

JANUSZ NOWAKOWSKI, MARIA ORZECHOWSKA-KULAWCZUK

Badania nad wartością immunogenną szczepionek przeciw leptospirozie psów

Z Zakładu Technologiczno-Badawczego Puławskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego w Puławach

Problem zapobiegania leptospirozom psów, ze względu na bliski kontakt tych zwierząt z człowiekiem, jest stale aktualny. Szczepienia profilaktyczne, oprócz uodpornienia psów mają na celu zmniejszenie niebezpieczeństwa przypadkowych zakażeń ludzi, do których może dochodzić poprzez mocz zwierząt chorych lub bezobjawowych nosicieli leptospir. Dlatego też stosowane u psów szczepionki powinny posiadać możliwie silne właściwości uodporniające. Ich wartość immunogenną określić można m. in. na podstawie poziomu aglutynin w surowicach szczepionych zwierząt (1, 6, 8, 12). U psów stosowane są szczepionki zabite, zawierające najczęściej dwa serotypy leptospir: *L. interrogans* serotyp *icterohaemorrhagiae* i serotyp *canicola*. Do inaktywacji używany jest fenol (2, 12), formalina (4, 5, 7, 9), lub ciepło (8, 12).

Przeprowadzone badania własne miały na celu przygotowanie dwu rodzajów szczepionki bivalentnej z użyciem różnych metod inaktywacji, ocenę nieszkodliwości oraz wartości immunogennej szczepionek na podstawie poziomu aglutynin w surowicach szczepionych psów oraz porównanie szczepionek doświadczalnych z importowanymi preparatami handlowymi stosowanymi w praktyce.

Material i metody

Szczepionki. Do przygotowania szczepionek użyto dwu serotypów leptospir: *L. interrogans*-serotyp *icterohaemorrhagiae* (szczep M20) oraz *L. interrogans*-serotyp *canicola* (szczep Hond Utrecht IV). Dwutygodniowe hodowle każdego serotypu na bulionie Korthof'a, o mianie 10^8 leptospir/ml określonym metodą hodowlaną, podzielono na dwie części i przygotowano następujące rodzaje szczepionki:

A. Hodowle inaktywowano przez 24 godziny 0,3% fenolem w 30°C . Skuteczność inaktywacji sprawdzono pod mikroskopem (w ciemnym polu) oraz przy pomocy posiewów na bulion Korthof'a.

Następnie hodowle wirowano w ciągu 1,5 godziny przy $23\,000\times g$ (MSE HS-16) i osad zawieszano w płynie fizjologicznym, w 1/10 objętości wyjściowej. Szczepionkę bivalentną przygotowano łącząc równe objętości obu serotypów.

B. Hodowle inaktywowano w ciągu 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 56°C . Po sprawdzeniu przeżywalności metodami j.w. hodowle rozlewano do butelek i liofilizowano. Do szczepienia liofilizat rozpuszczano w płynie fizjologicznym, w 1/10 objętości wyjściowej. Szczepionkę bivalentną przygotowano łącząc równe objętości obu serotypów.

Do badań włączono jako preparaty odniesienia, dwie bivalentne szczepionki importowane: Leptovax-plus (Wellcome) s. 86912 i szczepionkę radziecką c. 4565.k613

oznaczoną dalej jako „R”, zawierające również serotypy *icterohaemorrhagiae* i *canicola*. Obie szczepionki znajdowały się w granicach terminu ważności.

W celu wstępnego określenia nieszkodliwości, badanymi szczepionkami zaszczepiono po trzy świnki morskie, podając im dootrzewnowo po 2,0 ml preparatu.

Zwierzęta. Do badań użyto 36 psów rasy mieszanej, różnej płci, w wieku 3–5 miesięcy. Przed szczepieniem badaniem serologicznym nie stwierdzono u nich (w rozcieńczeniu surowicy 1:10) przeciwciał anty *icterohaemorrhagiae* i *canicola*. Psy podzielono losowo na 4 grupy.

Szczepienie i pobieranie krwi do badań. Obie szczepionki doświadczalne oraz szczepionkę „R” podawano s.c. w objętości 2 ml, natomiast szczepionkę Leptovax-plus zgodnie z zaleceniami producenta w dawce 1 ml (1 fiołka). Po trzech tygodniach wykonano drugie szczepienie takimi samymi dawkami szczepionek. Liczby psów zaszczepionych poszczególnymi preparatami podano na wykresach. Krew do badań serologicznych pobierano z serca w 10 dniu i 3 tygodniu po pierwszym szczepieniu oraz po 10 dniach, 3, 5 i 8 tygodniach po drugim szczepieniu.

Odczyn aglutynacji. Za pomocą płynu fizjologicznego wykonywano dwukrotnie rozcieńczenia surowicy od 1:10 do 1:640. Do każdego rozcieńczenia dodawano równą objętość (0,2 ml) 7–10 dniowej hodowli leptospir odpowiedniego serotypu, na podłożu Korthof'a. Po dwóch godzinach inkubacji w temperaturze 30°C wynik odczytywano pod mikroskopem, używając kondensora ciemnego pola (pow. $\times 140$). Za miano surowicy przyjmowano najwyższe rozcieńczenie aglutynujące 50% leptospir.

Wyniki

Wstępne badanie nieszkodliwości szczepionek doświadczalnych, przeprowadzone na świnkach morskich, dało wynik pozytywny — zwierzęta pozostały zdrowe w ciągu 10-dniowego okresu obserwacji. U szczepionych psów również nie stwierdzono ujemnych skutków wakcynacji — stan ogólny zwierząt, apetyt i ciepłota wewnętrzna pozostały bez zmian. Nie zaobserwowano także żadnych objawów po podaniu drugiej dawki szczepionki liofilizowanej zawierającej surowicę z podłoża.

Badanie odpowiedzi serologicznej szczepionych psów dało następujące wyniki. Na ryc. 1 przedstawiono średnie geometryczne mian (GMT) aglutynin p-ko serotypowi *icterohaemorrhagiae*, w grupach psów uodpornionych poszczególnymi szczepionkami. Dziesięć dni po podaniu pierwszej dawki szczepionek, najwyższe miano stwierdzono po szczepionce liofilizowanej, dużo niższe po szczepionce fenolowej i Leptovax-plus nie stwierdzono przeciwciał po szczepionce „R”. W 3 tygodnie po pierwszym szczepieniu GMT w przypadku szczepionki fenolowej i liofilizowanej były zbliżone i wynosiły odpowiednio 27,0 (10–80) i 29,4 (10–160). Po zastosowaniu preparatów importowanych miano były dużo niższe Leptovax-plus 4,1 (0–20), „R” 1,7 (0–10), przy czym przeciwciała wystąpiły tylko u części psów. Po podaniu drugiej dawki szczepionki fenolowej i liofilizowanej stwierdzono wyraźny wzrost miana przeciwciał. W 10 dni po rewakcynacji odnotowano najwyższe miano aglutynin, GMT po szczepieniu szczepionką fenolową wynosiło 78,9 (40–160), po szczepionce liofilizowanej

było niższe 61,7 (20—80). Drugie szczepienie szczepionkami Leptovax-plus i „R” spowodowało jedynie nieznaczny wzrost mian do wartości odpowiednio 15,9 (10—40) i 6,7 (0—20).

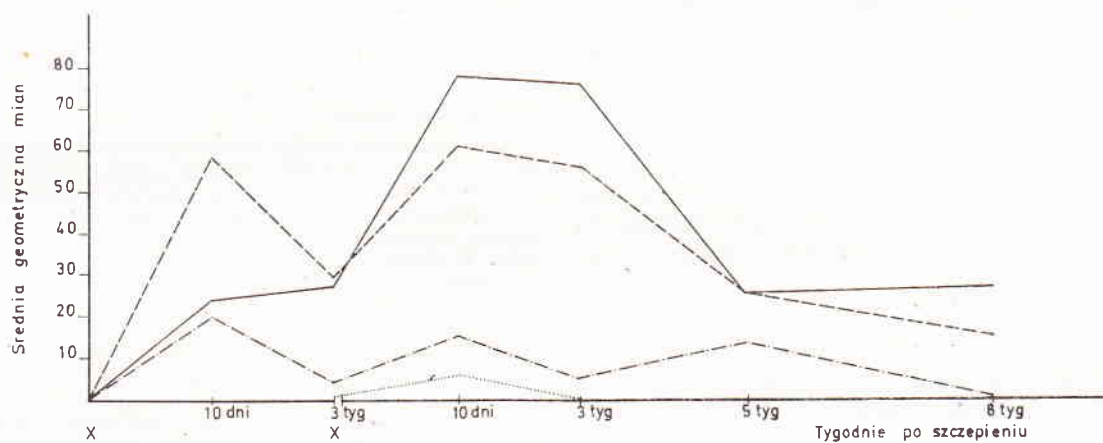
Po trzech tygodniach od drugiego szczepienia w surowicach psów, które otrzymały szczepionkę fenolową i liofilizowaną, oraz Leptovax-plus, wystąpił nieznaczny spadek ilości przeciwciał. Natomiast nie stwierdzono już aglutynin u psów szczepionych szczepionką „R”. Pięć tygodni po rewakcytacji, u psów szczepionych obiema szczepionkami doświadczalnymi, nastąpił wyraźny spadek miana aglutynin GMT — 25,0. Po następnych trzech tygodniach tj. w 8 tyg. po drugim szczepieniu u psów, które uodporniono szczepionką fenolową, miano przeciwciał utrzymało się na nie zmienionym poziomie. Odnotowano natomiast obniżenie się poziomu aglutynin u psów szczepionych preparatem liofilizowanym. W surowicach psów szczepionych preparatami odniesienia Leptovax-plus i „R” nie stwierdzono przeciwciał.

Na ryc. 2. przedstawiono miana aglutynin anty *canicola* w surowicach szczepionych zwierząt. U psów szczepionych preparatami doświadczalnymi, poziom przeciwciał anty *canicola* był niższy niż przeciwciał anty *icterohaemorrhagiae*. Po szczepieniu szczepionką Leptovax-plus przeciwciała anty *canicola* i anty *icterohaemorrhagiae* utrzymywały się na zbliżonym poziomie. W surowicach psów szczepionych szczepionką „R” nie stwierdzono przeciwciał przeciw serotypowi *canicola*.

Omówienie wyników

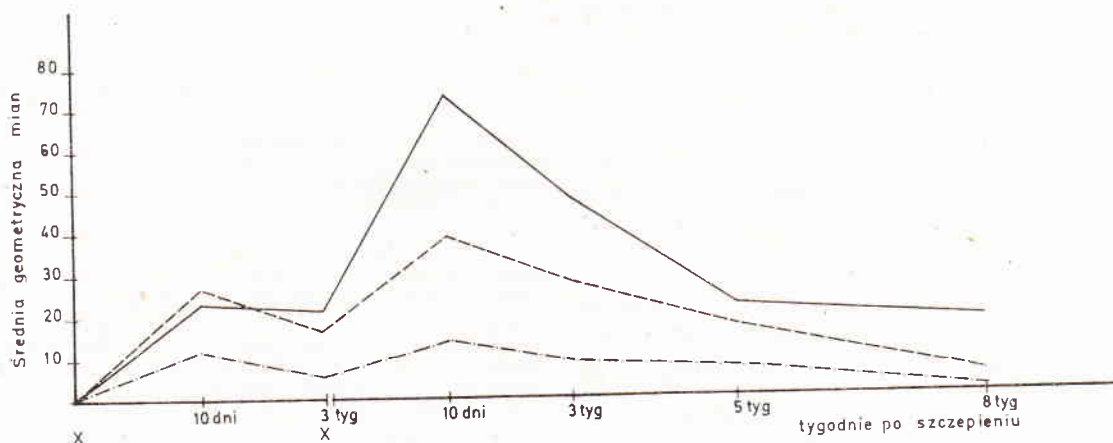
Na wartość immunogenną szczepionek, obok doboru odpowiednich szczepów ma również wpływ sposób ich przygotowania. W przeprowadzonych badaniach porównano wartość immunogenną dwóch rodzajów szczepionek doświadczalnych: szczepionki komórkowej inaktywowanej fenolem oraz szczepionki z pełnej hodowli, inaktywowanej ciepłem, zawierającej oprócz komórek produkty przemiany materii leptospir. Badania innych autorów (3, 10, 11) wykazały w płynach hodowlanych obecność rozpuszczalnych antygenów, posiadających pewne właściwości immunogenne.

Stwierdzono także, że szczepionka przygotowana z pełnej hodowli leptospir posiada lepsze właściwości uodporniające, w porównaniu do preparatu z samych komórek, zawierającego identyczną ilość drobnoustrojów (10). W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy uzyskano słabszą odpowiedź serologiczną u psów szczepionych bivalentną szcze-



Ryc. 1. Poziom aglutynin (GMT) anty *icterohaemorrhagiae* w surowicach psów szczepionych czterema szczepionkami

Objaśnienia: ————— = szczepionka fenolowa (16 psów); - - - - - = szczepionka liofilizowana (9 psów); - · - · - · = szczepionka Leptovax-plus (7 psów); · · · · · = szczepionka „R” (4 psy); x = szczepienie.



Ryc. 2. Poziom aglutynin (GMT) anty *canicola* w surowicach psów szczepionych czterema szczepionkami

Objaśnienia: ————— = szczepionka fenolowa (16 psów); - - - - - = szczepionka liofilizowana (9 psów); - · - · - · = szczepionka Leptovax-plus (7 psów); · · · · · = szczepionka „R” (4 psy); x = szczepienie.

panionką liofilizowaną, przygotowaną z pełnych hodowli serotypów *icterohaemorrhagiae* i *canicola*. Prawdopodobnie związane to było z zastosowaniem odmiennych metod inaktywacji do przygotowania obu szczepionek doświadczalnych. W szczepionce liofilizowanej antygeny poddane były dwukrotnie działaniu czynników inaktywujących: temperatury, jako właściwego środka inaktywującego, a następnie liofilizacji zastosowanej w celu zagęszczenia szczepionki. Przypuszczać zatem należy, że korzyść z użycia pełnych hodowli leptospir do przygotowania szczepionki, została pomniejszona przez zastosowanie szczególnie niekorzystnych metod inaktywacji. Jiran i wsp. (8) używając do przygotowania szczepionki tej samej metody (inaktywacja ciepłem, zagęszczenie przez liofilizację), uzyskali u szczepionych psów miano aglutynin przeciw serotypowi *icterohaemorrhagiae* 1:6 tj. na poziomie stwierdzonym w badaniach własnych po szczepieniu preparatem liofilizowanym.

Autorzy ci nie stosowali jednak porównawczo szczepionki przygotowanej z zastosowaniem innych metod inaktywacji. Nowakowski (dane niepublikowane) wykazał za pomocą czynnego testu ochronnego na chomikach, że szczepionka zawierająca serotyp *icterohaemorrhagiae*, inaktywowana ciepłem i poddana dodatkowo liofilizacji, posiadała mniejszą wartość immunogenną niż szczepionki inaktywowane fenolem lub formaliną. Potwierdza to wynik oceny porównywanych szczepionek dokonanej na podstawie odpowiedzi serologicznej.

Rezultaty uzyskiwane przez innych autorów (9, 10, 11) świadczą o tym, że szczepionki przygotowywane z pełnych hodowli leptospir posiadają lepsze właściwości uodporniające. Do ich sporządzenia jednakże powinny być używane podłoża nie zawierające surowicy o działaniu uczulającym (10). Należy zaznaczyć, że w badaniach własnych u psów szczepionych szczepionką liofilizowaną, zawierającą surowicę króliczą, nie zaobserwowano objawów wstrząsów anafilaktycznych. Obserwacja powyższa wymaga potwierdzenia na szerszym materiale doświadczalnym.

Skuteczność szczepień profilaktycznych przeciwko leptospirozie zależy bezpośrednio od jakości stosowanych szczepionek. Najpewniejszą metodą oceny ich wartości immunogennej jest kontrolne zakażenie szczepionych zwierząt. Badania wielu autorów (1, 6, 8, 12) wykazały, że do tego celu można również stosować metodę pośrednią, określając poziom aglutynin u szczepionych psów. W przeprowadzonych badaniach uzyskano zróżnicowaną odpowiedź serologiczną w zależności od stosowanego preparatu. Na podstawie mian aglutynin można sądzić, że obie szczepionki doświadczalne mają większą wartość immunogenną niż badane szczepionki odniesienia. Maksymalne miano przeciwciał, przeciwko obu serotypom,

były wyższe u psów szczepionych preparatami doświadczalnymi, ponadto aglutyniny utrzymywały się w krwiobiegu dłużej. Ponieważ sposób przygotowania użytych do badań porównawczych preparatów handlowych nie jest znany, nie można jednocześnie określić przyczyny słabszej odpowiedzi serologicznej psów uodpornionych tymi szczepionkami.

Piśmiennictwo

1. Brunner K. T., Meyer K. F.: J. Immun. 64, 365, 1950.
2. Czernosztanov A. A.: Weterinarija, Moskwa, 53, 1973.
3. Enzell S. B., Hoag W. G., Warner A. R., Yager R. H., Gochenour W. S. Jr.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 80, 220, 1952.
4. Gillespie R. W., Kenzy S. G.: Vet. Med. 53, 611, 1958.
5. Hanson L. E., Tripathy D. N., Killinger A. H.: J. Am. vet. med. Ass. 161, 1235, 1972.
6. Heath K. R., Box P. G.: J. comp. Path. 75, 127, 1950.
7. Hubbert W. T., Miller J. N.: J. Immun. 95, 759, 1965.
8. Jiran E., Kadlec V., Svaecos L.: Vet. Med. Praha 17, 367, 1972.
9. Lebeda M., Sbornik VSZL Brno VIII: 221, 1960.
10. Morsi H. M., Shibley G. P.: Am. J. vet. Res. 34, 115, 1973.
11. Schricker R. L., Hanson L. E.: Am. J. vet. Res. 24, 854, 1963.
12. Zwierzchowski J.: Zeszyty Naukowe WSR. Wrocław, 17, 1956 (6).

Adres autora: dr Janusz Nowakowski, ul. Wojska Polskiego 17/18, 24-100 Puławy.

Новиковски Я., Ожеховска-Кулявчик М. — Исследования иммуногенной ценности вакцин против лептоспироза собак.

На основании титра агглютининов в сыворотках иммунизируемых собак определялась иммуногенная стоимость двух бивалентных вакцин, приготовленных различными методами и содержащих *L. interrogans* серотип *icterohaemorrhagiae* и серотип *canicola*. В качестве препаратов отнесения применили две импортные вакцины, доступные на рынке. Наивысшие титры агглютининов (40—160) обнаружили в сыворотках собак, иммунизированных вакциной, инактивированной фенолом, более слабый серологический ответ (20—80) получили после иммунизации лисфилизованной вакциной, инактивированной теплом. Авторы предполагают, что причиной более низкой иммуногенной стоимости лисфилизованной вакцины было отрицательное воздействие тепла и процесса лисфилизации. В сыворотках собак, которых вакцинировали препаратами Leptovax — плюс и вакциной „R”, уровень агглютининов был ниже (соответственно 10—40 и 0—20), а время их удерживания короче чем в случае экспериментальных вакцин.

Nowakowski J., Orzechowska-Kulawczuk M. — Studies on the immunogenic value of vaccines against leptospirosis in dogs.

The immunogenic values of two bivalent vaccines prepared by different methods, containing *L. interrogans* serotype *icterohaemorrhagiae* and serotype *canicola*, were determined on the basis of agglutinin titres in sera of vaccinated dogs. In comparative studies two imported trade vaccines were applied. The highest titre of agglutinin (40—160) were noted in sera of dogs vaccinated with a phenol inactivated vaccine, lower response was found (20—80) after vaccination with a lyophilized heat inactivated vaccine. The authors assumed that a lower immunogenic activity of a lyophilized heat inactivated vaccine was due to an unprofitable influence of heat and lyophilization procedures. In sera of dogs vaccinated with Leptovax-plus or „H” vaccine the level of agglutinin was lower, 10—40 and 0—20, respectively. Besides, agglutinin disappeared earlier after immunization with trade vaccines.