titrů neutralizačních protilátek a rezistencí proti infekci virulentním virem.

M a t e r i á l — m e t o d y

Virus: virus Kloboukovy obrny, kmen Praha byl použit ve formě infekčního média tkáňových kultur. Počet pasáží a titer je uveden ve výsledcích.

Tkáňové kultury: pro produkci viru a titrační experimenty byla použita permanentní linie buněk vepřové ledviny — PK. Udržování, způsob infekce, titrace a hodnocení byly popsány dříve (35, 36).

Selata: Pro imunizační účely byla užita selata o váze 20—25 kg.

Intranazální imunizace selat: Virus byl vstříkovan Braunovou stříkačkou používanou v gynekologii, jejíž nástavec byl zaveden mezi konchy.

Do každé nozdry bylo vstříknuto po 1 ml virové suspenze. Instilace byla prováděna co nejpozorněji pro možnost průžení sliznice a případné krvácení.

Perorální imunizace: Virus byl suspendován v kondenzovaném mléku tak, aby celkový podávaný objem nepřekročil 250 ml. Stejným objemem mléka byla po vypití propláchnuta nádoba s původní suspenzí a opět zvířetem vypita.

Intracerebrální inokulace: Materiál v objemu 1 ml byl vstříkovan po trepanaci lebky v chloroformové narkóze do oblasti thalamu. V některých případech bylo použito bithalamické infekce. Po injekci byla rána šita a ochráněna jodkolodiem.

Doba pozorování: Infikovaná i imunizovaná zvířata byla denně pozorována pro příznaky onemocnění po dobu 30 dní.

Neutralizační protilátky: Titry neutralizačních protilátek byly vyhodnocovány proti 1000 TCID₅₀ viru KO na jednovrstevných kulturách buněk PK s použitím dvou kultur na jedno ředění séra. Dvojnásobné ředění séra bylo připraveno v Earlově roztoku s 0,5% laktalbuminhydrolyzátu, počínaje ředěním 1:4. Směs stejných dílů a viru, inkubovaná za pokojové teploty (22 °C) po 60 minut, byla pak přidána v objemu 0,2 ml na zkumavku. Po 30minutové adsorpci při 36,5 °C bylo přidáno udržovací médium (Earle + 0,5% laktalbuminhydrolyzátu s úpravou pH bikarbonátem na 7,6). Paralelně byly zpracovány kontroly se sérem bez protilátek (37). Titr séra byl vyhodnocován v době, kdy kontrolní zkumavky měly změny indukované virem hodnotitelné ++ (při ++++ jako maximum), zpravidla po 48 hodinách. Za pozitivní bylo považováno ředění séra, kde tkáň obou zkumavek byla ochráněna před cytopatickým účinkem viru.

Krev pro neutralizační pokusy byla získávána kardiální punkcí v intervalech 0 (před imunizací), 14 dní, 42 dní (odchyly viz text). V případě paralýz byla odebírána krev při výskytu klinických příznaků onemocnění.

Challenge: Rezistence proti infekci virulentním virem byla ověřována intracerebrální nebo intranazální inokulací virulentního viru z nízkých pasáží na tkáňových kulturách (9. pasáž), a to řádově v množství 10² TCID₅₀, které vedly ke klinickým projevům onemocnění u 100 % kontrolních zvířat.

Histopatologické vyšetření: U všech zvířat byly po proběhnutí pokusu odebrány mozek a mícha a histologicky vyšetřeny pro histopatologické změny charakteristické pro Kloboukovu obrnu. Za vyšetření děkujeme profesoru dr. B. Bednářovi.

V Ý S L E D K Y

Formolizovaná i beta-propiolaktonová vakcína byly připraveny ze stejné šarže viru kultivovaného na jednovrstevných tkáňových kulturách vepřové ledviny. Virová suspenze v udržovacím médiu složená z Earlova nárazníkového roztoku s 0,5% laktalbuminhydrolyzátem a 2% TS použitá pro přípravu vakcíny, měla titr 10^{6,5} TCID₅₀/ml. Inaktivace formolem v konečné koncentraci 1:4000 probíhala za teploty 37 °C a pH 7,4 po 12 dní, tj. dobu, která je nejméně čtyřnásobkem požadovaného času pro inaktivaci viru formolem v užití koncentraci a za použitých podmínek (38).

Inaktivace beta-propiolaktonem v konečné jednoprocenní koncentraci probíhala při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin. Pokleslá hodnota pH byla po dvouhodinové inaktivaci upravena na fyziologickou hodnotu 7,5% bikarbonátem.

Při sledování dynamiky inaktivace beta-propiolaktonem se nepodařilo prokázat aktivní virus již po 15 min., dvouhodinová inaktivace byla pokládána za dostatečnou pro bezpečné inaktivování všeho viru.

Nepřítomnost aktivního viru byla prokázána ve dvou pasážích na tkáňových kulturách a intracerebrální testací na selatech, u kterých po proběhnutí inkubační doby byl mozek a mícha podroben histologickému vyšetření. V obou případech nebyly prokázány žádné známky výskytu aktivního viru.

Virus inaktivovaný obojím způsobem byl smíchán s lipoidními adjuvancií (39) v poměru 2 díly lanolinu, 2 díly inaktivované virové suspenze v médiu tkáňových kultur a 1,5 dílu parafinum liquidum. Dobře promíchaná směs měla polo-tekutou konzistenci.

V obou případech byla zvířata očkována 5 ml vakcíny subkutánně. Před vakcinací a v intervalu 6 týdnů po vakcinaci byla odebrána krev pro stanovení hladiny neutralizačních protilátek. Po šesti týdnech byla současně zvířata podrobena infekci intracerebrálním vstříknutím 10^2 TCID₅₀ viru z mozkomíšní suspenze kmen Zábřeh.

Výsledky porovnávacího experimentu jsou uvedeny na tabulce 1.

Tab. 1. Porovnání účinnosti tkáňové vakcíny proti Kloboukové obrně vepřů inaktivované formolem a beta-propiolaktonem (BPL)

Sele	Formolvakcína titr protilátek			Sele	BPL-vakcína titr protilátek	
	před	po			před	po
6	4	128		1	8	512
7	ND	ND	+ 8	2	8	512
8	16	512		3	4	256
9	4	128	+ 14	4	8	512

ND — vzorek znehodnocen při centrifugaci, nebyl zpracován, + — paralytické smrtelné onemocnění, číslo značí den výskytu paralýz.

Neimunizovaná zvířata kontrolní skupiny uhynula ve 100 % případů.

Z výsledků pokusů uvedených v tabulce 1 je patrné:

1. vakcína připravená inaktivací viru beta-propiolaktonem (BPL) je efektivnější než vakcína připravená inaktivací viru formolem;
2. z porovnávaných způsobů inaktivace je BPL inaktivace šetrnější a bez hrubších následků pro imunogenicitu viru;
3. pro úspěšnou imunizaci vepřů vakcínou z tkáňových kultur inaktivovanou beta-propiolaktonem je možno použít kvantum viru, které stojí na dolní hranici použitelnosti pro formalínem inaktivovanou vakcínu, používající virus z tkáňových kultur (18);
4. jednorázové podání inaktivované vakcíny z viru z tkáňových kultur s adjuvancií vyvolá mohutnou protilátkovou odpověď (průměrné zvýšení titru 64krát), která přetrvává nejméně 6 týdnů. V porovnání se subkutánně podaným virem inaktivovaným formolem adsorbovaným na aluminium hydroxid, event. stejným způsobem podaným avirulentním virem (18, 22, 23), vakcína s lipoidními adjuvancií vyvolá vyšší protilátkovou odpověď;
5. i vysoká hladina protilátek neznamena vždy imunitu před i. c. infekcí, jak již ve stejných pokusech popsal Mayr (18, 23).

Formolem a BPL inaktivovaný virus (bez lipoidních adjuvancií) vstříknutý i.c. selatům indukoval též tvorbu protilátek (tab. 2).

Dosažené titry neutralizačních protilátek u těchto zvířat ukazují na určitý vztah mezi kvantem aplikovaného virového antigenu a protilátkovou odpovědí (18), i když v tomto případě se rozdílnost titru protilátek u selete 35 proti selatům 10 a 5 může vyložit různou dobou odběru druhého vzorku, popřípadě individuální schopností reagovat na antigenní impuls. V každém případě jsou však ukazatelem, že i tímto způsobem aplikovaná inaktivovaná vakcína je schopná indukovat tvorbu protilátek.

Tab. 2. Imunizační účinek i. c. aplikovaného inaktivovaného viru KO

Typ vakcíny	Sele	Aplikace	Objem ml	Titr		
				před	po (dny)	
Formol	35	bithalam.	2	8	512	22
Formol	10	i. c.	1	8	64	42
BPL	5	i. c.	1	8	16	42

Schopnost indukovat protilátkovou tvorbu i.c. aplikovaným inaktivovaným virem byla porovnána se schopností produkce protilátek po i.c. vstříknutí živého viru, jehož virulence byla snížena mnohočetnými pasážemi na tkáňových kulturách (tab. 3).

Tab. 3. Imunizační účinek i. c. aplikovaného viru KO se sníženou virulencí

Sele	Virus pasáž	TCID ₅₀ /ml	Titr		Pozn.
			před	po 30 dnech	
41	65	1000	0		+10
44	65	100	4	64	
43	76	1000	16	32	
42	76	100	8	8	

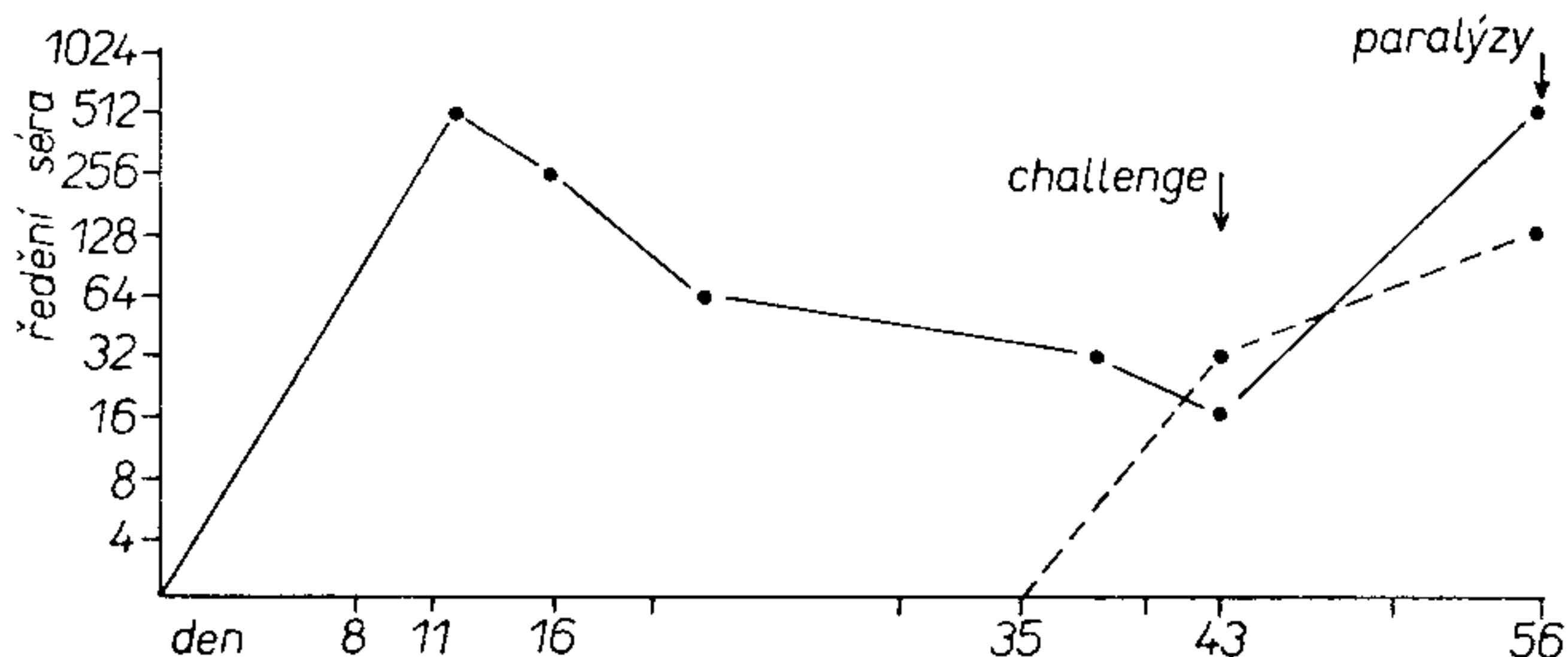
+ = paralytické příznaky po N dnech.

Titry protilátek dosažené po i.c. injekci malých dávek viru se sníženou virulencí bylo možno korelovat s výsledky histopatologického vyšetření. Virus schopný množení v buňkách CNS (65. pasáž) vedl po aplikaci 1000 TCID₅₀ viru k paralytickému onemocnění s odpovídajícím histopatologickým obrazem. 100 TCID₅₀ nevedlo k manifestnímu chronickému onemocnění. Histopatologické změny ukázaly ložiskovité poškození nervové tkáně omezeného rozsahu. Produkce protilátek byla v poměru k pomnoženému viru, titr protilátek se proti původní hodnotě zvýšil 16krát. Virus z vyšší pasáže s velmi nízkou virulencí indukoval tvorbu protilátek v poměru k injikovanému kvantu a choval se jako malá množství inaktivovaného viru.

Výsledky pokusu znázorněné na tabulce 3 ukazují, že mnohonásobným pasážováním na tkáňových kulturách je možno virus Kloboukovy obrny zbavit viru-

lence a zároveň i schopnosti pomnožovat se v buňkách CNS. Této možnosti bylo použito pro získání avirulentního virového klonu. 90. pasáž viru KO na tkáňových kulturách byla trojnásobně klonována plakovou technikou (36) a získaná progenie (klonus A3b) byla testována i.c. injekcí neředěného virového materiálu ($10^{8,1}$ TCID₅₀) selatům. Žádné ze tří infikovaných zvířat neonemocnělo.

Avirulentní virus, kultivovaný na tkáňových kulturách buněk PK, dosahoval pravidelně titru $10^{8,5}$ – $10^{9,5}$ TCID₅₀/ml. Ve formě infekčního média tkáňových kultur byl vhodnou očkovací látkou splňující kvantitativní předpoklady pro perorální imunizaci (33) — (graf 1).



Graf 1. Tvorba protilátek po perorálním podání avirulentního kmenu viru KO-A3b v dávce $5 \cdot 10^7$ TCID₅₀. Dva vybrané příklady protilátkové odpovědi

Graf 1 znázorňuje dva typické výsledky pokusů s perorálně podaným virem. Zvířata vypila ve 250 ml mléka 5krát 10^7 TCID₅₀ viru. Hladina neutralizačních protilátek byla hodnocena před podáním viru, dále pak 12, 22, 35, 43, tj. den po imunizaci. Zároveň byla 43. den zvířata infikována 200 TCID₅₀ virulentního viru z nízké pasáže na tkáňových kulturách; 15 dní po challengi byly znovu odebrány vzorky krve a stanoveny titry neutralizačních protilátek. Dva vybrané příklady imunizace ukazují, že užitá dávka viru zbaveného virulence při perorálním podání nemusí ve všech případech docílit imunizačního efektu. Sele č. 46 vytvořilo neutralizační protilátky dobře, 12 dní po podání viru dosáhly svého maxima, 16. den byl již prokazatelný lehký pokles titru, který po 42 dnech klesl na hodnotu 16. Tato hladina protilátek není schopna uchránit zvíře před paralytickým onemocněním po i.c. injekci 200 TCID₅₀ virulentního viru.

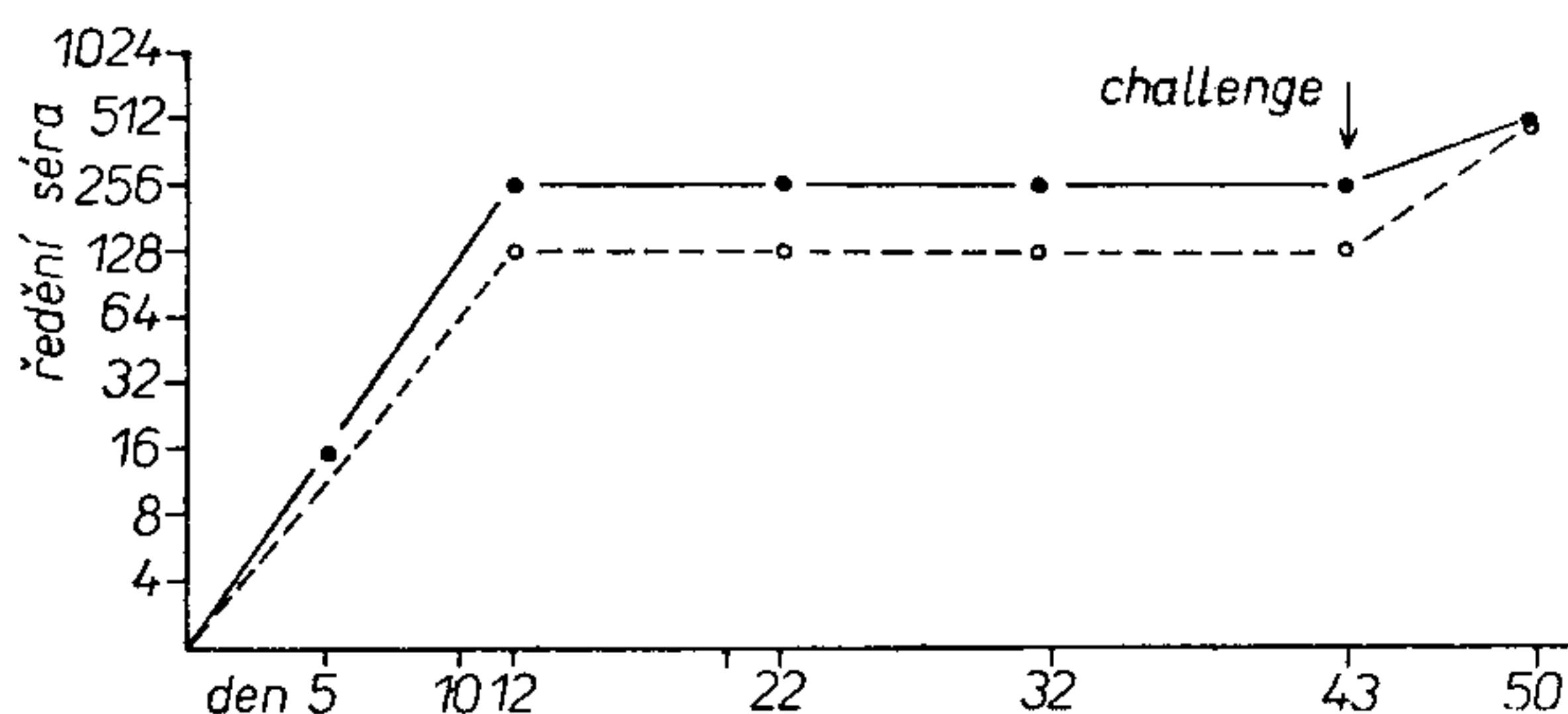
Sele č. 42 po imunizaci deglutiční cestou nevytvářelo protilátky do 35. dne po podání viru. V době i.c. zátěže virulentním virem (42. den po imunizační dávce) hladina neutralizačních protilátek byla 1 : 32, což je možno kromě zpožděné tvorby protilátek event. vysvětlit přenesením viru od imunizovaných selat ustájených ve stejném kotci a působícím později jako antigenní stimulus. Sele č. 42 odolalo i.c. infekci virulentním virem, i.c. infekce neměla boosterovací charakter (malý vzestup protilátek). Z pokusů o perorální imunizaci avirulentním virem z tkáňových kultur je možno vyvodit:

1. perorální podání avirulentního viru nevede ve všech případech k imunizačnímu efektu, i když dávka podaného viru byla dostatečně vysoká (33). Výsledky potvrzují nutnost podání koncentrovaného viru (= média tkáňových kultur) pro dosažení dobrého imunizačního efektu;

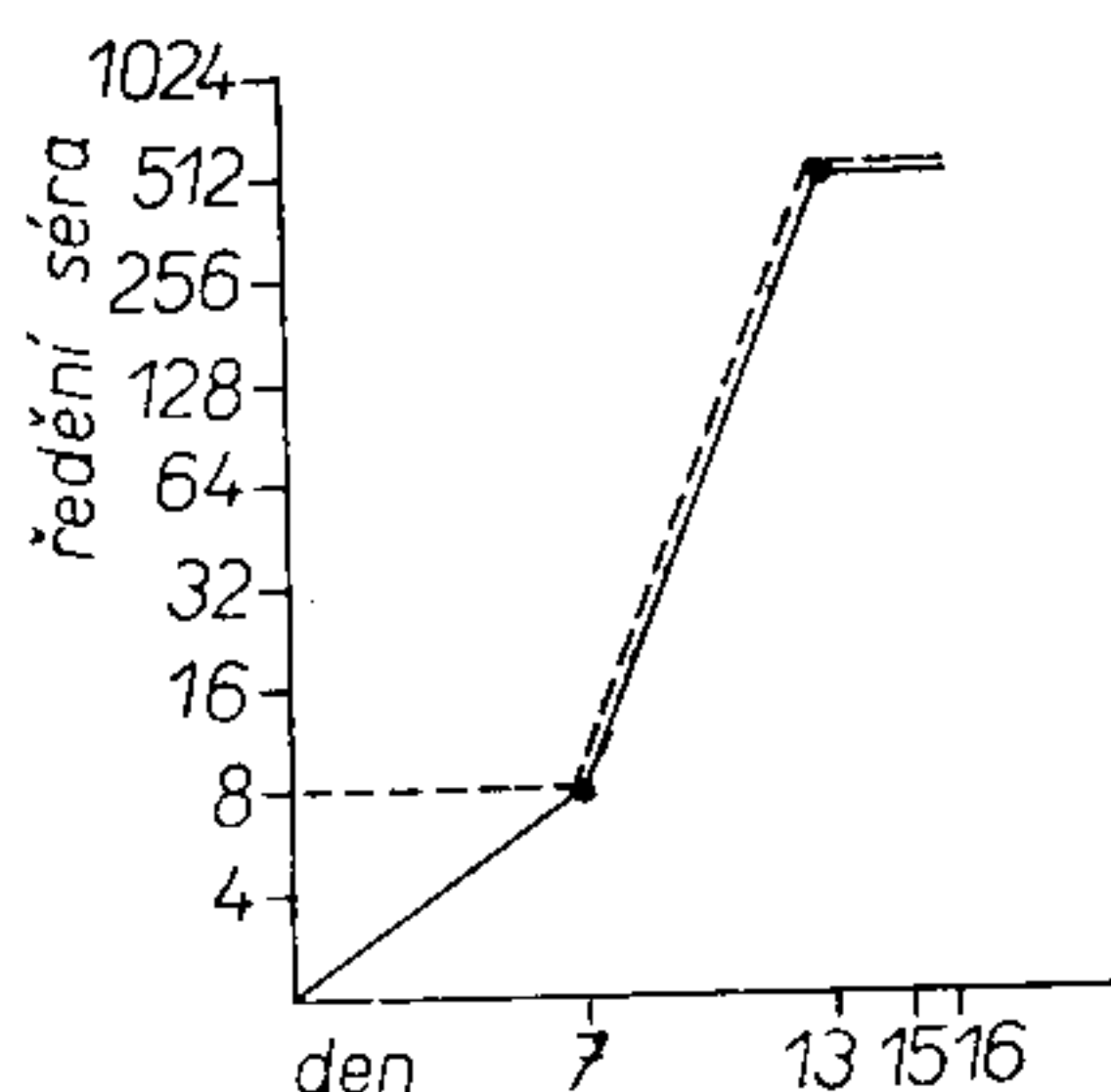
2. perzistence neutralizačních protilátek po perorálním podání avirulentního viru z tkáňových kultur je krátkodobá;

3. nízké titry protilátek je možno pokládat za důsledek inaparentně probíhající infekce v chovech, tzv. nespecifické titry neutralizačních protilátek (41 až 43), které neochrání zvířata před infekcí virulentním kmenem.

Graf 2 znázorňuje typický průběh imunizace po intranazální imunizaci. Intranazálně podaný avirulentní virus vede k tvorbě neutralizačních protilátek již během prvního týdne po instilaci viru. Přibližně stejné množství avirulentního viru, jaké bylo použito při perorálním způsobu imunizace, vstříknuté skupině selat intranazálně $6 \cdot 10^7$ TCID₅₀ ve dvou ml) mělo za následek stoupnutí titru na maximální hladinu do 12. dne po imunizaci. Maximální hladina se udržovala nezměněná nejméně do 43. dne. V tuto dobu byla zvířata infikována intranazálně 200 TCID₅₀ virulentního viru ze čtvrté tkáňové pasáže. Infekce nepůsobila klinické příznaky onemocnění a měla boosterovací efekt. Titrace



Graf 2. Typický průběh tvorby protilátek u selat imunizovaných intranazálně avirulentním virem KO-A3b dávkou $6 \cdot 10^7$ TCID₅₀



Graf 3. Typický průběh tvorby protilátek u selat infikovaných virulentním kmenem viru KO intranazální cestou (400 TCID₅₀)

neutralizačních protilátek 7. den po challengi ukázala vzestup jejich hladiny proti předchozím hodnotám na dosažitelné maximum.

Z grafického vyjádření průběhu dvou vybraných typických křivek (graf 2) vyplývá:

1. intranazální podání avirulentního viru z tkáňových kultur vede ke zvýšení neutralizačních protilátek;
2. 16násobné stoupnutí hladiny protilátek je prokazatelné již 5. den, maximální titry jsou dosaženy 12. den po vstříknutí viru;
3. hladina neutralizačních protilátek zůstává na dosažených hodnotách minimálně do 42. dne po imunizaci;
4. kromě protilátkové imunity intranazální imunizace avirulentním virem vede k rezistenci na infekci intranazálně vstříknutého virulentního viru v dávce, která u kontrol vyvolala manifestní onemocnění ve 100 % případů.

Graf 3 znázorňuje průběh protilátkové odpovědi u kontrolních zvířat infikovaných intranazálně virulentním virem. Maximální hladina protilátek je

dosažena ve stejnou dobu jako u zvířat imunizovaných intranazálně vstříknutým virem. Ze srovnání obou grafů vyplývá:

1. avirulentní virus z tkáňových kultur je schopen se pomnožovat po intranazální aplikaci viru, nebo se po intranazální aplikaci dostává do kontaktu s buňkami schopnými protilátkové tvorby;

2. protilátková odpověď po imunizaci avirulentním virem KO intranazálně je promptní a analogická odpovědi po prodělaném onemocnění;

3. výška dosažených titrů protilátek po intranazální imunizaci avirulentním virem je analogická výškám titrů dosažených při klinicky manifestním onemocnění.

DISKUSE

Rozšíření viru Kloboukovy obrny je téměř celosvětové. Počet paralytických případů onemocnění i přes evidentní výskyt a šíření viru kolísá a je velmi pravděpodobné, že toto kolísání je způsobeno rozšířením virových kmenů o různé virulenci. Například v Norsku [44] problém obrny vepřů není otázkou, která by zasluhovala aktuální řešení, podobně i kmen promořující chovy v Anglii (Talfan virus) má slabou virulenci a vyvolává onemocnění převážně krátkodobá s reparací [45]. V našich krajích od let 1944—1952, kdy byl masivní výskyt paralytických a smrtných onemocnění, obrna vepřů téměř vymizela, a pokud byly hlášeny případy onemocnění, neměly nikdy epizootologický význam. Sérologické vyšetření neutralizačních protilátek zvířat chovů, kde obrna vepřů nebyla po léta pozorována, ukázala významný titer protilátek u převážné většiny zvířat, zatímco neutralizační protilátky zvířat z lokalit s výskytem paralytického onemocnění diagnostikovaného jako těšínská choroba měly hodnotu negativní, nebo byly v hodnotách pokládáných za nespecifické [37]. Je pravděpodobný výklad, že i chovy bez klinicky patrného výskytu těšínské choroby jsou latentně promořovány a že chybění případů paralytického onemocnění je dokladem odolnosti zvířat. Chovy s výskytem paralytického onemocnění, kde zároveň nejsou u zvířat neutralizační protilátky, svědčí pro nepřítomnost infekce a vnímavost zvířat na infekci virem Kloboukovy obrny.

Inaparentně probíhající infekce virem Kloboukovy obrny byla prokázána již dříve [46, 42, 40]. V každém případě i za přítomnosti neutralizačních protilátek rozvoj i forma onemocnění jsou výslednicí mnoha spolupůsobících faktorů, z nichž na prvním místě stojí virulence virového kmenu. Je otázkou, jakým způsobem je ovlivněna infekciozita viru kolujícího v promořovaných chovech. Epizocie probíhající na Slovensku [47] může být dokladem selekce virulentní mutanty, která je schopna vyvolat paralytická a smrtelná onemocnění u zvířat latentně promořovaných i aktivně imunizovaných.

U inaktivovaných vakcín protilátková odpověď a stupeň imunity jsou přímo úměrné kvantu podaného virového antigenu [22, 23], přičemž se zdá, že i jemná inaktivační procedura za použití formolu ve vysokém ředění ovlivňuje antigenicitu viru Kloboukovy obrny, a tím snižuje imunizační efekt [32, 22]. Tato skutečnost by se dala vysvětlit teorií zdůrazňující intaktnost nej povrchnějších struktur virionu pro antigenicitu [48].

Optimálním způsobem podání avirulentního viru, který byl získán mnohočetnými pasážemi na tkáňových kulturách a ztratil virulenci pro vepře, by byla cesta odpovídající přirozenému místu vstupu infekce do organismu [33, 34]. Otázka patogeneze Kloboukovy obrny doposud není jednotně zodpovězena. Výskyt viru po perorálním podání v lymfatických uzlinách celého zažívacího traktu, počínaje lymfatickou tkání tonzil a uzlinami krčními až po uzliny mezenteriální, je pokládán za důkaz resorpce viru z alimentárního traktu [33,

34). Histologické nálezy předpokládají přestup viru na centrální nervový systém přímo z nazofaryngu po vláknech čichového nervu (49, 50). Tento způsob infekce nebyl zatím exaktně vyloučen v žádné z experimentálních prací, kde pro studium patogeneze bylo vybráno perorální podání viru, který byl zvířetem buď přímo pohlcen, nebo v některých případech instilován pipetou do orofaryngu. V obou těchto případech mohlo dojít k regurgitaci viru do nazofaryngu a k realizaci přestupu viru na neuron čichového nervu (51). Vylučování viru nazálními sekrety, které nemusí být v plné korelaci s enterálním vylučováním viru je dalším dokladem určité úlohy horního respiračního traktu v rozvoji onemocnění. Konečně z prací Heckeho (52, 33) je vidět, že avirulentní virus Kloboukovy obrny se v zažívacím traktu nepomnožuje a perorální podání tohoto viru vede k imunitě jen při aplikaci vysokých kvant viru (105,6 TCID₅₀ viru per os je neúčinné).

V našich pokusech bylo možno potvrdit závislost imunogenosti vakcín na šetrnosti inaktivace porovnáním imunizační schopnosti a ochrany před infekcí virulentním kmenem, a to vakcín připravených z téže šarže viru inaktivací beta-propiolaktonem a formolem. Inaktivační schéma užitá pro přípravu formolvakcíny snížilo účinnost očkovací látky podané subkutánně v lipoidních adjuvanciích proti beta-propiolaktonové vakcíně, aplikované stejným způsobem a ve stejném kvantu (tab. 1). Intracerebrální aplikace viru inaktivovaného obojím způsobem ukázala slabý vzestup titru neutralizačních protilátek ve dvou případech ze tří, po dvojnásobné dávce i. c. aplikovaného viru téže šarže vakcíny stoupl titer protilátek na hodnotu 512, která je dosahována jako maximální hodnota při vhodném způsobu imunizace, eventuálně onemocnění. I z této malé sestavy je patrná závislost protilátkové odpovědi při použití inaktivovaného viru na jeho kvantu (tab. 2).

Při intracerebrální aplikaci živého viru na hranicích mezi virulencí a avirulencí (65. a 76. tkáňová pasáž) bylo možno u nižší pasáže prokázat pětinašobný vzestup protilátek bez symptomů onemocnění při injekci decimálního ředění infekčního média tkáňových kultur, zatímco neředěné infekční médium vedlo k paralytickému onemocnění. 76. pasáž viru nevyvolala žádné příznaky onemocnění při intracerebrální aplikaci i v koncentrované formě a měla za následek dvojnásobný vzestup protilátek, zatímco decimální ředění titer protilátek neovlivnilo. Rozdíl obou pasáží viru ve schopnosti indukovat tvorbu protilátek ukázal na jejich odlišnou schopnost množení v CNS, potvrzenou i histopatologickým vyšetřením.

Avirulentní virus 93. pasáže byl aplikován perorálně a intranazálně skupinám zvířat a byla sledována hladina protilátek a schopnost odolat intracerebrální infekci virulentním kmenem. Ze srovnání vyplynula jasná preference intranazálního podání viru, které mělo za následek vysoký vzestup hladiny neutralizačních protilátek i rezistenci proti challengi virulentním kmenem (graf 1, 2).

Výsledky intranazální imunizace ukazují na vhodnost použití této cesty vakcinace pro její efektivitu, pro jednoduchost aplikace a pro úsporu injikovaného viru, neboť k docílení podobného stupně imunity parenterální cestou je nutná aplikace alespoň 2,5krát většího množství vysokotitrážního viru z tkáňových kultur, pro perorální imunizaci pak minimálně 50násobek pro dosažení účinku, který není vždy s intranazální, event. subkutánní aplikací srovnatelný.

Zvrat avirulentní mutanty ve virulentní při perorálním podání není podle Heckeho (52) příliš pravděpodobný, především pro omezenou schopnost viru

pomnožovat se v zažívacím traktu vepře. Zatím nebyla sledována schopnost množení avirulentního viru po podání intranazálním. Je otázka, zda se horní respirační trakt v této vlastnosti podobá traktu zažívacímu, když je ve výsledcích imunizace při aplikaci avirulentního kmene mezi oběma cestami rozdílná imunitní reakce. Intranazálně podaný avirulentní klonus A3b viru Kloboukovy obrny po jedné pasáži přes zvíře touto cestou neztratil nic ze svých vlastností.

Hladina neutralizačních protilátek po jednorázové aplikaci avirulentního viru intranazální cestou přetrvává minimálně 43 dnů bez jejich poklesu. Tento rozdíl proti subkutánnímu podání avirulentního viru (22, 23) podtrhuje výhodu použití intranazální aplikace jakožto způsob vakcinace, kde není požadováno revakcinace pro získání dlouhodobější imunity.

S O U H R N

Byla porovnána imunizační schopnost viru Kloboukovy obrny (viru těšínské nemoci vepřů) inaktivovaného formolem a beta-propiolaktonem a avirulentního klonu téhož viru, a to za použití různých cest podání. Účinnost vakcín byla vyhodnocena stanovením neutralizačních protilátek a odolností vůči infekci virulentním kmenem viru KO.

Nejlepší výsledky byly dosaženy imunizací zvířat intranazální instilací avirulentního viru v porovnání s perorálním podáním. Intranazálně podaný virus vyvolává tvorbu protilátek dosahujících dlouhodobě stejné titry, jaké jsou po prodělání klinicky manifestního onemocnění. Perorálně podaný avirulentní virus vyvolá nepravidelně tvorbu protilátek v závislosti na aplikovaném kvantu s jejich relativně krátkodobým přetrváváním na stejné úrovni.

Beta-propiolaktonem inaktivovaná vakcína je imunogennější než vakcína inaktivovaná formolem.

В ы в о д ы

Иммунизация свиней против вируса болезни Тешена (ВБТ) убитой и авирулентной вакцинами полученных из тканевых культур. Сравнение результатов

К о р ы х Б., П а т о ч к а Ф.

Иммунизирующая мощность вируса Клобукова паралича свиней (вирус болезни Тешена) инаktivированного формалином или бета-пропиолактом сравнивалась с действительностью авирулентного клонуса этого вируса, используя разные пути применения. Действительность вакцин оценивалась по полученным титрам нейтрализующих антител и устойчивостью к инфекции вирулентным штаммом ВБТ.

Лучшие результаты получились с авирулентным вирусом после внутриносового введения чем после орального применения. Внутриносовое введение вируса вызывает выработку антител, которая достигает такого уровня и долговременного существования как после клинического заболевания свиней. В зависимости от дозировки оральное введение авирулентного вируса вызывает неровно выработку антител у которых срок существования не долговременный.

Бета-пропиолактом инаktivированная вакцина является более иммуногенной чем вакцина инаktivированная формалином.

Čs. Epidem., 16, 1967, 5: 257—267.

SUMMARY

Immunization of Swine against Teschen Disease Virus (TDV) by Inactivated and by Five Nonvirulent Vaccines Derived from Tissue Cultures. A Comparison of Results

Korych B., Patočka F.

The immunizing power of the virus of Klobouk's paralysis of swine (Teschen disease virus) inactivated by formalin or beta-propiolactone was compared with that of a nonvirulent clone of the virus, using various routes of administration. The efficacy of the vaccines was evaluated according to neutralizing antibody titers and resistance to challenge with a virulent strain of TDV.

The best results were obtained with the nonvirulent virus instilled intranasally as compared with its oral administration. Intranasally administered virus induces production of antibodies which attains such levels and of such duration as is characteristic of animals after manifest disease. Depending on the amount applied, orally administered nonvirulent virus induces inconsistent formation of antibodies the levels of which persist for much shorter periods.

Beta-propiolactone-inactivated vaccine is more immunogenic than formalin-inactivated vaccine.

Čs. Epidem., 16, 1967, 5: 257—267.

LITERATURA

1. **Klobouk, A.:** Zvěrolékařské rozpravy, 9, 1935: 217. — 2. **Košťanský, K.:** Věstník II. sjezdu vet. ČSR. Brno 1936, s. 169. — 3. **Fingerlos, K.:** Wien. tierärztl. Mschr., 52, 1940. — 4. **Traub, E.:** Arch. Tierheilk., 77, 1941: 52. — 5. **Langner, F.:** Tierärztl. Rundschau, 2, 1941: 13. — 6. **Kodrnja, E.:** Vet. Arh. (Zagreb), 18, 1948: 131. — 7. **Kodrnja, E.:** Vet. Arch., 19, 1949: 1. — 8. **Hruška, K.:** Čas. čs. Vet., 5, 1950: 289. — 9. **Hecke, F.:** WTM, 38, 1951: 147—159. — 10. **Hecke, F.:** WMT, 40, 1953: 458—478. — 11. **Brauner, L., Ursíny, M., Žuffa, H.:** Arch. exp. Vet.-Med., 9, 1955: 522—533. — 12. **Hecke, F.:** WTM, 42, 1955: 606—634. — 13. **Mihajlovitch, S.:** Bull. Off. Int. Epiz., 57, 1962: 1547—1550. — 14. **Patočka, F., Kubelka, Vl., Slavík, J., Boháč, J.:** Atti del VI. Congresso Internazionale di Microbiologia. Vol. 3, Sez. VIII, pag. 181—183. Roma, 6—12 Settembre 1953. — 15. **Patočka, F., Kubelka, Vl., Korych, B.:** J. Hyg. Epidem. (Praha), 2, 1958: 250—252. — 16. **Patočka, F., Kubelka, Vl., Korych, B.:** Čs. Epidem., 7, 1958: 73—77. — 17. **Mayr, A.:** Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 172, 1958: 465—480. — 18. **Mayr, A.:** Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 13, 1958: 524—538. — 19. **Bourdin, P.:** Bull. Soc. Path. exot., 51, 1958: 731. — 20. **Bourdin, P., Serres, H.:** Ann. Inst. Pasteur, 97, 1959: 583—589. — 21. **Mayr, A., Wittmann, G.:** Mh. Tierheilk., 10, 1958: 345—350. — 22. **Mayr, A., Correns, H.:** Zbl. Vet.-Med., 6, 1959: 416. — 23. **Mayr, A.:** Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 176, 1959: 341—345. — 24. **Harnach, R., Mesároš, E., Pleva, V.:** Veterinární medicina, 6, 1961: 129—132. — 25. **Harnach, R., Mesároš, E., Pleva, V.:** Arch. exp. Vet.-Med., 15, 1961: 1140—1146. — 26. **Mádr, V.:** Veterinární medicina, 6, 1961: 107—112. — 27. **Kubín, G.:** Bull. Off. Int. Epiz., 57, 1962: 1565—1568. — 28. **Kubín, G.:** Wien. Tierärztl. Mschr., 50, 1963: 170—178. — 29. **Zoletto, R., Irsara, A.:** Veter. ital., 14, 1963: 241—247. — 30. **Mádr, V.:** Veterinářství, 14, 1964: 540—541. — 31. **Mayr, A.:** Mh. Tierheilk., 10, 1958: 186—191. — 32. **Szurman, J., Larski, Z.:** Med. weteryn., 16, 1960: 325. — 33. **Hecke, F.:** Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 192, 1964: 169—182. — 34. **Hecke, F.:** Z. Hyg. Infekt. — Kr., 150, 1964: 61—82. — 35. **Černý, M., Korych, B., Soukup, F.:** J. Hyg. Epidem. (Praha), 8, 1964: 353—363. — 36. **Korych, B., Chýle, M.:** J. Hyg. Epidem. (Praha), 9, 1965: 37—42. — 37. **Korych, B., Šrajbr, E., Patočka, F., Kubelka, Vl., Chýle, M.:** Veterinární medicina, 6, 1961: 63—68. — 38. **Korych, B., Patočka, F., Kubelka, Vl.:** Čs. Epidem., 8, 1959: 13—15. — 39. **Freund, J., Casals, J., Hosmer, E. P.:** Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 37, 1937: 509. — 40. **Zoletto, R., Bersani, G.:** Vet. ital., 15, 1964: 653—663. — 41. **Mayr, A.:** Zbl. Vet. — Med., 4, 1957: 613—632. — 42. **Hecke, P.:** Mschr. Tierheilk., 11, 1959: 33. — 43. **Hahnefeld,**

H. et al.: Arch. exp. Vet. — Med. 14, 1960 : 968—983. — 44. **Flatla, J. L.:** Bull. Off. Inf. Epiz., 57, 1962 : 1585—1587. — 45. **Pater-son, A. B.:** Bull. Off. Int. Epiz., 57, 1962 : — Kr. Haustiere, 59, 1943 : 41. — 47. **Král:** ústní sdělení. — 48. **Kilkson, R.:** J. theor. Biol., 12, 1966 : 435—438. — 49.

Došlo 20. 7. 1967.

Fischer, K., Röhrer, H.: Arch. exp. Vet. — Med., 9, 1956 : 231. — 50. **Fischer, K.:** Wissenschaftliche Abhandlungen. No. 35. Berlin, Akademie — Verlag 1958. — 51. **Hecke, F.:** Mh. Tierheilk., 10, 1958 : 197—217. — 52. **Hecke, F.:** Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 192, 1964 : 158—168.

B. K., Praha 2, Studničkova 7