

# EGYES OLTÓANYAGOK TERMELÉSÉNEK ÉS ELLENŐRZÉSÉNEK KORSZERŰSÍTÉSE

SIMONYI ERZSÉBET

az állatorvostudományok kandidátusa

Amióta JENNER felfedezte az emberi himlő elleni oltást, de főleg amióta PASTEUR elvégezte első immunizáló kísérleteit csökkent virulenciájú lépfenétörzsével, megindult a fertőző betegségek megelőzését célzó oltási módszerek kidolgozása. BEHRING munkássága pedig megvetette a szérumterápia alapjait és a fertőző betegségek egész soránál vált lehetségessé magas értékű vérsavók felhasználásával nemcsak a betegség megelőzése, hanem gyógyítása is.

A századforduló óta egyre több oltóanyag készült állatgyógyászati célra is.

Az oltások nagy közegészségügyi és állategészségügyi jelentősége miatt, minden ország valamely hozzáértő intézménnyel hivatalosan ellenőrizteti az oltóanyagokat.

Hazánkban az állatgyógyászati oltóanyagok már hosszú idő óta állami ellenőrzés alatt állnak. Az oltóanyagok állami ellenőrzéséről először az állategészségügyről szóló 1888. évi törvényben találunk rendelkezést. Kezdetben az Állatorvosi Főiskola Bakteriológiai Intézete, majd később az Országos Állategészségügyi Intézet végezte az oltó- és kórjelző anyagok állami ellenőrző vizsgálatát.

A második világháborút követően igen sok fertőző betegség járványos formában terjedt el hazánkban. Ezek felszámolásához, a többi között, igen sok oltóanyagra is szükség volt. Később a mezőgazdaság szocialista átszervezése, a nagyüzemi állattenyésztés kialakulása új feladatok elé állította a magyar állategészségügyi szolgálatot és még inkább az oltóanyagtermelést. A tudomány és technika soha nem látott ütemű fejlődése az immunprophylaxis és a terápia területén a hazai oltóanyagtermelésben is éreztette jótékony hatását és több, korábban még nem ismert oltóanyag előállítását kezdték meg.

Az új és régi oltóanyagok nagy mennyiségű termelése, a megelőző oltási eljárások széles körű bevezetése, a legjelentősebb oltóanyagok ingyenessé tétele az állattartók számára, természetszerűleg az oltóanyagok iránt támasztott minőségi követelmények fokozódását is maga után vonta. Ez tette szükségessé önálló oltóanyagellenőrző intézet létrehozását. Az intézet megszervezésére

megbízást kaptam és az, Állatgyógyászati Oltóanyagellenőrző Intézet néven 1952. augusztus 1-én meg is kezdte működését.

Az intézet rutinmunkája az oltó- és kórjelző anyagok sterilitásának, ártalmatlanságának és hatékonyságának az ellenőrzése; kutatómunkája pedig elsősorban új kipróbálási és új oltási eljárások kidolgozására irányult. Kísérleti munkám, dolgozataim beilleszkednek az intézet feladatkörébe, lényegében három vírusos betegség: a kutyák fertőző májgyulladás, a sertéspestis és a szarvasmarha vírusos hasmenése témakörébe sorolhatók. Téziseimben az elmúlt 20 év alatt elért eredményeimet foglalom össze.

Az oltóanyagok ártalmatlanságának és hatékonyságának ellenőrzése jórészt biológiai módszerrel, kísérleti állatoltással történik. Lehetőleg azon az állatfajon próbáljuk ki az oltóanyagokat, amelyen az felhasználásra kerül. Bár e biológiai értékmérés kitűnő tájékoztató eredményt nyújt, finomabb kvantitatív vizsgálatra mégsem alkalmas, minthogy az eredmények nem egyöntetűek, amellet nehezen reprodukálhatók. A hibák elsősorban a kísérleti állatok egyedi, illetve örökletesen eltérő érzékenységből, másrészt a változó kísérleti körülményekből adódnak. Kétségtelen, hogy standardnak tekinthető készítmény párhuzamos kipróbálásával, ismert értékű fertőző anyag használatával és a kísérleti állatok számának növelésével egyenletesebb eredményhez lehet jutni, de a biológiai értékmérésből származó hibák még így sem szüntethetők meg. Ezenkívül e biológiai eljárás drága és hosszadalmas is. Érthető ezért az a törekvésünk, hogy egyes oltóanyagok biológiai értékmérését gyors, olcsó, amellet jól reprodukálható, egzaktabb eredményt nyújtó eljárással helyettesítsük.

1957-ben kezdtem meg a szövettenyésztési módszereket alkalmazni az oltóanyagok ellenőrzésében. A szövettenyészetek ugyanis némely vírusok cytopathogén hatása folytán alkalmasnak bizonyultak élővírusvakcinák infekatív titerének a meghatározására és mivel e sejtkárosító hatást specifikus savók közömbösíteni tudják, szérumok értékmérésére is felhasználhatók. Alkalmasnak bizonyult e módszer attenuált élővírus-vakcina előállítására, valamint a nagy mennyiségben elszaporított vírustenyészet, antigénként, immunsavók termelésére is.

Modell-kísérletként megkíséréltem a *kutyák fertőző májgyulladásának, a Rubarth-féle betegségnek* vírusát egyrétegű sejtenyészetben elszaporítani. Távlatos célom az volt, hogy egyrészt a szövetvírus felhasználásával a kereskedésbeli, fertőző májgyulladás elleni szérum hatékonyságának ellenőrzésére új módszert dolgozzak ki, másrészt megfelelően szelídített vírustörzset kísérleljek meg előállítani, aktív immunizálás céljára.

Kísérleteimből megállapítottam, hogy a *Rubarth-kór* vírusa sertésveseszövettenyészetben is elszaporodik, de szövetkárosodást nem okoz. Kutyaveseszövettenyészetben a vírus elszaporodik és a hámsejtekben cytopathogén hatást fejt ki. A specifikus savó közömbösíti a vírus cytopathogén hatását.

Ugyanezeket a vizsgálatokat elvégeztem az *Aujeszky*-féle betegség vírusával is. Számos kísérlet során bebizonyosodott, hogy a próba specifikus és jól reprodukálható. A szövettanyészetben alkalmazott vírusközömbösítési próbával párhuzamosan elvégeztem az előírás szerinti állatoltásokat is. Mivel az állatoltások csupán hozzávetőlegesen tájékoztatnak a szérumok értékéről és az egyes szérumok titere közötti kisebb különbségek megállapítását nem teszi lehetővé, erre a célra a szövettanyészetben végzett vírusneutralizációs próbát kezdtem felhasználni.

A szövettanyészetben végzett vírusközömbösítési próba alkalmas módszernek bizonyult mindazoknak a vírusellenes szérumoknak az értékmérésére, amelyek termeléséhez felhasznált vírusnak cytopathogén hatása van. A módszert rutin vizsgálatainkba bevezettük és azóta sikeresen alkalmazzuk.

A szövettanyészetek széles körű felhasználásával, a vírusok beható tanulmányozásával egyidejűleg megállapítást nyert az is, hogy a szövettanyészetekben latens, inapparens vírusfertőzések igen gyakoriak. Vírusok lehetnek jelen a szövettanyészetekben anélkül, hogy a sejteket károsítanák, máskor viszont különböző szervekből készített primer szövettanyészetekben az ágens jelenléte a spontán, minden fertőzés nélkül bekövetkező cytopathogén hatás alapján felismerhető.

Az állati megbetegedéseket okozó vírusok kutatásában hazánkban elsőként sikerült ilyen megállapítást tennem. 1962-ben számoltam be ugyanis arról, hogy 2 hónapos, egészségesnek látszó kölyökkutya tripszinezett egyrétegű vesesejttenyészetéből spontán destrukciót okozó cytopathogén ágenszt izoláltam, amely szűrhető és kutyavese-szövettanyészetben továbbtenyészhető volt. Fertőzési kísérletekkel és vírusneutralizációs próbákkal végzett meghatározás során az izolált ágens a *Rubárh*-féle betegség vírusának bizonyult.

Az azóta eltelt időben számos hazai és külföldi közlés jelent meg a primer szövettanyészetek latens vírusos fertőzöttségének gyakori előfordulásáról.

A szövettanyészetek, elsősorban a primer sejttenyészetek inapparens vírushatásának nemcsak a víruskutatásban, a vírusok meghatározásában okoz zavart, hanem megnehezíti az élővírus-vakcinák termelését és ellenőrzését is. Kétségtelen, hogy a primer sejttenyészetek előállításának és alkalmazásának legegyszerűbb és a leggazdaságosabb, továbbá ezek a legérzékenyebbek a legkülönbözőbb vírusok iránt, mégis vakcina, főleg élővírus-vakcina termeléséhez való felhasználásuk nem ajánlatos, sőt veszélyes a már említett gyakori vírusos fertőzöttség miatt. Megbízható, vírusos és egyéb fertőző ágenssel való szennyezettégtől mentes primer szövettanyészetet csak úgy lehet nyerni és aggály nélkül víruskutatáshoz, vakcinatermeléshez felhasználni, ha azt SPF állatok szerveiből állítják elő. Amíg megbízható SPF állományok kialakítása lehetővé nem válik, nem ajánlatos primer sejttenyészeteket vírusok meghatározásához vagy oltóanyag termeléséhez használni.

A kutyák fertőző májgyulladásának vírusával végzett vizsgálataimnak további célja megfelelő aktív immunizálási eljárás kidolgozása volt. Vizsgáltam a sertés- és a kutyavese-szövettenyészethez adaptált és sorozatos szövetpaszszázon átvitt *Rubarth*-vírus és a primer vesesejttenyészetből izolált vírus immunogén tulajdonságát. Különösen ez utóbbi bizonyult igen jó immunogén hatásúnak és csökkent vírulenciájúnak. Kísérleteimből kitűnt azonban az is, hogy e vírustörzs nem teljesen ártalmatlan, ezért oltóanyag-termeléshez nem javasoltam.

Intézetünknek hosszú ideig egyik legfontosabb feladata volt a *sertéspestis* elleni oltóanyagok ellenőrző vizsgálata. Így a kristályibolya vakcina ártalmatlansági, de főleg hatékonysági vizsgálata során sok értékes megfigyelést tettünk és sok hasznos tapasztalatot gyűjtöttünk.

A kristályibolya-vakcina ártalmatlanságának ellenőrzése során felmerült az a kérdés, hogy a vakcina a vele oltott sertésekben okoz-e sertéspestisre utaló kórbonctani elváltozásokat, és ha igen, van-e megbetegítő hatása a kórbonctani elváltozásokat mutató sertések vérének.

E kérdések tisztázására végzett vizsgálatokkal sikerült megállapítanom, hogy a kristályibolya-vakcinával oltott sertések egy részében az oltóanyagban foglalt szaporodásra nem képes vírus hatására is jelentkeznek csekély kiterjedésben ugyanolyan kóros elváltozások, mint amilyenek a sertéspestis-esetekben előfordulnak (infarctusok a lépben, vérzések). Az ilyen sertések klinikailag egészségesnek mutatkoznak, és vérükkel sem sertéspestis iránt fogékony süldőket, sem nem immunizált kocák szopós malacait megbetegíteni, sem immunizálni nem lehet, azok sertéspestis iránt fogékonyak maradnak. A kristályibolya-vakcina alkalmazása tehát diagnosztikai nehézségeket is támasztott. Az oltás után kb. 2 héten belül valami okból boncolásra kerülő állatok esetében nagy óvatosságra volt szükség a sertéspestisre utaló elváltozások értelmezésében.

Közlésemig, az igen nagy számú külföldi és hazai irodalomban hasonló megállapítás nem jelent meg. Kevéssel később POTEI megerősítette megállapításomat, ő a központi idegrendszerben talált sertéspestisre utaló kórbonctani, illetve, kórszöveti elváltozásokat kristályibolya vakcinával oltott sertésekben.

A szövettenyésztés elterjedése a sertéspestis-kutatásban is előrehaladást jelentett. Számos kutató igyekezett a sertéspestisvírust különböző szövetekben elszaporítani. A kutatások sikerét gátolta az a tény, hogy a sertéspestisvírus ugyan elszaporodik a szövettenyészetben, de nincs cytopathogén hatása. Többen ezért közvetett úton igyekeztek e célt elérni.

GILLESPIE és munkatársainak 1960-ban sikerült egy olyan sertéspestis-vírus-törzset találni, amely, közlésük szerint, sertésvese-tenyészetben cytopathogén hatást fejt ki, és ez a hatás immunsavóval neutralizálható. E vírustörzssel végzett neutralizációs próbát alkalmasnak találták a sertéspestis

elleni immunitás kimutatására. E sikeres eredmények miatt érdemesnek látszott e vírustörzset megvizsgálni.

A vizsgálatok célja az volt, hogy a cytopathogén törzssel végzett vírusneutralizációs próbát sertéspestisszérumok értékmérésére használjuk fel. Sajnos évekig tartó vizsgálataim eredménytelenek maradtak, a legkülönbözőbb tápfolyadékok, savók, tenyészetek alkalmazásával sem sikerült e törzssel cytopathogén hatást elérni.

A kutatók már régen törekszenek arra, hogy valamely betegség ellen a kórokozóval rokon, de csak más állatfajt megbetegítő törzssel védekezzenek. Méltán keltett nagy érdeklődést ezért BECKENHAUER és munkatársainak 1961-ben megjelent közleménye, amelyben sikeres sertéspestis elleni immunizálási kísérletekről számoltak be az Oregon C<sub>24</sub>V borjúdiarrhoea (VD)-vírustörzssel.

E közlemény megjelenése óta számos kutató foglalkozott a két vírustörzs közötti antigénrokonság kérdésével, továbbá a sertéspestis elleni immunizálás lehetőségével.

A külföldi közlemények hatására szükségesnek látszott e kérdés behatóbb vizsgálata.

A törzset borjúembryóvese-szövettenyészetben szaporítottuk el, majd megkíséreltük a sertések immunizálását. Sertés immunizálási kísérleteim nem vezettek eredményre. Vizsgáltam, hogy magas értékű, borjúdiarrhoea elleni szérum megvédi-e a sertéseket az egyidejűleg oltott sertéspestisvírussal szemben, továbbá hogy a magas értékű sertéspestisszérum megvédi-e a borjakat az egyidejűleg befecskendezett VD-vírussal szemben. Megállapítottam, hogy a hyperimmun szérumok csak a homológ vírussal szemben védik meg a vele oltott sertést, illetve borjút. Védési kísérleteimmel tehát nem tudtam antigénrokonságot kimutatni a sertéspestis és a borjúdiarrhoea vírusa között.

A továbbiakban megkíséreltem szerológiai rokonságot kimutatni a két vírustörzs között. Megkíséreltem a sertéspestis elleni szérumok értékmérését az Oregon C<sub>24</sub>V vírustörzs neutralizálásával. Kísérleteim sikerrel jártak és igazolták külföldi szerzők megállapításait, hogy a sertéspestisvírus és az Oregon<sub>24</sub>V borjúdiarrhoea-vírustörzs között antigénszerkezethelyi rokonság van. A kereskedésbeli sertéspestisszérum magas titerben neutralizálja az Oregon vírust. E módszer jól kiegészíti a szérumok értékéről csupán hozzávetőlegesen tájékoztató sertésvédési kísérleteket.

Az intenzív állattartás, a szarvasmarha-állományokban, elsősorban a borjúnevelőkben is felszínre hozott egy sor olyan betegséget, amelyek ez ideig nem okoztak nagyobb gondot. A rossz tartási és takarmányozási körülmények okozta betegségeken kívül, fertőző betegségek, főleg különböző vírusok okozta bántalmak is jelentkeztek.

Egyik, külföldön és hazánkban is legsúlyosabb károkat előidéző kórokozó a *szarvasmarha vírusos hasmenésének* vírusa.

Sertéspestises kísérleteimben dolgoztam a vírusos hasmenés két prototípus

vírustermsével; a cytopathogén Oregon C<sub>24</sub>V és a virulens, nem cytopathogén NY<sub>1</sub> birtokomban volt. A két vírustörzssel szerzett laboratóriumi tapasztalataimat megkíséreltem hasznosítani a szarvasmarha-tenyésztésben egyre nagyobb károkat okozó betegség elleni védekezésben, és munkatársaimmal specifikus védekezési eljárást dolgoztunk ki e betegség ellen.

Első lépésként magas értékű hyperimmun szérumot állítottunk elő. A szérum értékmérését szövettanban vírusközömbösítési próbával végeztük. A szérum gyakorlati kipróbálása előtt e próbát borjújvédési vizsgálattal ellenőriztük. Tisztáztuk az összefüggést a szérum neutralizáló titere és védőhatása között.

A szérumot a gyakorlatban nagyszámú állaton is kipróbáltuk, és a kapott eredmények alapján beteg állatok gyógyítására és erős fertőzésnek kitett állatok kezelésére javasoltuk.

A szérum beváltotta a hozzáfűzött reményeket, de természetesen a betegség felszámolására nem volt alkalmas. Ezért már a szérum termelésével egyidejűleg megkezdtük kísérleteinket megfelelő aktív immunizáló eljárás, jó antigénhatású vakcina előállítására, megfelelő, tartós védettség kialakítására.

Az Oregon C<sub>24</sub>V vírustörzs virulenciáját szövet- és közbeiktatott állatpasszázssokkal sikerült oly mértékben szelidítenünk, hogy az a borjak számára ártalmatlanná vált, de ugyanakkor jól immunizált.

A betegség iránt fogékony borjak oltásával meggyőződünk a vakcina-törzs ártalmatlanságáról. Megállapítottuk, hogy az oltott borjak ürítik ugyan a vírust, de ez a vírus az oltottakkal együtt tartott kontroll állatokat nem betegíti meg. Az oltott állatokban ritkán előforduló oltási reakció nagyon enyhe.

Laboratóriumi kísérletekben vizsgáltuk az immunitás kialakulását és tartósságát, valamint a neutralizáló ellenanyagok megjelenését és titerét. Miután megállapítottuk, hogy a liofilizált vakcinával 4—6 heti időközben két ízben oltott állatok nemcsak a természetes, hanem az igen masszív mesterséges fertőzésnek is ellenállnak, három állami gazdaságban sok száz állaton a gyakorlatban is kipróbáltuk.

Ezekben a gazdaságokban sikerült a betegség kártételét nagymértékben csökkentenünk, nemcsak azért, hogy az immunizáló oltásban részesült állatoknak csak igen kis százaléka betegedett meg, hanem azért is, hogy az oltott és oltatlan állatok súlygyarapodása között is szembetűnő különbség mutatkozott.

Vaksinánkat kezdetben primer borjúembryóvese-sejttenyészetben állítottuk elő. A tömegtermelés megindítása előtt azonban megkíséreltük ezt az attenuált, igen jó antigénhatású vírustörzset a *Markovits—Vékes-féle* diploid borjúvese-, illetve heresejtvonal tenyészetében elszaporítani. Egyre több szakember tartja ugyanis aggályosnak az élővírus-vakcinák termelését primer sejtenyészetekben.

Jelenleg a diploid sejtörzseket tartják a legalkalmasabbaknak élővírus-vakcinák előállításához. E sejtvonalak kromoszóma-száma ugyanis állandó, vírusérzékenységük megegyezik a kiindulási primer tenyészetével és nincs malignus morfológiai jellegük.

A diploid sejtvonalon elszaporított vírustörzs titerét, immunizálóképességét és ártalmatlanságát igen gondosan megvizsgáltuk a laboratóriumban, majd a gyakorlatban végzett több száz kísérleti állatoltás után meggyőződünk arról, hogy a törzs megtartotta eredeti tulajdonságait.

A vizsgálatok befejezése után adtuk át a törzset a Phylaxiának oltóanyag-termelésre. A vakcina „Védévac” néven kerül forgalomba és ez az első magyar élővírus-vakcina, amelyet diploid sejtvonalon állítanak elő.