

Danuta Seroka

THE CENTURY OF THE STUDIES ON RABIES IN THE NATIONAL INSTITUTE OF HYGIENE IN WARSAW

STULECIE BADAŃ NAD WŚCIEKLIZNĄ W PAŃSTWOWYM ZAKŁADZIE HIGIENY W WARSZAWIE

Retired habilitated doctor in the Department of Epidemiology of the National Institute of Hygiene in Warsaw

Emerytowany doktor habilitowany Zakładu Epidemiologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

ABSTRACT

The beginning of Polish science of rabies is dated as of the 29th June 1886. At that time, the Polish doctor - Odo Bujwid, the student of Louis Pasteur, opened the second Pasteur Institute in Warsaw. The first one was established in Paris. In 1918, this Institute as the Pasteur Division was integrated with the emerging National Institute of Epidemiology which since 1923 was referred to as the National Institute of Hygiene in Warsaw at Chocimska 24. Up to 1939, two periods may be distinguished in the operation of this Division:

* 1886-1927 – production, usage and modification of the vaccine formula by Pasteur;

* 1928-1939 – production and usage of the vaccine phenolized by the Semple method.

Warsaw Division was also an effective organizer of vaccinations. It carried out a registry and assessed the safety and effectiveness of its vaccine as well as evaluated the epizootic in the country. It also cooperated with the Veterinary Service on the vaccination schedule of dogs and conducted diagnostics.

In 1951, this Division as the production department was combined with the Warsaw Manufactory of Sera and Vaccines.

In the NIH, issues concerning rabies were moved to the Department of Sera and Vaccines which was the National Inspector of Sera and Vaccines and to the Department of Epidemiology.

In 1952-2016, the following activities were undertaken in the Department of Epidemiology:

1. Continuation of the pre-war epidemiological and epizootic analysis of rabies in the country. Implementation of epidemiological assessment of effectiveness and safety of vaccines and serum used;
2. Introduction of modern virologic and serological diagnostic methods of rabies which replaced the drastic methods of examinations on animals;
3. Possibility of infection with rabies virus through food-borne route;
4. Assessment of biological and antigen properties of vaccines and vaccine strains of rabies virus in comparison to wild strains isolated from different population of animals in Poland;
5. Introduction of vaccine free from neural tissue for the vaccinations in humans in Poland;
6. Epidemiological safety of oral vaccines with a live, attenuated virus in the population of wild animals;
7. Introduction of molecular biology methods into the diagnostics of rabies, characterization of epizootic, control over the genetic stability of vaccine strains and genotypes and variants of wild viruses circulating in the environment.

In 1886-2014, a total of 142 421 animals infected with rabies virus were detected, including 43 943 wild animals and 105 bats. A total of 1 078 persons died due to rabies. As many as 386 356 persons were vaccinated against rabies.

Key words: *rabies, epidemiological surveillance, epizootic, viral genotypes, in vitro diagnostics, orally transmitted disease, vaccines, vaccine-based immunity, molecular biology*

STRESZCZENIE

Początek polskiej nauki o wściekliznie datuje się na dzień 29 czerwca 1886 roku, gdy polski lekarz Odo Bujwid, uczeń Ludwika Pasteura otworzył drugi na świecie, po paryskim, Zakład Pasteurowski w Warszawie. Zakład ten w 1918 roku włączono jako Oddział Pasteurowski do tworzącego się Państwowego Zakładu Epidemiologicznego, od 1923 r. Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie, przy ul. Chocimskiej 24.

W działalności Oddziału do roku 1939 należy wyróżnić dwa okresy:

* lata 1886-1927 – okres produkcji, stosowania i modyfikacji receptury szczepionki wg Pasteura;

* lata 1928-1939 – okres produkcji i stosowania szczepionki fenolizowanej wg metody Semple'a

Oddział warszawski był również skutecznym organizatorem szczepień, prowadził rejestrację i ocenę bezpieczeństwa i skuteczności swego preparatu, ocenę rozmiaru epizootii w kraju, współpracował ze Służbą Weterynaryjną nad planami szczepienia psów, prowadził diagnostykę.

W 1951 roku oddział został włączony do Warszawskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek jako oddział produkcyjny.

W PZH problemy wścieklizny zostały przekazane do Zakładu Badania Surowic i Szczepionek jako Państwowego Kontrolera Surowic i Szczepionek oraz do Zakładu Epidemiologii.

W latach 1952-2016 w Zakładzie Epidemiologii realizowano następujące zadania:

1. Kontynuacja przedwojennej analizy sytuacji epidemiologicznej i epizootycznej wścieklizny w kraju. Wdrożenie epidemiologicznej oceny skuteczności i bezpieczeństwa stosowanej szczepionki oraz surowicy odpornościowej;
2. Wprowadzenie współczesnych metod diagnostyki wirusologicznej i serologicznej wścieklizny, eliminujących drastyczne metody badań na zwierzętach;
3. Możliwość zakażenia wścieklizną na drodze pokarmowej;
4. Ocena biologicznych i antygenowych właściwości szczepionek i szczepów szczepionkowych wirusa wścieklizny wobec ulicznych szczepów izolowanych w różnorodnych populacjach zwierząt w Polsce;
5. Wprowadzenie do szczepień ludzi w Polsce szczepionki wolnej od tkanki nerwowej
6. Bezpieczeństwo epidemiologiczne doustnych szczepień zwierząt dzikich żywym atenuowanym wirusem;
7. Wprowadzenie metod biologii molekularnej do diagnostyki wścieklizny, charakterystyki epizootii, kontroli stabilności genetycznej szczepów szczepionkowych oraz genotypów i wariantów krążących w przyrodzie wirusów ulicznych.

W latach 1886-2014 zdiagnozowano 142 421 chorych zwierząt w tym 43 943 dzikich i 105 nietoperzy. Zmarło 1 078 osób, zaszczepiono 386 356 osób.

Słowa kluczowe: wścieklizna, nadzór epidemiologiczny, epizootia, genotypy wirusów, diagnostyka *in vitro*, zakażenie doustne, szczepionki, moc uodparniająca szczepionek, biologia molekularna

INTRODUCTION

The Polish science of rabies was commenced in March 1886 when Odo Bujwid moved to the Pasteur Institute in Paris for a three month stay to gain theoretical and practical knowledge on the vaccines against rabies (1,3). It was possible thanks to the intervention of Tytus Chałubiński. He was awarded a 1000 roubles subvention from the Mianowski Fund.

In his studies on the 'rabies germ' (rabies virus was referred to as 'germ'), Louis Pasteur discovered that the transplanted of the germ from one animal to another modifies its virulence ('poisonousness') properties following 50 successive subdural transplantations from rabbit to rabbit.

Incubation period in case of the rabbit was determined at 8-9 days. In the successive studies, the notion virus fixe was applied.

WSTĘP

Polska nauka o wściekliznie została zapoczątkowana w marcu 1886 roku, gdy Odo Bujwid, wyjechał na trzymiesięczny pobyt w Instytucie Pasteura w Paryżu w celu zdobycia teoretycznej i praktycznej wiedzy o szczepieniach przeciw wodowstrętowi (1,3). Było to możliwe, bo dzięki interwencji Tytusa Chałubińskiego otrzymał 1000 rublową subwencję z Kasy Mianowskiego.

Właśnie Ludwik Pasteur w swoich badaniach „zarazka wścieklizny” (uliczny wirus wścieklizny nazywany wtedy „zarazkiem”) wykrył, że przeszczepianie tego zarazka z jednego zwierzęcia na drugie, po 50 kolejnych podoponowych przeszczepach z królika na królika, zmienia cechy jego wirulencji („jadowitości”).

Okres wylęgania choroby u królika „ustalił się” na 8-9 dni; a w dalszych badaniach stosowano pojęcie „zarazka stałego” – wirus fixe.

The medulla of the rabbit infected with the virus fixe at that level of culture, maintained at 23°C, with no light, in the presence of potassium hydroxide at the bottom of the laboratory flask, gradually was losing its virulence under such conditions.

Following 12-15 days, virus fixe did not kill the rabbit after the subdural infection; following 6-12 days, it killed inconstantly while from 1 to 5 days, it did not lose its virulence. It was the basis for the achievement of vaccine against this fatal disease.

As many as 2,5 mm of the medulla was cut and pounded with physiological NaCl. Then, 2 cm of this solution was injected subcutaneously to human in the area of umbilicus.

Infected individuals were treated for 21 days or longer using medullas dried for a shorter periods of time (2).

The elaboration of this procedure was accompanied by a huge workload and experience on animals with simultaneous unsympathetic and critical opinions of the worldwide scientists (1).

Knowledge, talent, diligence, honesty and scientific intuition of Bujwid gained the appreciation and never ending friendship of Pasteur (1). While leaving, Bujwid received from him two rabbits infected with virus fixe.

On the 29th June 1886, Bujwid together with his wife established the first branch of the Pasteur Institute in Warsaw at Wilcza 6 in two-room apartment with kitchen where he was living. They were buying the rabbits every week in Wola as they were the cheapest there. They hold them in the basement. Laboratory was localized in the kitchen.

8-year-old boy named Trzasczka bitten by a rabid dog was the first patient vaccinated by Bujwid (1).

A sum of 400 roubles gained from the Warsaw Society of Doctors and 1000 roubles from the Mianowski Fund began the starting point of the Department fund.

Thanks to the attention paid by the cousin of the Duke of Oldenburg to this unique institution, the town gave 2000 roubles of annual subvention for the operation of this Department. The works of the Department were also coordinated by Dr *Franciszek Grodecki* and Dr *Władysław Palmirski*. The latter became the head of the Department when Bujwid moved to Cracow in 1893. He fulfilled his duties with a huge commitment and devotion together with Dr *Zenon Karłowski*.

Bujwid Institute in Warsaw was operating at the territory of former Kingdom of Poland under the occupation of Russia and a substantial part of Russian partition.

In 1893, 1897 and 1914, Pasteur Institute was established in Cracow, Vilnius and Lvov, respectively.

Rdzeń królika zakażonego wirusem fixe na tym poziomie pasażu, utrzymywany w kolbie w temperaturze 23°C, bez dopływu światła, w obecności na dnie kolby wodorotlenku potasu, w tych warunkach stopniowo tracił swoją wirulencję.

Po 12-15 dniach wirus fixe nie zabijał królika po zakażeniu podoponowym ; po 6-12 dniach zabijał nie-stale, natomiast suszony w ten sposób tylko od 1 do 5 dni, nie tracił swojej domóżgowej wirulencji. Stało się to podstawą realizacji idei uzyskania szczepionki przeciw tej śmiertelnej chorobie.

Odkrawano 2,5 mm rdzenia, rozcierano NaCl fizjologiczną („mleczanka”) i 2 cm tej zawiesiny wstrzykiwano podskórnie człowiekowi w okolice pępka.

Leczono zakażonych ludzi przez 21 i więcej dni, używając coraz krócej suszonych rdzeni (2).

Opracowaniu tej procedury towarzyszył ogrom pracy i doświadczeń na zwierzętach przy niezwykłych i krytycznych opiniach światowej nauki (1).

Wiedza, talent, pracowitość, rzetelność, intuicja badawcza Bujwida zdobyła uznanie i trwała na całe życie, przyjaźń Pasteura (1), od którego na odjeźdźnym otrzymał 2 króliki zakażone wirusem fixe. Bujwid w dniu 29 czerwca 1886 roku, w dwupokojowym mieszkaniu z kuchnią, gdzie mieszkał w Warszawie przy ulicy Wilczej 6, zorganizował wraz z żoną i stworzył pierwszą w świecie filię Instytutu Pasteura. Króliki kupowali co tydzień na dalekiej Woli, bo tam były najtańsze, trzymali je w piwnicy, a w kuchni było urządzone laboratorium.

Pierwszym pacjentem zaszczepionym przez Bujwida był pokąsany przez wściegłego psa ośmioletni chłopiec o nazwisku Trzasczka (1).

Otrzymane z Warszawskiego Towarzystwa Lekarskiego 400 rubli oraz pożyczka 1000 rubli z kasy Mianowskiego stały się zaczątkiem funduszu Zakładu.

Dzięki zainteresowaniu cesarskiego kuzyna księcia Oldenburskiego tą niezwykłą placówką, miasto udzieliło 2000 rubli rocznej subwencji na prowadzenie Zakładu. W prowadzeniu Zakładu pomagali dr *Franciszek Grodecki* i dr *Władysław Palmirski*, który po przeprowadzce Bujwida do Krakowa w 1893 roku objął po Nim zakład i prowadził go z wielkim poświęceniem i oddaniem wraz z dr *Zenonem Karłowskim*.

Instytut Bujwida w Warszawie obejmował swoją działalnością teren dawnego Królestwa Kongresowego pod okupacją rosyjską i znaczną część zaboru rosyjskiego.

W 1893 roku Zakład Pasteurowski powstał w Krakowie, w 1897 - w Wilnie i w 1914 we Lwowie.

Zapoznana u Pasteura technika produkcji i stosowania Jego szczepionki w Zakładzie Warszawskim była wciąż modyfikowana (2).

Leczenie w Warszawie trwało 14-21-30 dni, zależnie od miejsca zranienia, szczepiono dwa razy dzien-

The Pasteur method of production and usage of his vaccine was constantly modified in the Warsaw Department (2).

Treatment in Warsaw lasted for 14-21-30 days dependent on the site of bite. Individuals were vaccinated twice a day with 2 cm dosage while in case of severe bites – a 4 cm dosage was used; 3 mm of medulla dried for 1 – 6 days was applied.

OPERATION OF PASTEUR DIVISION IN THE NIH IN 1919-1939

When the Polish State was formed, the Warsaw Pasteur Department was repossessed by the State. Since the 1st March 1919, it began to function as the National Pasteur Department and then as the Pasteur Division of the National Department of Epidemiology (since 1923 referred to as the National Institute of Hygiene).

From the moment the Pasteur Division was established, it was opened on a daily basis, including Sundays and holidays. It was located near the six other division in one building at Chocimska 24 in Warsaw (currently, buildings A and B).

Up to 1939, two periods may be distinguished in the operation of the Warsaw Division:

- * 1886-1927 – production, usage and modification of the vaccine formula by Pasteur;
- * 1928-1939 – production and usage of the vaccine phenolized by the Semple method (India).

Since 1922, the Warsaw Division started the production of the vaccine by Semple on an experimental scale.

Brain and medulla of the rabbit in agony were pounded in 1% phenol solution in the physiological NaCl solution as 8% suspension which was infiltrated through the gauze, heated for 24 hours in the incubator at 37-38°C and then diluted with physiological NaCl to 4% suspension. Dosage was determined at 2 cm and the course of vaccination was established for 20 days (3).

Due to the following advantages of carbolized vaccine, it was introduced into a common usage from 1928.

1. Greater safety in terms of the occurrence of vaccine-associated paralysis (1:18000 compared to 1:2000 in case of Pasteur vaccine).
2. Effectiveness comparable to 'live' vaccine.
3. Longer expiry date (4-5 months).
4. Technology of the product facilitated its standardization.
5. Injections of the spinal cord of the rabbit including live rabies virus became a part of the history of the science on rabies. Attenuated vaccines against rabies were no longer recommended for humans.
6. Last but not least, the greatest organizational achievement – the decentralization of vaccination through the distribution of vaccines by pharmacies (3).

nie po 2 cm na dawkę, a w ciężkich pokąsaniach – po 4 cm; stosowano 3 mm rdzenia suszonego od 1 do 6 dni .

DZIAŁALNOŚĆ ODDZIAŁU PASTEUROWSKIEGO W PZH W LATACH 1919-1939

Z chwilą powstania Państwa Polskiego warszawski Zakład Pasteurowski został przejęty przez państwo i już od 1 marca 1919 roku, zaczął funkcjonować: początkowo jako Państwowy Zakład Pasteurowski, a następnie jako Oddział Pasteurowski Państwowego Zakładu Epidemiologicznego (od 1923 r. Państwowego Zakładu Higieny).

Od chwili założenia Oddział Pasteurowski był czynny codziennie, nie wyłączając niedziel i świąt, mieszcząc się obok sześciu pozostałych oddziałów we wspólnym gmachu przy ulicy Chocimskiej 24 w Warszawie (obecnie budynki A i B).

Działalność Warszawskiego Oddziału do roku 1939 należy podzielić na dwa okresy:

- * lata 1886-1927 – czas produkcji, stosowania i modyfikacji receptury szczepionki wg Pasteura;
- * lata 1928-1939 – okres produkcji i stosowania szczepionki fenolizowanej wg metody Semple'a (Indie).

Produkcję szczepionki według Semple'a Warszawski Zakład rozpoczął na skalę doświadczalną od 1922 roku.

Mózg i rdzeń królika będącego w stanie agonii rozcierano w 1% roztworze fenolu w roztworze fizjologicznym NaCl, jako 8% zawiesinę, sączoną przez gazę, ogrzewaną 24 godziny w cieplarni w temperaturze 37-38°C, a następnie rozcieńczoną NaCl fizjologiczną do 4% zawiesiny. Dawkę ustalono na 2 cm i kurs szczepienia na 20 dni (3).

O wprowadzeniu od 1928 roku do powszechnego użycia szczepionki karbolizowanej zadecydowały następujące jej zalety:

1. Większe bezpieczeństwo pod względem występowania porażen poszczepiennych (1:18000 wobec 1:2000 szczepionki Pasteura).
2. Skuteczność porównywalną ze szczepionką „żywą”.
3. Dłuższy termin ważności (4-5 miesięcy).
4. Technologia produktu ułatwiała jego standaryzację
5. Do historii nauki o wścieklicznie odeszły iniekcje rdzenia kręgowego królika zawierającego żywy wirus wściekliczny. Szczepionki atenuowane przeciw wścieklicznie nigdy potem nie były zalecane dla ludzi.
6. Wreszcie największe osiągnięcie organizacyjne – możliwość decentralizacji szczepień poprzez prowadzenie szczepionki przez apteki (3).

Oprócz prac produkcyjnych Oddział Warszawski był skutecznym organizatorem szczepień i ich rejestra-

In addition to the production services, the Warsaw Division was also an effective organizer of vaccinations as well as their register. It constantly assessed the safety and effectiveness of the vaccine. It also evaluated the epidemiological and epizootic situation of rabies. It was also involved in the laboratory diagnostics of rabies, studies concerning immunity mechanisms and collaboration with the Veterinary Service on vaccinations in dogs.

Polish centre for the studies on rabies introduced to its practice the findings achieved worldwide (4-6).

When dr *Karłowski* retired, his assistant - dr *Wiera Głowacka* became the head of the Pasteur Division.

Following the Second World War, the Pasteur Division in the NIH was moved in 1951 to the Warsaw Manufactory of Sera and Vaccines as the production division.

The Department of Sera and Vaccines in the NIH as the national inspector of the quality of biological products was indicated to be involved in the rabies issues together with the Department of Epidemiology. They were said to recreate the surveillance of the rabies in the country which was destroyed by the war.

STUDIES ON RABIES IN THE NIH FOLLOWING 1952

The author of this article commenced the story with rabies during the training hold by dr *Wiera Głowacka*. I will remember her as a small, grey-haired woman with a minor Eastern lilt. She was a Russian who finished her studies in Saint Petersburg, married a Pole and then moved to Poland. Dr *Wiera Głowacka* devoted her professional life to the Pasteur idea. Initially, she worked as an assistant of dr *Karłowski*. Up to the retirement, she worked as the head of the Pasteur Division in the NIH and then in the Manufactory of Sera and Vaccines in Warsaw.

Her kindness when she introduced me into the secrets of this subject made me to think that I had a luck to meet a person who gave free production strains and shared the details of own experience with others.

In 1952-2016, the subject of rabies was present in the Department of Epidemiology. During that time, the following actions were undertaken:

1. Continuation of the pre-war epidemiological and epizootic analysis of rabies in the country. Implementation of epidemiological assessment of effectiveness and safety of vaccines and serum used.

In the second half of the 50s, the efforts were undertaken to develop and collect questionnaires from people vaccinated against rabies according to the recommendations of the WHO Expert Committee for rabies. These efforts were supported by the Anti-epidemic Department of the Ministry of Health

torem, prowadził nieprzerwanie ocenę bezpieczeństwa i skuteczności produkowanego preparatu, ocenę sytuacji epidemiologicznej i epizootologicznej wścieklizny, diagnostykę laboratoryjną wścieklizny, badania z zakresu mechanizmów odporności, współpracę ze Służbą Weterynaryjną nad planowanym szczepieniem psów.

Polskie centrum badań nad wścieklizną wprowadzało do swej praktyki uzyskiwane na świecie osiągnięcia z zakresu badań nad wścieklizną (4-6).

Po odejściu na emeryturę dr *Karłowski* kierownictwo Oddziału Pasteurowskiego przejęła jego asystentka dr *Wiera Głowacka*.

Po drugiej wojnie światowej Oddział Pasteurowski PZH w 1951 roku został przeniesiony do Warszawskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek jako oddział produkcyjny.

Zajmowanie się problematyką wścieklizny powierzone w PZH Zakładowi Badania Surowic i Szczepionek jako państwowemu kontrolerowi jakości produktów biologicznych oraz Zakładowi Epidemiologii, z zadaniem odtworzenia przerwanej przez wojnę nadzoru nad sytuacją epidemiologiczną wścieklizny w kraju.

PRACE W DZIEDZINIE BADAŃ NAD WŚCIEKLIZNĄ W PZH OD 1952 ROKU

Autorka tego artykułu swoje spotkanie ze wścieklizną rozpoczęła od szkolenia u pani dr *Wiery Głowackiej*. Została w mojej pamięci drobna, siwa kobieta z leciutkim wschodnim zaśpiewem, Rosjanka, która ukończyła studia w Petersburgu, wyszła za mąż za Polaka i przyjechała z nim do Polski. Dr *Wiera Głowacka* całe swoje zawodowe życie poświęciła idei pasteurowskiej. Pracowała początkowo jako asystentka dr *Karłowski*, później aż do emerytury jako kierownik Oddziału Pasteurowskiego w PZH, następnie w Wytwórni Surowic i Szczepionek w Warszawie.

Życzliwość, z jaką mnie wtajemniczała w tajniki tematu, zostawiła we mnie przekonanie, że miałam szczęście spotkać Osobę pokrewną Tym, którzy darowali bez pieniędzy szczepy produkcyjne i dzielili się hojnie szczegółami swoich doświadczeń.

W latach 1952-2016 w nieprzerwanej obecności tematyki wścieklizny w Zakładzie Epidemiologii PZH realizowano następujące zadania:

1. Kontynuacja przedwojennej analizy sytuacji epidemiologicznej i epizootologicznej wścieklizny w kraju i wdrożenie epidemiologicznej oceny skuteczności i bezpieczeństwa stosowanej szczepionki i surowicy odpornościowej

W drugiej połowie lat 50. podjęto starania o zredagowanie i zbieranie ankiet osób szczepionych przeciw wściekliznie według współczesnych wzorów podanych przez Komitet Ekspertów ŚOZ do spraw wścieklizny. Starania te uzyskały poparcie Departamentu Przeciwe-

and Social Welfare, Veterinary Department of the Ministry of Agriculture and all Provincial Sanitary and Epidemiological Stations. Currently, Veterinary Service sends the list of rabies outbreaks in animals on a regular basis. The questionnaires filled by the vaccinated people in these outbreaks allow for an epidemiological assessment of the risk posed by different animals to humans, correctness of their execution and their effectiveness and safety. This analysis which is improved from technical and organizational perspectives is carried out constantly up to the present time. Its findings are published in the Epidemiological Chronicle of the Epidemiological Review. Following the war, the first questionnaires were sent by dr *Helena Gawronowa* from the Provincial Sanitary and Epidemiological Station in Lublin as of 1961-1964 (7-12).

These data are used for the purpose of national and international information. They are also used as the training and discussion material for the meetings with the Provincial Sanitary and Epidemiological Stations and Veterinary Service.

For a number of years, a close collaboration with the WHO Expert Committee for rabies was maintained by participating in all meetings organized by this organization and exchanging the information. Now, this function is played by the ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control in Stockholm).

During 127 years (1886-2014) in which the occurrences of rabies in Polish territories were registered, a total of 142 421 sick animals were detected, included 43 943 wild animals and 105 bats. A total of 1 078 persons died due to rabies. As many as 386 356 individuals were vaccinated against rabies (8-9).

These data are incomplete as the times of partitions, wars and post-war times did not favour studies and registration. It should be presumed that these numbers are much higher. They are also lower because of the incompleteness of the reports submitted (3).

The last fatal human case due to rabies in Poland was reported in 2002.

The numbers of people vaccinated against rabies are still high or higher compared to pre-war and post-war epizootic. This is due to the fact that the outbreaks of rabies in wild animals are still present. There is also a fear for this fatal infection in people who directly or in the majority of cases indirectly were in contact with it (9-29).

In addition to the conduct of the epidemiological chronicle of rabies, the objectives of the surveillance of rabies in Poland are still to continue the genetic inspection of strains isolated from bats and carry out the trainings concerning the recommendations for vaccinations against rabies in humans in vaccination centres.

pidemicznego MZiOS, Departamentu Weterynarii Ministerstwa Rolnictwa i wszystkich Wojewódzkich Stacji Sanitarno-Epidemiologicznych. Obecnie Służba Weterynaryjna przesyła regularne wykazy ognisk zwierzęcych wścieklizny, zaś ankiety szczepionych ludzi z tych ognisk pozwalają na epidemiologiczną ocenę stopnia narażenia ludzi przez różne zwierzęta i prawidłowości wykonawstwa szczepień oraz ich skuteczności i bezpieczeństwa. Analiza ta doskonalona technicznie i organizacyjnie jest prowadzona nieprzerwanie do chwili obecnej, a jej wyniki są publikowane w Kronice Epidemiologicznej Przeglądu Epidemiologicznego. Pierwsze ankiety po wojnie przesyłała dr *Helena Gawronowa* z Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Lublinie za lata 1961-1964 (7-12).

Uzyskane dane służą wszystkim krajowym i międzynarodowym potrzebom informacyjnym oraz jako materiały szkoleniowe i dyskusyjne na spotkaniach z Wojewódzkimi Stacjami Sanitarno-Epidemiologicznymi i Służbą Weterynaryjną.

Przez wiele lat utrzymywano ścisłą łączność z Komitetem Ekspertów do spraw wścieklizny SOZ uczestnicząc we wszystkich organizowanych przez tę organizację Sympozjach i wymieniając informacje. Obecnie tę rolę spełnia ECDC (Europejskie Centrum Zapobiegania i Zwalczenia Chorób w Sztokholmie).

W podsumowaniu 127 lat rejestrowanej obecności wścieklizny na ziemiach polskich (1886-2014) zdiagnozowano 142 421 chorych zwierząt – w tym 43 943 zwierząt dzikich i 105 nietoperzy. Zmarło na wściekliznę 1 078 osób. Szczepiono przeciw wściekliznie 386 356 osób (8-9).

Dane te nie są pełne; czasy zaborów, wojen, czasy powojenne nie sprzyjały badaniom i rejestracji. Należy przypuszczać, że liczby te są znacznie wyższe, pomniejszone niekiedy również przez niekompletność przekazywanych sprawozdań (3).

Ostatni zgon na wściekliznę człowieka w Polsce zanotowano w 2002 roku. Liczby osób szczepionych przeciw wściekliznie są natomiast również wysokie lub wyższe jak w okresie przedwojennej i powojennej epizootii. Przyczyną tego są wciąż obecne na terenie kraju tłące się ogniska wścieklizny zwierząt dzikich i wciąż obecny lęk osób przed tym śmiertelnym zakażeniem, z którym bezpośrednio, a w większości pośrednio się zetknęły (9-29).

Nadal aktualnymi zadaniami nadzoru nad sytuacją epidemiologiczną wścieklizny w kraju, obok prowadzenia kroniki epidemiologicznej tej choroby, są: kontynuacja kontroli genetycznej szczepów izolowanych od nietoperzy oraz prowadzenie szkoleń w ośrodkach szczepień w zakresie wskazań do szczepień przeciw wściekliznie ludzi.

2. Introduction of modern virologic and serological diagnostic methods of rabies which replaced the drastic methods of examinations on animals (*in vivo*).

Introduction of *in vitro* diagnostic methods into the everyday practice raised huge technical and economic difficulties.

Replacement of examinations on animals by indirect and direct immunofluorescence methods as well as isolation of the virus in cell cultures was carried out in the cooperation and with the support of the large centres conducting studies on rabies in Moscow in the Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis (Prof. *M.A. Selimow*, Dr *T. Aksionowa*) and in the Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals in Tübingen (Germany, Prof. *L. Schneider*, Dr *J. Cox*). Standardized control conjugates and cell lines were achieved.

In the Department of Epidemiology of the NIH, indirect and direct immunofluorescence methods were introduced with the assistance of Prof. *Adam Nowostawski*.

Our laboratory cooperated on the field of rabies diagnostic methods with dr *Krzysztof Wojciechowski* from Warsaw Veterinary Diagnostic Division.

The introduction of indirect immunofluorescence method into the serological diagnostics of rabies allowed for a quick evaluation of antibodies in vaccinated individuals and then for the assessment of immunogenic properties of vaccines.

3. Possibility of infection with rabies virus through food-borne route.

In the environment of non-domestic animals and birds where the range of species infected with rabies virus is extending, the possibilities of acquiring the infection through the bite are negated by the lifestyle of the animal or its ecological status which distance it from the direct contact with domestic or wild predator. The attention of epizootic specialists is paid to rodents which are the possible 'recipients' of the virus through food-borne route. Having used the mouse model from the NIH breeding (the head – eng. *A. Frąckiewicz*), study was carried with the objective to verify:

- a) the possibility of alimentary infection
- b) the period of stay and potential excretion of the virus from alimentary tract
- c) viral entries in case of food-borne infection
- d) production of antibodies following the infection through this route

The basic methodological assumption of this study was to create the most natural conditions for the infection in animals by avoiding negative physical stimuli.

This experiment was carried out using three wild strains and strain fixe.

2. Wprowadzenie współczesnych metod diagnostyki wirusologicznej i serologicznej wścieklizny eliminujących drastyczne metody badań na zwierzętach (*in vivo*).

Wprowadzenie do codziennej praktyki diagnostycznych metod *in vitro* we wściekliznie napotkało na duże trudności techniczne i ekonomiczne.

Zastąpienie badań diagnostycznych na zwierzętach stosowaniem metody immunofluorescencji bezpośredniej i pośredniej oraz izolacji wirusa na hodowlach komórkowych przeprowadzono przy współpracy i pomocy dużych ośrodków badań nad wścieklizną w Moskwie w Instytucie Poliomyelitis i Wirusowych Zapaleń Mózgu (prof. *M.A. Selimow*, dr *T. Aksionowa*) i w Instytucie Wirusów Zwierzęcych w Tybindze (Niemcy) prof. *L. Schneider*, dr *J. Cox*) otrzymując wystandaryzowane kontrolne konjugaty i linie komórkowe.

W Zakładzie Epidemiologii PZH wdrożono do praktyki metodę bezpośredniej i pośredniej immunofluorescencji pod życzliwym okiem prof. *Adama Nowostawskiego*.

Współpracowaliśmy, wymieniając doświadczenia diagnostyczne z doc. *Krzysztofem Wojciechowskim* z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Warszawie.

Zastosowanie pośredniej immunofluorescencji do serologicznej diagnostyki wścieklizny umożliwiło szybką kontrolę poziomu przeciwciał u szczepionych osób, a w dalszej przyszłości – ocenę wartości immunogennych szczepionek.

3. Możliwość zakażenia wścieklizną na drodze pokarmowej.

W środowisku nieudomowionych zwierząt i ptaków wśród coraz bardziej rozszerzającego się wachlarza gatunków zakażonych wścieklizną w warunkach naturalnych, możliwości zakażenia się poprzez pokąsanie przeczy często tryb życia zwierzęcia lub jego usytuowanie ekologiczne, oddalające go od bezpośredniego kontaktu z domowym lub dzikim drapieżnikiem. Uwaga epizootologów skierowana jest w tym temacie na gryzonie, jako ewentualnych „biorców” wirusa na drodze pokarmowej, stanowiących ewentualny jego rezerwuar. Na modelu myszy z hodowli PZH (kierownik inż. *A. Frąckiewicz*) wykonano badanie, którego celem było sprawdzenie:

- a) możliwości zakażenia alimentarnego
- b) okresu przebywania i ewentualnego wydalania wirusa z przewodu pokarmowego
- c) drogi wnikania wirusa przy zakażeniu pokarmowym.
- d) powstawania przeciwciał po zakażeniu na tej drodze

Podstawowym założeniem metodycznym pracy było stworzenie możliwie najbardziej naturalnych warunków zakażenia zwierząt, unikając negatywnych bodźców fizycznych.

Doświadczenie wykonano z trzema szczepami ulicznymi i szczepem fixe.

Animals acquired the infection by the consumption of infected brain dependent on the virulent properties of the virus. Strain isolated from the raccoon dog with a titre i.c. 10^6 LD₅₀ infected 9 out of 50 mice; the remaining wild strains did not infect any of 50 mice.

Highly virulent control strain fixe killed more than a half of the animals.

Virus was present in the stomach of the rodent up to 4 hours from the moment of consumption. In case of more famished animals, a vestigial presence of the virus was detected in their large intestines up to 6 hours.

Animals which did not acquire the infection had neither neutralizing antibodies nor the virus in the central nervous system. They did not also show the immunity to the *challenge* dose.

The results of the comparative study concerning the susceptibility of rodents to the infection through different mucous membranes suggest that infection through alimentary tract is acquired by nasal route through nasopharynx or external contamination of nostrils (olfactory nerve).

Of the material presented, two phenomena may be of epizootic importance:

- * Wild virus strains of average cerebral virulence (10^3 - 10^4) result in low possibilities of infection in rodents following the contact with the virus by this route. Omnivores are not dangerous in this aspect.
- * The idea of oral infection of wild predators with high doses of attenuated rabies virus in tissue cultures was developed and used in the fight with rabies epizootic in Europe (18).

4. Assessment of biological and antigen properties of vaccines and vaccine strains of rabies virus in comparison to wild strains isolated from different population of animals in Poland.

Following the discovery of Pasteur, the adaptation of rabies virus to cell cultures was the next breakthrough in the studies on rabies.

The objective of the study was to determine biological features, neurovirulent and immunogenic properties of new strains.

For the purpose of comparative studies with virus fixe, the Department of Epidemiology of the NIH received two variants of Vnukovo 32 strain: Vnukovo 3 (10 passages in primary cells of the Syrian hamster kidneys at 37°C, then 30 passages at 32°C) and Vnukovo 4 (10 passages in primary cells of the hamster kidneys at 37°C, then 73 passages at 32°C). Strains were obtained from the Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis in Moscow from Prof. *M.A. Selimow* within the scientific cooperation with the NIH.

Vnukovo 3 was a production strain of the vaccine produced in this Institute for humans and animals.

Zwierzęta zjadając zakażony mózg chorowały niezależnie od cech wirulentnych szczepu:

Szczep izolowany od jenota o mianie i.c. 10^6 LD₅₀ zakażył 9 myszy na 50; pozostałe dwa szczepy uliczne nie zakażyły żadnej z 50-ciu użytych do doświadczenia myszy.

Kontrolny wysoce wirulentny szczep fixe zabił ponad połowę skarmionych nim zwierząt.

Żołądek gryzonia zawierał wirus do 4 godzin od momentu zjedzenia. U zwierząt bardziej wygłodzonych znajdowano śladową obecność wirusa w jelicie grubym do 6-ciu godzin.

Zwierzęta, które nie zachorowały po skarmieniu, nie miały przeciwciał neutralizujących ani obecności wirusa w o.u.n.; nie wykazywały też odporności na dawkę *challenge*.

Wyniki porównawczego badania wrażliwości gryzoni na zakażenie poprzez różne błony śluzowe pozwalają sądzić, że do zakażenia na drodze pokarmowej dochodzi na drodze donosowej, poprzez nosogardziel lub zewnętrzne zanieczyszczenie nozdrzy (nerw węchowy).

Z przedstawionych materiałów dwa zjawiska mogą mieć znaczenie epizootologiczne:

- * Szczepy wirusa ulicznego o przeciętnej wirulencji domóżgowej (10^3 - 10^4) dają małe możliwości zachorowania gryzoni po zetknięciu się z wirusem na tej drodze zakażenia i że zwierzęta pantofagi nie są w tym aspekcie groźne.
- * Idea doustnego zakażenia dzikich drapieżników wysokimi dawkami atenuowanego na hodowli tkankowej wirusa wścieklizny została szeroko rozwinięta i zastosowana w walce z epizootią wścieklizny w Europie (18).

4. Ocena biologicznych i antygenowych właściwości szczepionek i szczepów szczepionkowych wirusa wścieklizny wobec ulicznych szczepów izolowanych w różnorodnych populacjach zwierzęcych w Polsce.

Adaptacja wirusa wścieklizny do hodowli komórkowych była następnym po odkryciu Pasteura przełomem w badaniach nad wścieklizną. Tematem podjętej pracy było określenie cech biologicznych, właściwości neurowirulentnych i immunogennych nowych szczepów.

Zakład Epidemiologii PZH otrzymał do badań porównawczych ze szczepem wirusa fixe dwa warianty szczepu Wnukowo 32: Wnukowo 3 (10 pasaży przez pierwotne komórki i nerki chomika syryjskiego w 37°C, następnie 30 pasaży w temperaturze 32°C) i Wnukowo 4 (10 pasaży przez pierwotne komórki nerki chomika w 37°C, a następnie 73 pasaży w temperaturze 32°C). Szczepy otrzymano z Instytutu Poliomyelitis i Wirusowych Zapaleń Mózgu w Moskwie od prof. *M.A. Selimowa* w ramach współpracy naukowej z PZH.

There is a lack of markers which will be the stable measure of the attenuation of rabies virus. The most characteristic feature is its pathologic potential for the central nervous system.

The plan of own studies included:

- a) Assessment of affinity of strains to the central nervous system by the route of infection and the type of used animals.
- b) Assessment of intensity of centrifugal transmission of viruses by the route of infection and the level of brain infection titre.
- c) Determination of structure, topography and intensity of inflammatory lesions in brain.

This study was carried out in the cooperation with Prof. *Irminą Zelman* from the Medical Research Centre of the Polish Academy of Sciences in Warsaw.

The Syrian hamster is the most susceptible animal model to the infection with rabies virus. Non-pathogenicity of parenteral infection of the hamster may be a marker of the stability of attenuation level. Both attenuated strains maintained their neurovirulence in case of cerebral infection of animals, excluding rabbits which are non-susceptible to Vnukovo 4 strain. Following intraperitoneal infection, Vnukovo 3 was partially pathogenic for hamsters and mice while Vnukovo 4 was sporadically pathogenic only for hamsters. Following intracerebral and intraperitoneal infection, Vnukovo 3 was sporadically detected in internal organs while it did not occur in case of Vnukovo 4.

Control strain of virus fixe showed intense peripheral diffusion and diffusion in lungs in sick animals.

Following intracerebral infection, the model of structural changes in the central nervous system was the same for virus fixe and strains attenuated in cell cultures with the smaller changes for the latter (to a larger extent, the damage of vessels and secondary vascular damage of tissue).

Vnukovo 3 strain protected the hamster from the *challenge* dose of the wild virus isolated from sick marten. Animals survived for 3 months. The presence of antibodies was detected while there was no virus in them.

The diversity of animal hosts of infection resulted in the need to verify the statement that wild and fixed rabies virus is an antigen monolith.

The Department of Epidemiology of the NIH in collaboration with the Pasteur Institute in Paris (Prof. *Pierre Sureau*, Dr *Monique Lafon*) undertook studies concerning antigen features of the vaccine against rabies compared to wild strains isolated from different animals: fox, racoon dog, badger, marten, hedgehog, bat, rat, dog, cat, squirrel.

Szczep Wnukowo 3 był szczepem produkcyjnym szczepionki produkowanej w tym Instytucie dla ludzi i zwierząt.

Brakuje markerów, które byłyby „stałą miarą” atenuacji wirusa wścieklizny; cechą najbardziej charakterystyczną jest patologia dla o.u.n.

Plan badań własnych przewidywał:

- a) Ocenę powinowactwa badanych szczepów do o.u.n., zależnie od drogi zakażenia i rodzaju użytych zwierząt.
- b) Ocenę intensywności odśrodkowego rozprzestrzeniania się badanych wirusów zależnie od drogi zakażenia i stopnia namnożenia w mózgu.
- c) Określenie struktury, topografii i nasilenia zmian zapalnych w mózgu.

Badanie wykonano przy współpracy z prof. *Irminą Zelman* z Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie.

Najbardziej wrażliwym modelem zwierzęcym na zakażenie wścieklizną jest chomik syryjski. Niepatogenność parenteralnego zakażenia chomika może być markerem stabilności stopnia atenuacji. Oba atenuowane szczepy zachowały neurowirulencje przy domózgowym zakażeniu zwierząt, oprócz królików, niewrażliwych na szczep Wnukowo 4. Po zakażeniu i.p Wnukowo 3 był częściowo patogenny dla chomików i myszy, zaś Wnukowo 4 sporadycznie tylko dla chomików. Szczep Wnukowo 3, po zakażeniu i.c. (domózgowo) i i.p. (Obwodowo) wykrywany był w narządach wewnętrznych sporadycznie, natomiast Wnukowo 4 – wcale.

Kontrolny szczep wirusa fixe u zwierząt chorych wykazywał intensywne rozsianie peryferyjne i rozsianie w płucach.

Wzorzec zmian strukturalnych w o.u.n. po zakażeniu i.c. był wspólny dla wirusa fixe i szczepów atenuowanych na hodowli komórkowej, przy mniejszych zmianach dla tych drugich (w większym stopniu uszkodzenie naczyń i wtórnych naczyń pochodnych uszkodzeń tkanki).

Szczep Wnukowo 3 chronił chomiki przed dawką *challenge* ulicznego wirusa izolowanego z chorej kuny. Zwierzęta przeżyły 3 miesiące, wykazały obecność przeciwciał, były ujemne wirusologicznie.

Różnorodność zwierzęcych gospodarzy zakażeniu nasunęła konieczność weryfikacji twierdzenia, że wirus wścieklizny uliczny i ustalony stanowi monolit antygenowy.

Zakład Epidemiologii PZH przy współpracy z Instytutem Pasteura w Paryżu (prof. *Pierre Sureau*, dr *Monique Lafon*) podjęli szerokie badania wartości antygenowej szczepionki przeciw wściekliznie wobec szczepów ulicznych izolowanych od różnych zwierząt: lis, jenot, borsuk, kuna, jeż, nietoperz, szczur, pies, kot, wiewiórka.

The following methods were adopted:

- a) Identification of strains using the method of monoclonal antibodies which was developed and standardized in the WHO reference centres in the Pasteur Institute in Paris, the Wistar Institute in Philadelphia (Dr *Tadeusz Wiktor*) and the Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals in Tübingen.
- b) Protective test with the use of the *challenge* dose of wild strains.
- c) Neutralization test of wild strains using the serum of human vaccinated with a concentrated cellular vaccine.

Wild strains were obtained from the Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals in Tübingen, Veterinary Institute in Puławy, Departments of Veterinary Hygiene in Gdańsk, Cracow and Olsztyn. Attenuated fixed strains were received from the Pasteur Institute in Paris (PM297/BHK), Veterinary Institute in Puławy (SADB19) – (from Prof. *Jan Żmudziński*) and the Department of Sera and Vaccines of the NIH (CVSJP10 8pas) (Prof. *Danuta Rymkiewicz*, Dr *Teresa Wysokińska*).

Human immunity sera against rabies were obtained from individuals vaccinated with a concentrated cellular vaccine (PM strain) produced by the Pasteur-Merieux Institute in Lyon.

Antigen characteristics of wild strains identified by monoclonal antibodies showed the presence of different serotypes of virus belonging to the group EBL1 (*European Bat Lyssa*) in Poland. This serotype circulates in the population of bats named *Eptesicus Serotinus* (serotine bat). The remaining strains belong to the serotype 1. All vaccine strains belong to this serotype. From the results of our studies transpires that immunogenic vaccine including the strain of serotype 1 protects the exposed individuals from the virus EBL 1.

Antigen affinity between serotypes 1 and 4 (currently 5) is sufficient in this aspect.

Having prepared for the change of vaccine against rabies to be used in humans, the study was undertaken together with dr *Teresa Wysokińska* with the objective to assess the immunogenic potential of all types of vaccines available that time on the national market:

- a) lyophilized vaccine (1.5% suspension of suckling mouse brain produced by the Pasteur Institute in Paris)
- b) non-concentrated vaccine prepared in primary cells of hamster kidney produced by the Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis in Moscow
- c) concentrated with ultrafiltration vaccine produced by the Pasteur-Merieux Institute prepared in diploid cells
- d) concentrated with ultracentrifugation diploid vaccine produced by Behringwerke

Zastosowano następujące metody:

- a) Identyfikacja szczepów metodą przeciwciał monoklonalnych, opracowana i wystandaryzowana w ośrodkach referencyjnych ŚOZ w Instytucie Pasteura w Paryżu, w Instytucie Wistar w Filadelfii (dr *Tadeusz Wiktor*) i Instytucie Wirusów Zwierzęcych w Tybindze
- b) Test ochronny z użyciem do dawki *Challenge* badanych szczepów ulicznych
- c) Test neutralizacji badanych szczepów przez surowicę człowieka szczepionego koncentrowaną szczepionką komórkową.

Szczepy uliczne otrzymano do badań z Instytutu Wirusów Zwierzęcych w Tybindze, Instytutu Weterynarii w Puławach, Zakładów Higieny Weterynaryjnej w Gdańsku, Krakowie i Olsztynie. Szczepy ustalone atenuowane otrzymano z Instytutu Pasteura w Paryżu (PM297/BHK), Instytutu Weterynarii w Puławach (SADB19) – (od prof. *Jana Żmudzińskiego*) oraz w Zakładzie Badania Surowic i Szczepionek PZH (CVSJP10 8pas) (prof. *Danuta Rymkiewicz* dr *Teresa Wysokińska*).

Ludzkie surowice odpornościowe przeciw wścieklicznie otrzymano od osób szczepionych koncentrowaną szczepionką komórkową (szczep PM) produkcji Instytutu Pasteur-Merieux w Lionie.

Charakterystyka antygenowa ulicznych szczepów rozpoznanych przez przeciwciała monoklonalne wykazała obecność na terenie Polski odmiennego serotypu wirusa z grupy EBL1 (*European Bat Lyssa*) krążącego w populacji nietoperzy *Eptesicus Serotinus* (Mroczek późny). Pozostałe szczepy należą do serotypu 1, do którego należą również wszystkie szczepy szczepionkowe. Jak pokazały wyniki naszych badań immunogenna szczepionka zawierająca szczep serotypu 1 chroni ludzi narażonych przez wirus EBL 1.

Pokrewieństwo antygenowe pomiędzy serotypem 1 i 4 (obecnie 5) jest w tym aspekcie wystarczające.

Przygotowując się do zmiany szczepionki przeciw wścieklicznie, do stosowania dla ludzi w Polsce podjęto pracę (wraz z dr *Teresą Wysokińską*), której celem była ocena mocy immunogennej wszystkich obecnych wtedy na rynku krajowym typów szczepionek:

- a) liofilizowana (1.5% zawiesina mózgow osesków mysich produkcji Instytutu Pasteura w Paryżu.
- b) niezagęszczona, szczepionka przygotowana na pierwotnej hodowli komórek nerki chomika, Instytutu Poliomyelitis i Wirusowych Zapaleń Mózgu w Moskwie.
- c) zagęszczona ultrasączeniem szczepionka produkcji Instytutu Pasteur-Merieux przygotowana na komórkach diploidalnych
- d) zagęszczona ultrawirowaniem szczepionka diploidalna produkcji Behringwerke

- e) duck vaccine produced by Elli Lilly co. USA
- f) national lyophilized 5% suspension of rabbit brains produced by the Warsaw Manufactory of Sera and Vaccines.

Antigen properties of concentrated vaccines measured according to the guidelines of the WHO Expert Committee for rabies in tests of active protection (shortened and complete versions) in the antibody-binding-test proved to be significantly higher compared to other vaccines.

The Department of the Epidemiology of the NIH developed brochures for particular vaccines as well as the recommendations for vaccination (20-21).

5. Introduction of vaccine free from neural tissue for the vaccinations in humans in Poland.

At the end of the 70s, developed countries moved to the production and routine use of vaccines free from neural tissue which were prepared in cell cultures. In Poland, this decision was delayed due to the unwillingness to resign from the national production of vaccine and lack of funds. Small sets of cheaper, safer vaccines prepared from 1.5% suspension of mouse brains and duck embryo were imported.

It was just the increase in neurological vaccine-associated complications in 1984 following the modification of national cerebral vaccine which resulted in an immediate withdrawal of all types of cerebral vaccines against rabies used for humans in Poland.

The demand for vaccine against rabies for humans in Poland accompanied by the lack of modern production infrastructure for other viral vaccines resulted in a situation that the production of vaccine in Poland would be unprofitable.

Taking into account import, we were to choose between the vaccine produced by the Institute of Poliomyelitis in Moscow, which was prepared in primary cell culture of the Syrian hamster kidney, used in several everyday injection and the concentrated vaccine produced in cell lines (diploids, Vero) by the Pasteur-Merieux Institute in Lyon used in a shortened vaccination schedule (5 doses). Both vaccines were safe and effective. The problem of the selection of the vaccine was discussed with the Moscow and Lyon Institutes.

The decision was made together with the Department of Sera and Vaccines of the NIH (prof. *D. Rymkiewicz*, Dr *T. Wysokińska*, Doc. *B. Bucholc*).

The concentrated vaccine was chosen due to its convenient vaccination schedule and very good results of its immunogenic potential. The concentrated vaccine was accepted by doctors and patients. It is used up to the present time together with the human specific immunoglobulin produced by the Pasteur-Merieux Institute.

- e) szczepionka kacza produkcji Elli Lilly co.USA
- f) krajowa liofilizowana 5% zawiesina mózgow króliczych produkcji Warszawskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek.

Wartości antygenowe szczepionek zagęszczonych, mierzone według zaleceń Komitetu Ekspertów Ś.O.Z do spraw wścieklizny w testach ochrony czynnej (skrótowym i pełnym) w teście wiązania przeciwciał okazały się istotnie wyższe od pozostałych preparatów.

Zakład Epidemiologii PZH opracował ulotki do poszczególnych szczepionek, jak również wskazania do szczepień (20-21).

5. Wprowadzenie do szczepienia ludzi przeciw wściekliznie szczepionki wolnej od tkanki nerwowej.

W końcu lat siedemdziesiątych kraje rozwinięte przechodziły na produkcję i rutynowe stosowanie szczepionek wolnych od tkanki mózgowej, przygotowanych na hodowlach komórkowych. W Polsce decyzja była opóźniana ze względu na niechęć do rezygnacji z krajowej produkcji szczepionki oraz brak pieniędzy. Sprowadzano małe partie tańszych, bardziej bezpiecznych szczepionek z 1.5% mózgow osesków mysich i zarodków kaczych.

Dopiero wzrost neurologicznych powikłań poszczepiennych w 1984 roku po modyfikacji krajowej szczepionki mózgowej zdecydował o natychmiastowym wycofaniu wszelkiego typu szczepionek mózgowych przeciw wściekliznie stosowanych w Polsce dla ludzi.

Skala polskiego zapotrzebowania na szczepionkę przeciw wściekliznie dla ludzi, przy braku współczesnego zaplecza produkcyjnego dla innych szczepionek wirusowych, byłaby w Polsce produkcyjnie nieopłacalna.

Podejmując import, do wyboru mieliśmy szczepionkę produkcji Instytutu Poliomyelitis w Moskwie, przygotowaną na pierwotnej hodowli komórek nerki chomika syryjskiego, stosowaną w kilkunastu codziennych iniekcjach, oraz szczepionkę koncentrowaną, produkowaną na liniach komórkowych (diploidy, Vero) produkcji Instytutu Pasteur-Merieux w Lionie, stosowaną w skróconym schemacie szczepienia (5 dawek). Obie szczepionki były bezpieczne i skuteczne. Problem doboru szczepionki konsultowany był bezpośrednio z Instytutem Moskiewskim i Liońskim.

O wyborze preparatu zdecydowaliśmy wspólnie z Zakładem Badania Surowic i Szczepionek PZH (prof. *D. Rymkiewicz*, dr *T. Wysokińska*, doc. *B. Bucholc*)

Wybrano szczepionkę koncentrowaną ze względu na dogodny schemat szczepienia i bardzo dobre wyniki kontroli jej mocy immunogennej. Szczepionka koncentrowana zyskała w Polsce pełną akceptację lekarzy i pacjentów i jest stosowana do chwili obecnej wraz z ludzką swoistą immunoglobuliną odpornościową produkcji Instytutu Pasteur-Merieux.

6. Epidemiological safety of oral vaccines in wild animals.

Rabies in animals and humans was one of the most dramatic health problems in the regenerated Polish State. Up to the half of the 20th century, the epizootic was expanded in the population of dogs. The breakthrough was observed at the beginning of the 50s. when the difficult decision in the post-war reality was made to introduce massive vaccinations in dogs. Infections in dogs decreased up to sporadic cases in particular provinces.

During the Second World War, there was an uncontrolled relocation of humans and animals. Rabies was present in forests deprived of foresters and hunters. Epizootic of rabies in foxes occurred in the western part of Poland, then in the German territories, in the times of war and it gradually extended for the whole country, affecting new species of wild and domestic animals, and, thus posing a threat to humans.

At the beginning of the 90s. of the previous century, veterinary and anti-epidemic departments faced the necessity to stop the extending wild rabies epizooty, which amounted to the epizootic in dogs in pre-war times. There was a necessity for taking the responsibility for the safety of humans and animals. A total of 2000 litres of attenuated live rabies viruses at 1.8 ml doses was distributed from airplanes in an attractive form for predators.

This problem was dissolved by the Veterinary Service in Puławy (Prof. *Jan Żmudziński*) and the Veterinary Department of the Ministry of Agriculture (Prof. *Józef Maleszewski*) in collaboration with all Departments of Veterinary Hygiene, Department of Epidemiology of the NIH and Provincial Sanitary and Epidemiological Stations.

SADB19 strain was selected for the purpose of oral immunization of wild animals. This strain is attenuated in the passages in BHK cell lines. It maintains pathogenicity if administered intracerebrally. It is not pathogenic for foxes if infected parenterally or orally.

SADB19 strain was used in the Department of Epidemiology of the NIH to assess its antigen compatibility compared to the vaccine applied in humans.

SADB19 strain was subject to wide, international evaluation of its immunogenic properties and safety in laboratory tests and field studies.

In 1978, it was used in massive vaccination of foxes in the western part of Europe (22-25).

7. Introduction of molecular biology methods into the diagnostics of rabies, characterization of epizootic, control over the genetic stability of vaccine strains and genotypes and variants of wild viruses circulating in the environment.

A young colleague, biologist dr *Małgorzata Sadkowska-Todys* introduced the molecular biology into the epidemiological studies on rabies in the Department of Epidemiology of the NIH. In the collaboration with

6. Bezpieczeństwo epidemiologiczne doustnych szczepień zwierząt dzikich.

Wścieklizna zwierząt i ludzi była jednym z najbardziej dramatycznych problemów zdrowotnych w odrodzonym państwie polskim. Do połowy XX wieku szerzyła się epizootia wśród psów. Przełom nastąpił na początku lat 50. po podjęciu jakże trudnej w powojennej rzeczywistości decyzji wprowadzenia masowych zapobiegawczych szczepień psów.

Zachorowania psów spadły do sporadycznych przypadków w skali poszczególnych województw.

W okresie II wojny światowej wystąpiło niekontrolowane przemieszczanie się ludzi i zwierząt. Do lasów pozbawionych leśniczych i myśliwych przeniknęła wścieklizna.

Epizootia wścieklizny lisów wybuchła na zachodzie Polski, na ówczesnych jeszcze terenach niemieckich już w okresie trwania działań wojennych i stopniowo rozszerzała się na cały kraj obejmując coraz nowe gatunki zwierząt dzikich i domowych, zagrażając ludziom.

Na początku lat 90. ubiegłego stulecia resorty weterynaryjne i przeciwepidemiczne stanęły wobec konieczności zapobieżenia gwałtownie narastającej epizootii zwierząt dzikich, sięgającej liczbowo epizootii psów w latach przedwojennych. Należało podjąć odpowiedzialność za bezpieczeństwo ludzi i zwierząt przy rozłożeniu z samolotów jednorazowo w sumie 2000 litrów atenuowanego żywego wirusa wścieklizny zamkniętego w dawce 1.8 ml w atrakcyjnej dla leśnych drapieżników przynęcie. Problem ten rozwiązywał Instytut Weterynarii w Puławach (prof. *Jan Żmudziński*) i Departament Weterynarii Ministerstwa Rolnictwa (prof. *Józef Maleszewski*) przy współpracy wszystkich Zakładów Higieny Weterynaryjnej, Zakładu Epidemiologii PZH i Wojewódzkich Stacji Sanitarnej-Epidemiologicznych.

Do uodparniania doustnego zwierząt dzikich wybrano szczep SADB19, atenuowany poprzez pasaż na linii komórkowej BHK zachowujący patogenność i.c., niepatogenny dla lisów przy zakażeniu parenteralnym i doustnym.

W Zakładzie Epidemiologii PZH szczep SADB19 służył ocenie jego zgodności antygenowej wobec szczepionki dla ludzi.

Szczep SADB19 był poddany szerokiej międzynarodowej kontroli jego właściwości immunogennych i bezpieczeństwa w testach laboratoryjnych, jak i badaniach terenowych..

W 1978 roku wprowadzono go do masowych szczepień lisów na zachodzie Europy (22-25).

7. Wprowadzenie metod biologii molekularnej do diagnostyki wścieklizny, charakterystyki procesu epizootii, kontroli stabilności genetycznej szczepów szczepionkowych oraz genotypów i wariantów krążących w przyrodzie wirusów ulicznych.

Biologię molekularną do badań epidemiologicznych wścieklizny wprowadziła i rozwinęła w Zakładzie Epidemiologii PZH młoda koleżanka, biolog, dr *Małgorzata Sadkowska-Todys*.

the Pasteur Institute in Paris (Dr *Herve Bourhy*) and the Department of Virology of the Veterinary Institute in Puławy (Dr *Marcin Smreczak*, Prof. *Jan Żmudziński*), she standardized and implemented rapid methods of molecular biology in the diagnostics of control over genetic stability of viruses and the characterization of features of the epizootic of rabies in Poland.

So far, 3 genotypes of *Lyssa virus* were identified in Europe:

- genotype 1 – strains isolated from terrestrial animals and all vaccine strains
- genotype 5 (EBL1) – the bat named *Eptesicus serotinus* is the reservoir (serotine bat)
- genotype 6 (EBL2) – the bats named *Myotis daubentonii* and *Myotis dasycneme* are the reservoirs

Dr *M. Sadkowska-Todys* confirmed the presence of the genotype 1 in Poland (four variants) and genotype 5; viruses isolated from serotine bat.

The method of collection of the material from bats was developed (blood and oral smear) with no harm for the animal. It provides a wide range of possibilities of their examinations. It is of importance as since the 70s they are a new reservoir of rabies virus in Poland.

Out of 9 strains collected from bats and examined in the Department of Epidemiology (EBLV1), 8 belonged to the EBLV1a while the remaining one to the EBLV1b. A total of 212 samples were collected from 122 bats.

An attention should be paid to the following finding – only 74% affinity of the amino acid sequence of the nucleoprotein gene was determined between the control strain fixe (CVS), genotype 1 and the strains of genotype 5 in Poland. It suggests a necessity to control the strains isolated from new animal sources of infection in terms of their affinity with the current vaccine strain with regard to massive vaccinations in wild animals (26-29).

It should be highlighted that Prof. *Jan Karol Kostrzewski*, the head of the Department of Epidemiology, initiated the idea to introduce the subject of rabies into the scope of activities of his Department. Professor did not take part in our studies, however, he trusted in our opinions and findings. The Department of Epidemiology of the NIH cooperated closely with the Department of Epizootic of the Veterinary Division of the Warsaw University of Life Sciences in Warsaw, with Prof. *Abdon Stryszak* which enhanced the work on zoonoses.

Persons involved in the works on rabies in the Department of the Epidemiology of the NIH:

Dr *A. Baumann*, M.A. *M. P. Czarkowski*, Vet. *M. Czerwiński*, M.A. *A. Jackowska*, Dr *S. Karpiński*, Dr *H. Kicińska*, Vet. *A. Koncki*, tech. assistant *B. Kręska*, tech. assistant *B. Kucharczyk*, tech. assistant *E. Łabuńska*, lab. assistant *W. Prokopczuk*, M.A. *A. Reizer*, Dr *M. Sadkowska Todys*, Hab. Dr *D. Seroka*, Vet. *L. Szkuclarek*, lab. assistant *J. Witecka*.

Przy współpracy z Instytutem Pasteura w Paryżu (dr *Herve Bourhy*) i z Zakładem Wirusologii Instytutu Weterynarii w Puławach (dr *Marcin Smreczak*, prof. *Jan Żmudziński*) wystandaryzowała i wprowadziła szybkie metody biologii molekularnej do diagnostyki kontroli stabilności genetycznej wirusów i opisu cech toczącego się procesu epizootycznego wścieklizny w Polsce.

W Europie dotychczas stwierdzono obecność 3 genotypów rodzaju *Lyssa virus*:

- genotyp 1 – szczepy izolowane od zwierząt naziemnych oraz wszystkie szczepy szczepionkowe
- genotyp 5 (EBL1) – rezerwuarem jest nietoperz *Eptesicus serotinus* (Mroczek Późny)
- genotyp 6 (EBL2) – rezerwuarem jest nietoperz *Myotis daubentonii* i *Myotis dasycneme*

Dr *M. Sadkowska-Todys* stwierdziła występowanie w Polsce genotypu 1 (w czterech wariantach) oraz genotypu 5; wirusów izolowanych od Mroczka późnego.

Opracowano metodę przyżyciowego pobierania materiału od nietoperzy (krew i wymaz z jamy gębowej) bez szkody dla życia zwierzęcia. Otwiera to szerokie możliwości ich badań, co jest ważne, gdyż od lat 70. tworzą nowy rezerwuuar wirusa wścieklizny w Polsce.

Badane w Zakładzie Epidemiologii PZH szczepy od 9-ciu nietoperzy (EBLV1), w ośmiu przypadkach należały EBLV1a. zaś w jednym do EBLV1b. Ogółem do badań pobrano 212 próbek od 122 nietoperzy.

Na uwagę zasługuje wynik – stwierdzono tylko 74% podobieństwo sekwencji aminokwasowej odcinka genu nukleoproteiny pomiędzy kontrolnym szczepem fixe (CVS)) genotyp 1 a szczepami genotypu 5 w Polsce. Wskazuje to na potrzebę kontroli szczepów izolowanych od nowych zwierzęcych źródeł zakażenia pod względem ich pokrewieństwa z aktualnym szczepem szczepionkowym wobec masowych szczepień zwierząt dzikich (26-29).

Na zakończenie należy zaznaczyć, że inicjatorem włączenia tematów wścieklizny do tematyki Zakładu Epidemiologii PZH był jego kierownik prof. *Jan Karol Kostrzewski*. Profesor nie brał bezpośredniego udziału w naszych pracach, ale miał zaufanie do naszych opinii i wniosków. Zakład Epidemiologii PZH utrzymywał żywe kontakty naukowe z Zakładem Epizootologii Wydziału Weterynarii SGGW w Warszawie, z prof. *Abdonem Stryzakiem*, co wzbogacało prace nad zoonozami

Osoby biorące udział w pracach nad wścieklizną w Zakładzie Epidemiologii PZH:

dr *A. Baumann*, mgr *M. P. Czarkowski*, lek. wet. *M. Czerwiński*, mgr *A. Jackowska*, dr *S. Karpiński*, dr *H. Kicińska*, lek. wet. *A. Koncki*, asyst. techn. *B. Kręska*, asyst. techn. *B. Kucharczyk*, asyst. techn. *E. Łabuńska*, pomoc lab. *W. Prokopczuk*, mgr *A. Reizer*, dr *M. Sadkowska Todys*, dr hab. *D. Seroka*, lek. wet. *L. Szkuclarek*, pomoc lab. *J. Witecka*.

REFERENCES

1. Odo Bujwid. Osamotnienie. Wyd. Literackie, Kraków 1990.
2. Palmirski W, Karłowski Z. Wodowstręt u ludzi oraz szczepienia zapobiegawcze według metody Pasteura. Warszawa: Księgarnia E. Wendego i S-ki 1911.
3. Chodźko W. Wścieklizna (wodowstręt) w Polsce. *Lekarz Polski* 1937;13:No.5-6.
4. Głowacka W. Działalność Oddziału Pasteurowskiego PZH. Okres 1925-1939. *Zdrowie publiczne* 1939;54:674-683.
5. Głowacka W, Łabędź M. Długotrwałość odporności u psów szczepionych zapobiegawczo przeciw wścieklicznie. *Med Dośw Społ* 1938;23:165-68.
6. Głowacka W, Sobolewska S. Mianowanie szczepionki przeciw wścieklicznie metodą Webstera-Habela. *Med Dośw Mikrobiol* 1950;2(2):304-305.
7. Głowacka W. O szczepieniach przeciw wścieklicznie 1949-1950. *Pol Tyg Lek* 1950;5(37/38):1345-1349.
8. Seroka D. Wścieklizna na ziemiach polskich w XX wieku. In: *Choroby zakaźne i ich zwalczanie na ziemiach polskich w XX wieku*. Ed. Kostrzewski J, Magdżik W, Naruszewicz-Lesiuk D. Warszawa: PZWL, 2001:408-412.
9. Kronika epidemiologiczna z lat 2000-2014. In: *Przegląd Epidemiologiczny z tych lat*.
10. Seroka D. Zasady epidemiologicznej oceny skuteczności szczepień ludzi przeciw wścieklicznie. *Przegl Epidemiol* 1982;36(1-2):1-6.
11. Seroka D. Czynniki warunkujące podejmowanie decyzji o szczepieniu człowieka przeciw wścieklicznie. *Przegl Epidemiol* 1986;40(3):263-269.
12. Seroka D. Czynniki kształtujące stan zagrożenia ludzi i zwierząt wścieklizną w Polsce. *Przegl Epidemiol* 1993;47(3):209-215.
13. Seroka D, Krawczyński K, Brzosko W. Zastosowanie immunofluorescencji do wykrywania ulicznego wirusa wścieklizny w ośrodkowym układzie nerwowym myszy w okresie inkubacji choroby. *Med Dośw Mikrobiol* 1967;19(2): 189-199. *Exp Med Microbiol* 1967; 19(2): 204-216.
14. Krawczyński K, Seroka D, Nowosławski A. Zastosowanie immunofluorescencji do serologicznej diagnostyki wścieklizny u myszy w okresie inkubacji choroby. *Med. Dośw Mikrobiol* 1967;19(2): 201-206. *Exp Med Microbiol* 1967;19(2): 217-223.
15. Seroka D, Łabuńska E. Seroneutralizacja wirusa wścieklizny *in vitro* w próbkach Leightona odczytywana metodą zahamowania fluorescencji. *Med Dośw Mikrobiol* 1981;33: 67-72.
16. Seroka D, Szkudlarek L, Łabuńska E, Jackowska A. Ocena przydatności metody pośredniej immunofluorescencji (IF) do serologicznej diagnostyki wścieklizny. *Med. Dośw Mikrobiol* 1986;38:176-181.
17. Seroka D, Koncki A, Łabuńska E. Izolacja i namnażanie wirusa wścieklizny na liniach komórkowych w warunkach rutynowej diagnostyki wścieklizny. *Med. Dośw Mikrobiol* 1994;46: 215-223.
18. Serokowa D. Badania na możliwość alimenternego zakażenia wirusem wścieklizny na modelu myszy. Rozprawa doktorska Warszawa: PZH 1967.
19. Serokowa D. Współczesne kryteria biologicznej oceny szczepów szczepionkowych wirusa wścieklizny. Rozprawa habilitacyjna. Warszawa: PZH 1975.
20. Seroka D. Wartość antygenowa szczepionki przeciw wścieklicznie dla ludzi wobec szczepów ulicznych krążących w populacji zwierząt dzikich w Polsce. *Med Dośw Mikrobiol* 1994;46:331-347.
21. Seroka D, Wysokińska T. Odpowiedź humoralna jako laboratoryjne kryterium oceny skuteczności szczepionek przeciw wścieklicznie. *Med Dośw Mikrobiol* 1982;34:61-71.
22. Seroka D. Sytuacja epizootyczna wścieklizny w Polsce w latach 1959-1960 na tle spostrzeżeń nad wścieklizną wśród zwierząt dzikich w okresie powojennym. *Przegl Epidemiol* 1961;15(4): 373-385.
23. Rabies in Poland 1940-1977. *Wkly Epidem Rec* No 13-30 March 1979.
24. Seroka D. Zwierzęce źródła zakażenia wścieklizną w Polsce w latach 1985-94. Tendencje epizootologiczne i dynamika ognisk w okresie wprowadzania doustnych szczepień zwierząt dzikich. *Przegl Epidemiol* 1995;49(3): 227-235.
25. Seroka D. Bezpieczeństwo szczepów szczepionkowych przeciw wścieklicznie stosowanych do doustnego szczepienia dzikich zwierząt. Ekspertyza opracowana na zlecenie Głównego Inspektora Sanitarnego. *Przegl Epidemiol* 1992;46(4): 255-261.
26. Sadkowska M. Zastosowanie biologii molekularnej w epidemiologii na przykładzie wścieklizny. *Przegl Epidemiol* 1995;49(3): 215-225.
27. Sadkowska-Todys M. Filogenetyczne pokrewieństwo ulicznych szczepów wirusa wścieklizny a reaktywność ich antygenów z przeciwciałami indukowanymi szczepem szczepionkowym. Rozprawa doktorska. Warszawa: PZH 1999.
28. Bogdanowicz W, Lesiński G, Sadkowska-Todys M, Gajewska M, Rutkowski R. Population genetics and bat rabies; a case study of *Eptesicus serotinus*. *Acta Chiropterologica* 2013;15(1):35-56.
29. Sprawozdania z działalności naukowej i usługowej Państwowego Zakładu Higieny za okres 2000-2016.

Received: 11.08.2016

Accepted for publication: 20.10.2016

Otrzymano: 11.08.2016 r.

Zaakceptowano do publikacji: 20.10.2016 r.

Address for correspondence:**Adres do korespondencji:**

Habilitated doctor Danuta Seroka

e-mail: danuta.barbara1@gmail.com