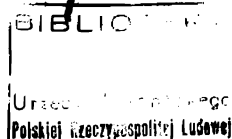


C12k

5/00



## POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

# OPIS PATENTOWY

Nr 44532

Kl. 30 h, 2/04

The Wellcome Foundation Limited

Londyn, Wielka Brytania

### Sposób wytwarzania szczepionki weterynaryjnej

Patent trwa od dnia 10 lutego 1959 r.

Pierwszeństwo: 14 lutego 1958 r. (Wielka Brytania).

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania szczepionki weterynaryjnej.

Z chwilą gdy pasożyt dostaje się do organizmu żywiciela — kregowca następuje reakcja uodpornienia, będąca wynikiem pojawienia się antyciał wytworzonych w celu zwalczania pasożyta. W ten sposób pasożyt wewnętrzny może wywoływać reakcję uodpornienia u swego żywiciela i po infekcji przez pasożyta żywiciel może stać się mniej lub więcej odporny na następne infekcje tego samego pasożyta, lub pasożytów pokrewnych. Wiadomo, że taka odporność na ponowną infekcję zdarza się w wielu chorobach powodowanych przez pasożyty komórkowe i pierwotniaki, jak również w chorobach powodowanych przez bakterie i wirusy.

Uodpornienie niekoniecznie polega na reakcji wynikającej z obecności normalnie nabytych dojrzałych pasożytów. Uodpornienie może być osiągnięte biernie przez zastosowanie zastrzyku

zabitych pasożytów lub ich wyciągu, albo aktywnie — przez podawanie żyjących lecz osłabionych pasożytów, bez poddawania żywiciela wszystkim dolegliwościom choroby.

Oslabiony pasożyt jest to taki, który nadal żyje, lecz nie jest już zdolny do normalnego rozwoju w organizmie swego żywiciela.

Jest rzeczą znaną, że promieniowanie jonizujące (na przykład promienie X i promienie  $\gamma$ ) oraz promieniowanie ultrafioletowe działają szkodliwie i ewentualnie zabijają żyjące komórki, nie wyłączając pasożytów komórkowych i pierwotniaków. Wiadomo również, że starannie stopniowane dawki promieni X lub  $\gamma$  osłabiają pasożyty wewnętrzne komórkowe i pierwotniaki, nie zabijając ich, przy czym tak osłabione pasożyty mogą być użyte do uodpornienia żywiciela.

Obecnie stwierdzono, że nasświetlanie promieniami ultrafioletowymi w dawce znacznie niż-

szej od dawki śmiertelnej „in vitro” wpływa hamująco na rozwój w żywicielu wielu pasożytów zwierząt domowych, wskutek czego naświetlone organizmy mogą uodparniać żywiciela, bez objawów normalnie związanych z początkową infekcją. Tak naświetlone organizmy mogą być podawane w ilości znacznie przekraczającej ilość, która normalnie spowodowałaby symptomy patologiczne i w ten sposób może być wytworzona znaczna odporność ochronna.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania szczepionki weterynaryjnej z pasożytów wewnętrznych komórkowych i pierwotniaków przez zastosowanie naświetlania promieniami ultrafioletowymi, w celu osłabienia pasożytów. Wytwarzanie szczepionki osłabionej przez zastosowanie promieniowania ultrafioletowego daje wiele praktycznych korzyści, w porównaniu ze stosowaniem promieniowania jonizującego. Okres naświetlania potrzebny do wytworzenia takiego samego osłabienia jest krótszy, co pozwala na oszczędzenie czasu pracy. Sprzęt jest prosty i łatwy do osłonięcia, tym samym zapewnia pracownikom zupełne bezpieczeństwo i nie potrzebne jest wyszukane wyposażenie wymagane w przypadku naświetlania promieniami X lub  $\gamma$  i przez to pozwala na osiągnięcie znacznej oszczędności.

Szczególnie wynalazek ma zastosowanie w przypadku pasożytów: nematodów, trematodów i cestodów. Wynalazek naturalnie jest użyteczny tylko w odniesieniu do takich organizmów pasożytniczych zwierząt, które w stanie naturalnym wywołują choroby i które są zdolne do spowodowania uodpornienia tak, że żywiciel jest uodporniony lub mniej podatny na następne infekcje tym samym organizmem pasożytniczym lub pokrewnymi mu organizmami. Po wtóre konieczne jest, żeby ten organizm mógł być otrzymany lub hodowany w stanie żywym, odpowiednim do poddawania naświetleniu promieniami ultrafioletowymi i późniejszego przechowywania dostatecznie długiego, żeby można było wyprodukować i rozprzestrzenić osłabioną szczepionkę. Wiele organizmów pasożytniczych posiada cykle rozwojowe, w których przechodzą one przez liczne różne pod względem morfologicznym i fizjologicznym stadia i zazwyczaj istnieje jedno stadium rozwojowe pasożyta, w którym powoduje ono w organizmie żywiciela objawy patologiczne i drugie stadium inwazyjne, podczas którego następuje przekazywanie infekcji. To ostatnie stadium dostarcza zazwyczaj najodpowiedniejszego materiału do wytwarzania

napromieniowanej, osłabionej szczepionki sposobem według niniejszego wynalazku.

Na przykład *Dictyocaulus viviparus* jest organizmem powodującym robaczycę płuc (*bronchitis et bronchopneumonia verminosa*) u bydła rogatego. Cykl życiowy tego organizmu jest następujący. Larwy infekcyjne znajdujące się na trawach są polykane przez bydło i następnie przenikają przez ścianki jelita, wędrują do węzłów chłonnych i osiągają układ krwionośny za pośrednictwem układu limfatycznego.

W strumieniu krwi przenoszone są one do płuc, rozrywają ściany pęcherzyków płucnych i rozwijają się w kanalikach powietrznych płuc, dochodząc do stadium dojrzałości. W zwierzętach tak zainfekowanych, które powróciły do zdrowia, wytwarza się uodpornienie na powtórna infekcję. Jaja i larwy wytworzone przez dojrzałe osobniki są wykształcane i polykane. Przechodzą przez jelita i są wydzielane z kałem jako pierwsze stadium larw.

Następny rozwój do stadium zakażającego odbywa się na zewnątrz żywiciela. Larwy do celów doświadczalnych otrzymuje się znanym sposobem Baermana'a jak następuje: zakażony kał zawierający larwy, w pierwszym stadium umieszcza się na sicie o bardzo drobnych oczkach, osadzonym w otworze lejka o odpowiednich rozmiarach, napełnionego wodą, dotykającą dolną powierzchnię masy kału i pozostawia w temperaturze pokojowej przez dwadzieścia cztery godziny. W ciągu tego czasu aktywne larwy pierwszego stadium wędrują z masy kału przez oczka sita i osiadają u dołu zamkniętej szyjki lejka. Po dwudziestu czterech godzinach wyjmuje się gęsty osad larw, przemywa się, przenosi do dużej ilości wody i pozostawia w temperaturze pokojowej przez 7—14 dni. Przez ten czas przepuszcza się przez zawieszinę wolny strumień powietrza w postaci pęcherzyków. Pod koniec 7—14 dni larwy rozwijają się i osiągają stadium infekcyjne, stając się odpowiednimi do naświetlania.

Według innego sposobu zakażony kał, zawierający larwy pierwszego stadium, umieszcza się w zlewce jako duży czop z kału o gładkiej powierzchni. Zlewkę umieszcza się w zewnętrznym naczyniu o małej zawartości wody na dnie i szklanej płytce na wierzchu dla utrzymania wilgotnego powietrza.

W ciągu 7—14 dni larwy pierwszego stadium rozwijają się do stadium zakaźnego i wędrują na powierzchnię masy kału. Z tej powierzchni zbiera się larwy przez przemywanie powierzch-

ni kału małą ilością wody. Larwy te nadają się do naświetlania promieniami ultrafioletowymi.

*Eimeria tenella* jest głównym organizmem wywołującym chorobę znaną jako coccidiosis u kurcząt. Kurczęta zakażają się przez połknięcie infekcyjnych oocyst wydzielonych z kałem już zakażonych kurcząt. Oocysty atakują nabłonek jelita ślepego, gdzie ulegają wielostopniowemu rozwojowi, który prowadzi do powstawania oocyst niewytwarzających sporów, te zaś wydalone z kałem rozwijają się w zaraźliwe oocysty wytwarzające spory. To stadium jest używane do naświetlania. W trakcie choroby początek krwawienia zdarza się na 4 dzień, gdy pokazuje się krew w kale. Śmierć może nastąpić na 5-ty lub 6-ty dzień. Oocysty występują w wydzielinach na 8—10-ty dzień. Kurczęta, które wyzdrowiały z tej choroby są uodpornione na następną infekcję, lecz stwierdzono, że następuje zahamowanie ich wzrostu. Oocysty do naświetlania otrzymuje się usuwając zakażone jelito ślepe na 7-my dzień po sztucznym zakażeniu, emulgując tkanki i filtrując emulsję przez gazę muślinową w celu zatrzymania resztek tkanek, a przepuszczenia przez nią oocyst.

Oocysty przemywa się i zagęszcza przez odwirowanie i sedymentacja i konserwuje w 1%-owym roztworze dwuchromianu potasowego przy stężeniu około 500000 na 1 ml. Przechowuje się je w tym roztworze jeszcze 72 godziny w temperaturze 29°C, w którym to czasie wytwarzają one spory i stają się zakaźne. Dwuchromian potasowy usuwa się przez przemywanie wodą przed naświetlaniem promieniami ultrafioletowymi.

Do organizmów, do których można stosować wynalazek, należy też *Fasciola hepatica*, organizm powodujący cysticercosis u bydła rogatego i pasożytniczą gastroenteritis u owiec.

Dla organizmów służących do wytwarzania szczepionek opisanych poniżej stwierdzono, że długość fali skutecznego naświetlania wynosi od 180 mμ do 313 mμ. Tym nie mniej długość fali skutecznego promieniowania zmienna jest w zależności od organizmu i bardziej korzystne warunki dla każdego poszczególnego przypadku można łatwo oznaczyć przez proste doświadczenia zgodne ze wskazówkami i specjalnymi przykładami podanymi w tym opisie. Teoretyczne rozważania wskazują, że szczególnie skuteczne są promienie o długości fali pomiędzy 250 mμ i 270 mμ. Dla wielu organizmów jest korzystna długość fali 253,7 mμ wysyłana przez rezonansowy typ lampy rtęciowej. Do celów praktycznych jako źródło promieniowania w wielu przypadkach jest

bardzo odpowiednia lampa emitująca dużą część swego promieniowania, o tej lub przybliżonej długości fali. Do naświetlania organizmy mogą być zawieszone w środowisku nieszkodliwym dla ich zdolności życiowej i dostatecznie przezroczystym wobec takiego naświetlania.

Wynalazek obejmuje przede wszystkim sposób wytwarzania szczepionek weterynaryjnych, w których pasożyty wewnętrzne komórkowe lub pierwotniaki wywołujące uodpornienie żywiciela zostają osłabione dawką niższą od dawki śmiertelnej naświetlania promieniami ultrafioletowymi, o długości fali od 180 mμ do 313 mμ.

Wynalazek wyjaśniają niżej podane przykłady. We wszystkich doświadczeniach źródłem ultrafioletowych promieni była rtęciowa lampa kwarcowa Hanovia z wydawczą rurą kwarcową w kształcie litery U. Ponad 80% promieniowania było emitowane z zakresu rezonansu 253,7 mμ. Całkowita wydajność lampy przy odległości 8 cm od środka rurki wydawczej wynosiła  $2,18 \times 10^{15}$  kwantów (cm<sup>2</sup>) sekundę mierzona za pomocą kwantomietru zawierającego rotwór szczawianu uranylu (0,001 M) i kwasu szczawowego (0,005 M).

Przykład I. W celu oznaczenia stopnia naświetlania potrzebnego do wytworzenia larw odpowiednio osłabionych do produkcji szczepionki dokonano następującego doświadczenia.

Infekujące larwy *Nippostrongylus muris*, wylęgnięte z jaj znajdujących się w kale zakażonych szczurów, zawieszono w wodzie, przy czym stężenie zawiesiny wynosiło 20000 larw/ml. Odpowiednie ilości tej zawiesiny umieszczono w naczyniu „Perspex” i naświetlano pod lampą kwarcową w okresie 32, 16, 8, 4, 2 i 0 sekund. Przy każdorazowym poddawaniu naświetlaniu głębokość zawiesiny wynosiła w przybliżeniu 4 mm, a odległość wewnętrznej powierzchni dna naczynka od źródła promieniowania wynosiła 8 cm. Poddawaną naświetlaniu zawiesinę doprowadzono do stężenia 5000 larw/1 ml., 0,1 ml tej zawiesiny zaszczipionej podskórnie jest dawką wywołującą infekcję. Zawiesinę z każdego z wymienionych okresów czasu naświetlania zakażono sześć szczurów. Po 7 dniach dokonano autopsji szczurów i bezpośrednio obliczono dojrzałe robaki w cienkim jelicie.

Efekty hamujące wywołane naświetlaniem można ocenić, porównując liczbę dojrzałych robaków znajdujących się w każdej z naświetlanych grup z ilością rozwiniętych z normalnych larw w grupie kontrolnej. Brana pod uwagę gru-

pa kontrolna posiadała 0 % zahamowanych w swej aktywności larw, grupa poddana naświetlaniu przez 32 sekundy 100% zahamowanych osobników. Wyniki podaje tablica I.

Tablica I

| Uzyskane przy sekcji robaki |                                      |    |     |     |     |     |
|-----------------------------|--------------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|
| Szczur                      | Okres czasu naświetlania w sekundach |    |     |     |     |     |
|                             | 32                                   | 16 | 8   | 4   | 2   | 0   |
| 1                           | 0                                    | 18 | 175 | 285 | 287 | 299 |
| 2                           | 0                                    | 17 | 111 | 205 | 239 | 232 |
| 3                           | 0                                    | 12 | 107 | 224 | 273 | 352 |
| 4                           | 0                                    | 20 | 136 | 174 | 265 | 225 |
| 5                           | 0                                    | 24 | 152 | 217 | 280 | 265 |
| 6                           | 0                                    | 20 | 110 | 259 | —   | 263 |
| przeciętnie                 | 0                                    | 19 | 132 | 227 | 269 | 273 |
| % kontrolnych               | 0                                    | 7  | 48  | 83  | 99  | 100 |
| % zahamowanych              | 100                                  | 93 | 52  | 17  | 1   | 0   |

Przykład II. Larwy zakaźne *Nippostrongylus muris*, wylęgnięte z jaj znajdujących się w kale zarażonych szczurów, zawieszono w wodzie w stężeniu 20000 larw/ml. Tę zawiesinę umieszczono w naczyniu „Presplex” o głębokości 1 cm i poddawano naświetlaniu lampą kwarcową przez 20 sekund. Wewnętrzna powierzchnia dna naczynka była odległa o 8 cm od źródła promieni.

Każdemu z czterech szczurów dano w podskórnych zastrzykach całość 1800 naświetlanych larw, w czterech kolejnych zabiegach w 7 dniowych odstępach. Początkowa dawka wynosiła 120 larw, druga 240 larw, trzecia 480 larw a czwarta 960 larw. Kontrolna 5 grupa szczurów nie była zarażona w tym okresie.

Szesnastego dnia po ostatniej dawce larw wszystkim szczurom łącznie z niezarażoną kontrolną grupą dano dawkę zakażającą 4000 normalnych larw na szczura w jednej dawce w zastrzyku podskórnym, następnie w ciągu 15 godzin w dwóch dawkach doustnych (600 mg/kg) jodku benzylodwumetylo-2-fenoksyetyloammonowego w celu uwolnienia szczurów od dojrzałych robaków, powstałych w wyniku początkowego zakażenia. Wiadomo, że sole tego związku nie oddziałują na stadium histotroficzne *Nippostrongylus muris* i nie mają wpływu na późniejszy rozwój normalnej larwy dostarczonej w dawkach szczurom.

Przeprowadzono sekcję pośmiertną wszystkich szczurów na 8 dzień po wprowadzeniu dawki zakażającej i określono liczbę robaków obecnych w jelitach szczurów. Wyniki umieszczone w tablicy II.

Tablica II

|                  | Uodpornione<br>szczury      |        | Kontrolne                   |        |
|------------------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| Szczur           | Ogólna<br>liczba<br>robaków | Rozwój | Ogólna<br>liczba<br>robaków | Rozwój |
| 1                | 0                           | 0,00%  | 1,480                       | 39,00% |
| 2                | 30                          | 0,75%  | 1,790                       | 44,75% |
| 3                | 40                          | 1,00%  | 1,390                       | 34,75% |
| 4                | 30                          | 0,75%  | 1,600                       | 40,00% |
| 5                | —                           | —      | 1,950                       | 48,75% |
| prze-<br>ciężnie | 25                          | 0,63   | 1,660                       | 41,45  |
| % kont-<br>roli  | 1,5                         |        | 100                         |        |

Tablica ta wskazuje, że zakażenie naświetlonymi larwami przed zakażeniem normalnymi larwami wytwarza stopień uodpornienia, który chroni żywiciela przed infekcją.

Przykład III. Cztery szczury, każdy o wadze 50 g, zaszczepiono 900 larwami *Nippostrongylus muris*. Larwy uprzednio naświetlono przez 20 sekund z odległości 8 cm od lampy kwarcowej. Drugie szczepienie podobnie naświetlanymi larwami przeprowadzono w 7 dni później. Po upływie dalszych 14 dni na szczury te i na kontrolną grupę 4 niezaszczepionych szczurów w tym samym wieku podziałano dwiema dawkami bromku benzylodwumetylo-2-fenoksyetyloammonowego przy wysokości dawki 520 mg/kg w celu usunięcia wszystkich dojrzałych robaków, znajdujących się w jelicie. W tym samym czasie każde zwierzę otrzymało dawkę zakażającą z 4000 larw normalnych. W 7 dni później zrobiono sekcję wszystkich szczurów i określono liczbę robaków znajdujących się w jelicie cienkim. Wyniki podane w tablicy III wskazują, że szczury dwukrotnie zaszczepione naświetlonymi larwami stały się prawie zupełnie odporne na dalszą infekcję.

Tablica III

| Dorośle robaki znalezione przy sekcji |                |           |                |
|---------------------------------------|----------------|-----------|----------------|
| Uodpornione szczury                   |                | Kontrolne |                |
| Szczur                                | Liczba robaków | Szczur    | Liczba robaków |
| 1                                     | 60             | 1         | 2120           |
| 2                                     | 50             | 2         | 3270           |
| 3                                     | 10             | 3         | 2270           |
| 4                                     | 0              | 4         | 2270           |
| przeciętnie                           | 30             |           | 2610           |
| % kontroli                            | 1,2            |           | 100            |

Przykład IV. Grupy oocyst *Eimerii tenello* zawieszono w wodzie i zawieszinę umieszczono w naczynku „Perspex” na głębokości 1 cm. Naczynko umieszczono pod lampą kwarcową tak, że dno korytka było odległe o 11,3 cm od źródła i było naświetlane w okresach 32, 16, 8, 4 i 2 sekundy. Dziesięciu grupom kurcząt dano dawki, albo 5000, albo 100000 naświetlonych oocyst

oraz dalszym 2 grupom 5000 i 100000 nienaświetlonych oocyst. Na ósmy dzień każdej grupie dano dawkę zakażającą ze 100000 nienaświetlonych oocyst oraz grupie kontrolnych kurcząt, które poprzednio nie były poddawane żadnym zabiegom. Średnia waga kurcząt w każdej grupie oraz wskaźniki śmiertelności podane są w tablicy IV.

Tablica IV

| Grupa | Początkowa zakaż dawka | Sekundy U. V. | Przeciętna waga/g |         |          | Początkowy wskaźnik śmierteln. | Wskaźnik śmiertelności przy dawce zakażającej |
|-------|------------------------|---------------|-------------------|---------|----------|--------------------------------|-----------------------------------------------|
|       |                        |               | Dzień 0           | Dzień 8 | Dzień 15 |                                |                                               |
| A     | 5000                   | 32            | 85                | 160     | 213      | 0/18                           | 5/18                                          |
| B     | 5000                   | 16            | 84                | 156     | 235      | 0/18                           | 1/18                                          |
| C     | 5000                   | 8             | 84                | 154     | 226      | 0/18                           | 1/18                                          |
| D     | 5000                   | 4             | 85                | 156     | 248      | 0/18                           | 0/18                                          |
| E     | 5000                   | 2             | 85                | 140     | 246      | 2/18                           | 0/16                                          |
| F     | 5000                   | 0             | 87                | 141     | 234      | 2/17                           | 0/15                                          |
| G     | 100000                 | 32            | 87                | 162     | 259      | 0/17                           | 0/17                                          |
| H     | 100000                 | 16            | 86                | 133     | 233      | 0/17                           | 0/17                                          |
| I     | 100000                 | 8             | 86                | 131     | 238      | 5/18                           | 0/13                                          |
| J     | 100000                 | 4             | 84                | 103     | 197      | 11/18                          | 0/7                                           |
| K     | 100000                 | 2             | 85                | 113     | 199      | 9/18                           | 0/9                                           |
| L     | 100000 kontrolna       | 0             | 84                | 124     | 231      | 9/18                           | 0/9                                           |
|       |                        |               |                   |         |          | —                              | 17/25                                         |

W grupach od A do E włącznie, na które podziałano 5000 naświetlonych oocyst, śmierć wystąpiła tylko w grupie E, w której czas naświetlania przez 2 sekundy był najniższy w tych seriach, co wskazuje, że ta dawka jest niedostateczna do wytworzenia zmian w oocystach i można ją porównać z grupą kontrolną F (która otrzymała 5000 nienaświetlonych oocyst). Następna dawka zakażająca z 100000 nienaświetlonych oocyst dana utrzymanym przy życiu osobnikom z grupy A do F wykazała godną uwagi odporność na powtórna infekcję w grupach B, C, D, E i F. W grupie A poziom naświetlania przez 32 sekundy wywarł zbyt silne działanie na oocysty, nie powodując rozwinięcia się choroby będącej następstwem początkowej infekcji i nie wywołując odporności na infekcję zakażającą. W grupach B, C i D naświetlanie przez 16, 8 i 4 sekundy było wystarczające, żeby zmienić oocysty do tego stopnia, aby po dawce początkowej spowodowały uodpornienie kurcząt i aby nie następowały przypadki infekcji śmiertelnej. W wyniku zakażającej dawki występowała mała śmiertelność w grupach B i C, w których naświetlanie wynosiło 16 i 8 sekund. W grupie D o naświetlaniu przez 4 sekundy nie wystąpiły przypadki śmierci spowodowanej dawką zaka-

żającą, co wskazuje na to, że ustaliła się całkowita odporność. W wyniku doświadczeń stwierdzono, że dla dawki 5000 naświetlonych oocyst optymalny czas naświetlania do produkcji szczepionki wynosi od 4 do 16 sekund.

Podobne wyniki uzyskano w grupach G i K, w którym podano jako szczepionkę 100000 oocyst naświetlonych. Zwiększenie liczby oocyst w dawce wymagało dłuższego czasu naświetlania w celu uchronienia przed śmiertelnymi wynikami będącymi następstwem dawki początkowej i wytworzeniu całkowitej odporności przy następnym podaniu zakażającej dawki ze 100000 naświetlonych oocyst. W wyniku tego w grupach G i H, w których odporny czas naświetlania wynosił 32 i 16 sekund, żadne kurczę nie padło po obu kolejnych dawkach. W grupach I, J i K był stosunkowo duży wskaźnik śmiertelności po początkowej dawce naświetlonej, chociaż pozostałe przy życiu uzyskały całkowitą odporność na dawkę zakażającą.

Badanie przyrostu ciężaru kurcząt w różnych grupach pozwala na stwierdzenie, że najbardziej zadawalające warunki osiągnięto w grupach D i G.

Z doświadczenia tego wynika, że w przygotowaniu szczepionki, okres naświetlania należy

przedłużać wraz ze zwiększeniem liczby oocyst w dawce immunizującej. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że żywa naświetlona szczepionka do zabezpieczenia kurcząt przed coccidiosis spowodowaną przez *Eimeria tenella* może być otrzymana przez naświetlanie promieniami ultrafioletowymi oocyst tego organizmu wytwarzających spory i że szczepionka ta może być podawana doustnie.

Przykład V. W doświadczeniu dotyczącym zakażenia cieląt naświetlonymi larwami *Dictyocaulus viviparus* stwierdzono, że liczba larw na 1 g w kale grup cieląt, które otrzymały 3000 larw naświetlonych promieniami ultrafioletowymi przez 8, 16 i 24 sekundy, była znacznie niższą od liczby larw w kale cieląt, które otrzymały 3000 nie naświetlonych larw. Nie stwierdzono zwiększenia liczby larw w wydzielinach, gdy cielętom dano dawkę zakażającą 6000 larw normalnych po 30 dniach od podziałania na nie naświetlonymi larwami, albo w grupie kontrolnej, która uprzednio otrzymała nienaświetlone larwy. Z tego wynioskowano, że podawanie szczepionki zawierającej naświetlone larwy *Dictyocaulus viviparus* nadało odporność odpowiadającą odporności wytworzonej przez larwy normalne podane grupie kontrolnej. U żadnego z cieląt, które otrzymały naświetlone larwy nie rozwinęły się objawy kliniczne robaczycy płuc, jak również nie wystąpiły one u żadnego cielęcia z grup kontrolnych, jako następstwo dawki zakażającej.

Przykład VI. Zakażne larwy *Dictyocaulus viviparus* zawieszono w wodzie przy stężeniu 8000 larw/30 ml i naświetlono w naczynku „Perspex” umieszczonym poniżej rury wyladowczej. Odległość od środka tej rury do wewnętrznej powierzchni dna naczynka wynosiła 8 cm a głębokość zawiesiny wynosiła 1 cm.

Larwy podawano cielętom doustnie w postaci napoju zawierającego larwy w 150—200 ml wody.

Sześć partii zakaźnych larw *Dictyocaulus viviparus* naświetlano przez okres 64, 32, 11, 8, 4 lub 0 sekund i podano sześciu parom cieląt dając 4000 larw na 1 cielę. Następnie obliczono liczbę larw *Dictyocaulus viviparus* w kale cieląt, wskazującą na stopień zakażenia ich płuc. Trzy cielęta padły na trzydziesty dzień po zaszczepieniu. Dwa, które otrzymały szczepionkę naświetloną, w jednym przypadku przez 64 sekundy, w drugim przypadku przez 16 sekund, nie miały robaków w płucach. Trzecie cielę otrzymało nienaświetlone zakażne larwy i w jego płucach znajdowało się 630 robaków.

Pozostałym zaszczepionym cielętom, razem z trzema niezaszczepionymi cielętami na 37-my dzień dano dawkę zakażającą z 8000 nienaświetlonych zakaźnych larw na jedno cielę. Larwy *Dictyocaulus viviparus* policzono w kale cieląt tak jak poprzednio i gdy zwierzęta padły, lub je zabito policzono w ich płucach robaki.

Wyniki tego doświadczenia są zamieszczone w tabelcy V.

Tablica V

| Dzień                               | Larwy liczone w 1 g kału i liczby robaków wydobytych z płuc post mortem |                            |                           |                          |                                        |     |     |     |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------------------|-----|-----|-----|
|                                     | 64 sekundy<br>naświetlania                                              | 32 sekundy<br>naświetlania | 16 sekund<br>naświetlania | 8 sekund<br>naświetlania |                                        |     |     |     |
| 0. Zakazone 4000 naświetlonych larw |                                                                         |                            |                           |                          |                                        |     |     |     |
| 7                                   | 0                                                                       | 0                          | 0                         | 0                        | 0                                      | 0   | 0   |     |
| 21                                  | 0                                                                       | 0                          | 0                         | 0                        | 0,2                                    | 0   | 0   | 0   |
| 23                                  | 0                                                                       | 0,2                        | 0                         | 0                        | 0                                      | 0   | 0   | 0   |
| 25                                  | 0                                                                       | 0                          | 0                         | 0                        | 0                                      | 0   | 0,1 | 0,1 |
| 28                                  | 0                                                                       | 0                          | 0                         | 0                        | 0,1                                    | 0   | 0   | 0,1 |
| 30                                  | 0                                                                       | 0                          | 0                         | 0                        | 0,3                                    | 0   | 0,1 | 0   |
| 32                                  | Po zabi-<br>ciu nie<br>było<br>robaków                                  | 0                          | 0,4                       | 0                        | Po zabi-<br>ciu nie<br>było<br>robaków |     |     |     |
| 35                                  |                                                                         | 1,0                        | 1,3                       | 0,3                      |                                        | 1,3 | 0,6 | 1,7 |

Po dawce zakażającej z 8 000 normalnych zakaźnych larw.

|    |  |                               |                             |                                        |  |      |                               |                             |
|----|--|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------|--|------|-------------------------------|-----------------------------|
| 37 |  | 0,1                           | 0,1                         | 0,1                                    |  | 1,6  | 0,1                           | 0                           |
| 39 |  | 0,2                           | 0,2                         | 0                                      |  | 0,1  | 0,1                           | 0,1                         |
| 42 |  | 0                             | 0                           | 0                                      |  | 0    | 0                             | 0                           |
| 44 |  | 0                             | 0                           | 0                                      |  | 0    | 0                             | 0                           |
| 46 |  | 0                             | 0                           | 0                                      |  | 0    | 0                             | 0,1                         |
| 49 |  | 0                             | 0                           | 0                                      |  | 0    | 0                             | 0                           |
| 51 |  | 0                             | 0                           | 0                                      |  | 0    | 0                             | 0                           |
| 53 |  | 0                             | 0                           | 0                                      |  | 0    | 0                             | 0                           |
| 56 |  | 0                             | 0                           | 0                                      |  | 0    | 0                             | 0                           |
| 58 |  | 0                             | 0                           | 0,5                                    |  | 0    | 0                             | 0                           |
| 60 |  | 11,9                          | 3,3                         | 0,1                                    |  | 0    | 0,5                           | 0                           |
| 63 |  | 20,5                          | 10,5                        | 0,5                                    |  | 11,7 | 11,8                          | 1,7                         |
| 65 |  | 65,0                          | 13,6                        | 0,9                                    |  | 24,1 | 36,5                          | 4,1                         |
| 67 |  | 61,0                          | 26,0                        | 0,9                                    |  | 27,0 | 30,0                          | 2,7                         |
| 70 |  | 35,0                          | 43,0                        | 1,1                                    |  | 53,0 | 38,0                          | 1,5                         |
| 72 |  | 16,0                          | 29,0                        | 0,4                                    |  | 27,0 | 22,0                          | 2,6                         |
| 74 |  | Po zabi-<br>ciu 16<br>robaków | 9,8                         | 0,3                                    |  | 28,6 | 17,1                          | 0,9                         |
| 77 |  |                               | 3,2                         | 0,3                                    |  | 10,5 | 8,9                           | 0,8                         |
| 79 |  |                               | 0,5                         | 0,5                                    |  | 5,3  | 6,4                           | 0,2                         |
| 81 |  |                               | 0                           | 0                                      |  | 1,1  | 2,6                           | 0,7                         |
| 85 |  |                               | 0,1                         | 0,5                                    |  | 0,4  | Po zabi-<br>ciu 13<br>robaków | Po zabi-<br>ciu 1<br>robaka |
|    |  |                               | Po zabi-<br>ciu 1<br>robaka | Po zabi-<br>ciu nie<br>było<br>robaków |  |      |                               |                             |

Tablica V (c. d.)

| Dzień | Larwy liczone w 1 g kału i liczby robaków wydobytych z płuc post mortem |                          |      |                                | Po dawce zakażającej |  | Kontrolne osobniki |
|-------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------|--------------------------------|----------------------|--|--------------------|
|       | 4 sekundy<br>naświetlania                                               | 0 sekund<br>naświetlania |      |                                |                      |  |                    |
| 0     | zakażone 4000 naświetlonych larw                                        |                          |      |                                |                      |  |                    |
| 7     | 0                                                                       | 0                        | 0    | 0                              |                      |  |                    |
| 21    | 0                                                                       | 0                        | 0    | 0,6                            |                      |  |                    |
| 23    | 0                                                                       | 0,2                      | 8,7  | 42,6                           |                      |  |                    |
| 25    | 3,0                                                                     | 0,6                      | 40,5 | 83,3                           |                      |  |                    |
| 28    | 8,7                                                                     | 3,7                      | 238  | 91                             |                      |  |                    |
| 30    | 7,2                                                                     | 2,2                      | 44   | 95                             |                      |  |                    |
| 32    |                                                                         |                          |      | Po zabiciu<br>630 roba-<br>ków |                      |  |                    |
| 35    | 8,8                                                                     | 3,2                      | 18,1 |                                |                      |  |                    |

| Po dawce zakażającej z 8000 normalnych zakaźnych larw |                          |                         |                                   |  |                          |                      |      |
|-------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------------|--|--------------------------|----------------------|------|
| 37                                                    | 9,2                      | 0,6                     | 17,8                              |  |                          |                      |      |
| 39                                                    | 8,4                      | 2,1                     | 12,0                              |  |                          |                      |      |
| 42                                                    | 9,4                      | 3,2                     | 5,8                               |  |                          |                      |      |
| 46                                                    | 9,0                      | 2,3                     | 3,0                               |  |                          |                      |      |
| 48                                                    | 4,0                      | 1,2                     | 1,2                               |  |                          |                      |      |
| 49                                                    | 8,5                      | 0,8                     | 1,1                               |  |                          |                      |      |
| 51                                                    | 12,9                     | 0                       | 0,2                               |  |                          |                      |      |
| 53                                                    | 8,0                      | 0                       | 0                                 |  |                          |                      |      |
| 56                                                    | 13,1                     | 0                       | 0,2                               |  |                          |                      |      |
| 58                                                    | 12,0                     | 0                       | 0,1                               |  | 0,3                      | 0                    | 0    |
| 60                                                    | 3,0                      | 0                       | 0                                 |  | 33,5                     | 52,2                 | 8,0  |
| 63                                                    | 4,0                      | 0,5                     | 0                                 |  | W padłych<br>1193 robaki | 237                  | 30,0 |
| 65                                                    | 7,4                      | 1,5                     | 0                                 |  |                          | 331                  | 58,0 |
| 67                                                    | 6,2                      | 1,4                     | 0                                 |  |                          | 372                  | 55   |
| 70                                                    | 6,9                      | 0,4                     | 0,4                               |  |                          | 1046                 | 42   |
| 72                                                    | 5,5                      | 0,4                     | 0,2                               |  |                          | 1262                 | 21   |
| 74                                                    | 7,7                      | Po zabiciu<br>6 robaków | Po zabiciu<br>nie było<br>robaków |  |                          | 742                  | 11,8 |
| 77                                                    | 2,8                      |                         |                                   |  |                          | 456                  | 3,7  |
| 79                                                    | 4,0                      |                         |                                   |  |                          | 769                  | 1,5  |
| 81                                                    | 0,9                      |                         |                                   |  |                          | padło 649<br>robaków | 0    |
| 85                                                    | Po zabiciu<br>12 robaków |                         |                                   |  |                          |                      | 0    |

Dwa z trzech nie zaszczepionych cieląt padło wskutek robaczycy płuc w wyniku dawki zakażającej i wiele setek robaków znaleziono w ich płucach, trzecie cielę nabawiło się chorobą lecz wyzdrowiało.

Z zaszczepionych cieląt, te które otrzymały naświetloną szczepionkę przechodziły lekko chorobę lub wcale jej nie przechodziły i posiadały w wysokim stopniu odporność na infekcję wywołaną zakażeniem. Cielęta zaszczepione nienaświetlonymi larwami zapadły na robaczycę płuc, jedno zostało zabite na 30-ty dzień, a inne wyzdrowiały i osiągnęły w wysokim stopniu odporności na infekcję wywołaną dawką zakażającą.

Szczepionka wytworzona sposobem według wynalazku przez naświetlanie promieniami ultrafioletowymi zakaźnej larwy *Dictyocaulus viviparus*, jak wykazano, wywołuje odporność u cieląt bez objawów normalnie towarzyszących pierwszej infekcji.

Przykład VII. Zakaźne larwy *Dictyocaulus filaria* otrzymane z kału zarażonych owiec zawieszono w wodzie i naświetlano pod lampą kwarcową w sposób opisany w przykładzie VI, w ciągu 16 sekund.

Dwie grupy po 6 świń gwinejskich zarażono doustnie larwami *Dictyocaulus filaria*: pierwsza grupa otrzymała 3000 naświetlonych larw na zwierzę, a druga otrzymała 3000 nienaświetlonych larw na zwierzę. Jedno zwierzę z każdej grupy było poddawane autopsji na 11-ty, 16-ty i 21-szy dzień po początkowej infekcji i znalezione robaki przeliczono.

Pozostałym zwierzętom razem z 3 uprzednio niezarażonymi gwinejskimi świniami (kontrolna dawka zakażająca) wprowadzono dawkę zakażającą z 6000 nienaświetlonych zakaźnych larw *Dictyocaulus filaria* na zwierzę. Robiono autopsję jednego zwierzęcia z każdej grupy na 11-ty, 16-ty i 21-szy dzień po zakażeniu, wyniki przedstawione są w tablicy VI.

Tablica VI

| Początkowe infekcje                     | Liczba robaków znalezionych post mortem |     |    |                                 |                              |    |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----|----|---------------------------------|------------------------------|----|
|                                         | Dni po początkowej infekcji             |     |    | Dni po zażeniu dawką zakażającą |                              |    |
|                                         | 11                                      | 16  | 21 | 11                              | 16                           | 21 |
| naświetlone larwy                       | 31                                      | 3   | 0  | 0                               | 0                            | 0  |
| nienaświetlone larwy                    | 110                                     | 143 | 29 | 0                               | padły przed dawką zakażającą |    |
| Po dawce zakażającej osobniki kontrolne | —                                       | —   | —  | 159                             | 161                          | 70 |

Tablica wskazuje, że świnię gwinejskie, które otrzymały naświetlone larwy *Dictyocaulus filaria* były bardzo słabo zarobaczone i nabrały odporności na dawkę zakażającą z normalnych larw. Zwierzęta początkowo zarażone nienaświetlony-

mi larwami osiągnęły bardzo duże zarobaczenie i dwa padły przed autopsją. Osobniki kontrolne osiągnęły bardzo duże zarobaczenie od dawki zakażającej.

#### Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania szczepionki weterynaryjnej, znamieny tym, że pasożyta wewnętrznego komórkowego lub pierwotniaka, wywołującego reakcję uodpornienia w żywicielu, w szczególności nematodę, np. *Dictyocaulus viviparus*, osłabia się w stadium zakażającym przez naświetlanie promieniami ultrafioletowymi o długości fali wynoszącej od 180 mμ do 313 mμ, dawką promieni poniżej dawki śmiertelnej, najkorzystniej dawką promieni o długości fali w granicach od 250 mμ do 270 mμ, np. 253,7 mμ.

The Wellcome Foundation Limited

Zastępca: mgr Józef Kamiński  
rzecznik patentowy