

GRAŻYNA WRZOŁEK-ŁOBOCKA, JAN BUCZEK, ANDRZEJ TYSZKO*

Ocena immunogenności szczepionki adenowirusowej „Adenovac 2”

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

* Państwowy Zakład Leczenia Zwierząt, ul. Bolesława Prusa 5, 19-300 ERK

Summary

Evaluation of immunogenic properties of adenoviral vaccine „Adenovac 2”

The observations were done on calves immunized once or twice with the „Adenovac 2” in various seasons. The immunogenic properties of the vaccine were evaluated in the SN test on a primary bovine fetal kidney cells. Totally 286 sera of immunized animals collected every 10 days by 30 days from animals immunized once and for 66 days from animals immunized twice were examined. It was found that vaccination induced a high level of neutralizing antibodies (titres from 625 to 2125). A high level of antibodies persisted for 3 weeks after a single and for about 2 months after a double injection of the vaccine. Season does not affect the immune reactivity of the calves.

Rola adenowirusów jako czynnika etiologicznego chorób układu oddechowego, a niekiedy pokarmowego bydła została potwierdzona przez wielu autorów (11, 12, 17, 18, 19, 20). Szerokie rozprzestrzenienie tych zarazków, szczególnie wśród młodych cieląt w hodowlach wielko stadnych w Polsce (1, 7, 16) i na świecie (5, 8, 10, 17, 21, 24), stanowiło przesłankę do podjęcia prób oceny immunogenności inaktywowanej szczepionki adenowirusowej opracowanej we własnym zakresie. Szczepionka ta określona wstępnie jako „Adenovac 2” przebadana była uprzednio na małej grupie zwierząt laboratoryjnych i cielątach na nieszkodliwość i immunogenność (22). Celem uzyskania bardziej miarodajnych i obiektywnych wyników przeprowadzono rozszerzone badania w warunkach terenowych, śledząc dynamikę narastania swoistych przeciwciał neutralizujących po immunizacji cieląt opracowaną szczepionką.

Material i metody

Szczepionka. W badaniach użyto inaktywowanej formaliną i adsorbowanej na wodorotlenku glinu szczepionki „Adenovac 2” (22). Szczepionkę tę przygotowano ze szczepu izolowanego w Polsce od chorych cieląt (6). Został on zidentyfikowany jako serotyp 2 adenowirusów bydła i atenuowany poprzez 40-krotne pasażę na hodowli komórek nerek cieląt (23).

Zwierzęta. Do immunizacji użyto cieląt w wieku około 3–4 miesięcy. Zwierzęta pochodziły ze skupu z gospodarstw indywidualnych województwa olsztyńskiego. Przed immunizacją cielęta przeznaczone do badań dzielono na dwie odrębne grupy po około 10 sztuk w każdej. Doświadczenie prowadzono w ciągu 3 lat w różnych porach roku, tzn. w lecie, zimie, na przełomie jesieni i zimy oraz na przełomie zimy i wiosny. Cielęta podczas prowadzonych badań były pod nadzorem służby weterynaryjnej. W miarę występowania objawów chorobowych nie związanych z przeprowadzoną immunizacją poszczególne zwierzęta były leczone antybiotykami, witaminą C oraz Boviglobina.

Immunizacja cieląt. Zwierzęta immunizowano dwoma sposobami. Jednej grupie cieląt podawano szczepionkę domięśniowo w ilości 5 ml jednorazowo, a drugą grupę rewakcywowano w ten sam sposób po 10 dniach od pierwszej iniekcji. Kontrolne surowice otrzymano od cieląt przed rozpoczęciem immunizacji. Krew pobierano przeciętnie w odstępach 10-dniowych do 30 dnia w przypadku jednorazowej immunizacji i do 66 dnia po dwukrotnej.

Ocena immunogenności. Immunogenność szczepionki „Adenovac 2” oceniano testem seroneutralizacji (SN). Surowice przeznaczone do badania były inaktywowane w temperaturze +56°C przez 30 minut i przechowywane w temperaturze chłodni (+4°C) lub w zamrażarce (-20°C)

w zależności od terminu wykonywanych badań. Odczyn SN przeprowadzano w pierwotnej hodowli komórek nerek płodów bydłych metodą beta — używając stałej dawki wirusa — 100 TCID₅₀.

Wyniki opracowano stosując metodę Reeda i Muencha (18), miano surowic wyrażając w SND₅₀.

Ogółem przebadano 286 surowic pochodzących od 79 cieląt.

Wyniki i omówienie

Wyniki z przeprowadzonych badań, zawarte w tabelach wykazują, że zwierzęta poddane doświadczeniu nie zetknęły się wcześniej z adenowirusem serotypu 2. W żadnej z badanych surowic nie stwierdzono bowiem swoistych przeciwciał dla tego serotypu w mianie powyżej 5 i to bez względu na porę roku (tab. 3 i 4). Fakt ten umożliwił miarodajną ocenę właściwości immunogennych preparatu. Wielu bowiem autorów przy stwierdzaniu wysokich mian przeciwciał w surowicach kontrolnych dla adenowirusów rezygnuje zwykle z wyciągania wniosków co do wartości immunogennej szczepionki (13).

Wyniki zestawione w tab. 1 i 2 wskazują na stosunkowo szybką reaktywność u części immunizowanych zwierząt. Już po 10 dniach od pierwszej iniekcji większość cieląt odpowiedziała na antygen wytworzeniem przeciwciał neutralizujących. Na uwagę zasługuje jednak duży rozrzut wartości mian przeciwciał u poszczególnych zwierząt przetrzymywanych w tych samych grupach i warunkach; aż 16% cieląt nie zareagowało na podany preparat po 10 dniach, co wyrażone było mianem poniżej 5, a u 14,5% cieląt miano wynosiło zaledwie 5. U pozostałych natomiast zwierząt poziom przeciwciał był wyraźnie podwyższony i przekraczał w kilku przypadkach wartość 125. Tak niejednorodny obraz stanu odporności humoralnej po zastosowaniu tego samego preparatu mógł być spowodowany zróżnicowanym stanem układu odpornościowego poszczególnych osobników.

Analizując wyniki zestawione w tab. 3 i 4 można zauważyć w tym zakresie także niewielkie różnice w zależności od pory roku. Najmniej reaktywne w pierwszej fazie pobudzenia immunologicznego zwierzęta obserwowano na przełomie jesieni i zimy, bo prawie u połowy badanych cieląt nie zauważono wzrostu poziomu przeciwciał po 10 dniach od iniekcji w mianie powyżej 5. W porównaniu do analogicznych wyników przeprowadzonych przez nas uprzednio na małej grupie zwierząt immunizowanych także szczepionką „Adenovac 2” (22), stwierdza się dość istotne różnice w pobudzeniu odporności humoralnej bezpośrednio po podaniu preparatu. Miano bowiem po 7 dniach po uodpornianiu wynosiło wówczas u wszystkich zwierząt 280, co należy wiązać z działaniem anamnestycznym szczepionki (miana surowic kontrolnych wynosiły 56) u wszystkich badanych cieląt.

Immunizując zwierzęta jednorazowo (tab. 1) można było zaobserwować maksymalnie wysokie miana surowic po 20 dniach od iniekcji. Wartości ich mieściły się w przedziałach od 75 do 625. U 5 cieląt spośród 52 sztuk badanych obserwowano wzrost miana do 625. U większości jednak zwierząt miana te wynosiły 125. Litvinov

Tab. 1. Miana surowic (SND₅₀) cieląt immunizowanych jednokrotnie szczepionką Adenovac 2

Ogólna liczba surowic	Dni po immunizacji	Liczba surowic w mianie:								
		< 5	5	> 5	25	> 25	125	> 125	625	> 625
59	0	44	15	—	—	—	—	—	—	—
43	10	6	8	5	13	6	3	2	—	—
52	20	—	—	—	1	15	16	15	5	—
27	30	—	—	1	8	16	2	—	—	—

Tab. 2. Miana surowic (SND₅₀) cieląt immunizowanych dwukrotnie szczepionką Adenovac 2

Ogólna liczba surowic	Dni po immunizacji		Liczba surowic w mianie:								
	I	II	< 5	5	> 5	25	> 25	125	> 125	625	> 625*
20	0	0	17	3	—	—	—	—	—	—	—
19	10	0	4	1	6	4	2	1	1	—	—
19	20	10	—	—	—	—	2	7	4	—	5
17	30	20	—	—	—	1	2	6	6	—	2
10	38	28	—	1	—	1	3	1	1	2	1
10	52	42	—	—	—	2	3	2	2	—	1
10	66	56	1	—	—	—	—	4	4	1	—

Objaśnienie: * — miano nie przekracza 3125.

Tab. 3. Miana surowic (SND₅₀) cieląt immunizowanych jednokrotnie szczepionką Adenovac 2 w różnych porach roku

Pora roku	Ogólna liczba surowic	Dni po immunizacji	Liczba surowic w mianie								
			< 5	5	> 5	25	> 25	125	> 125	625	> 625
Zima	20	0	15	5	—	—	—	—	—	—	—
	10	10	1	1	2	4	1	1	—	—	—
	23	20	—	—	—	—	8	9	4	2	—
	10	30	—	—	1	3	5	1	—	—	—
Przełom jesieni i zimy	29	0	23	6	—	—	—	—	—	—	—
	23	10	4	6	2	5	3	2	1	—	—
	17	20	—	—	—	—	3	3	9	2	—
	7	30	—	—	—	3	4	—	—	—	—
Lato	10	0	6	4	—	—	—	—	—	—	—
	10	10	1	1	1	5	2	—	—	—	—
	12	20	—	—	—	1	4	4	2	1	—
	10	30	—	—	—	2	7	1	—	—	—

i wsp. (15) podając jednokrotnie inaktywowaną szczepionkę, uzyskaną z adenowirusa była serotypu 10, osiągnęli najwyższy poziom przeciwciał po 28 dniach od iniekcji, przy czym nie przekraczał on wartości 25. Bengelsdorff i wsp. stosując jednokrotnie szczepionkę poliwalentną, zawierającą między innymi adenowirusy bydłace serotypu 1 i 3, uzyskali maksymalny wzrost mian przeciwciał neutralizujących 71 dla serotypu 1 i 41 dla serotypu 3 po 3 tygodniach od immunizacji (4).

Po miesiącu od szczepienia występowała tendencja spadkowa w poziomie mian badanych surowic: utrzymywały się one powyżej 25, ale nie przekraczały 125. Ten krótki okres utrzymywania się wysokiej koncentracji przeciwciał wydaje się być wystarczający do zabezpieczenia cieląt na czas niezbędny do przeprowadzenia koniecznych niekiedy zabiegów zoohigienicznych.

Tabela 2 przedstawia dynamikę wytwarzania przeciwciał u zwierząt poddanych dwukrotnej immunizacji. Już po 10 dniach od drugiej iniekcji można było zaobserwo-

wać znaczne pobudzenie humoralnego mechanizmu odpornościowego, wyrażone podwyższonym mianem przeciwciał neutralizujących, które u poszczególnych zwierząt wynosiło 3125. Na tak wysokim poziomie miana te utrzymywały się u pojedynczych osobników do 52 dnia od pierwszego podania szczepionki. Wysoki poziom przeciwciał utrzymywał się do końca przeprowadzanego eksperymentu, tj. do około 2 miesięcy od rewakcytacji.

Wysokie miana surowic u zwierząt po zastosowaniu dwukrotnego uodporniania otrzymali także inni autorzy (2, 14, 15). Wyniki zestawione w tab. 2, dotyczące stanu odporności cieląt po dwukrotnej immunizacji, wykazują znacznie dłuższe niż w porównywanych pracach utrzymywanie się wysokiego poziomu przeciwciał; po 66 dniach od pierwszego szczepienia miana większości surowic wynosiły od 125 do 625. Podobne utrzymywanie się wysokiego stężenia przeciwciał obserwowano uprzednio (22) po trzykrotnym podaniu szczepionki. Obecnie uzyskane wyniki przemawiają zatem za dwukrotnym

Tab. 4. Miana surowic (SND₅₀) cieląt immunizowanych dwukrotnie szczepionką Adenovac 2 w różnych porach roku

Pora roku	Ogólna liczba surowic	Dni po immunizacji		Liczba surowic w mianie:								
		I	II	< 5	5	> 5	25	> 25	125	> 125	625	> 625 *
Lato	10	0	0	8	2	—	—	—	—	—	—	—
	10	9	0	1	1	3	2	2	1	—	—	—
	10	20	10	—	—	—	—	—	5	—	—	—
	7	30	20	—	—	—	—	—	2	5	—	—
Przełom zimny i wiosny	10	0	0	9	1	—	—	—	—	—	—	—
	9	10	0	3	—	3	2	—	—	1	—	—
	9	20	10	—	—	—	—	4	2	2	—	1
	10	30	20	—	—	—	1	2	4	1	—	2
	10	38	28	—	1	—	1	3	1	1	2	1
	10	52	42	—	—	—	2	3	2	2	—	1
	10	66	56	1	—	—	—	—	4	4	1	—

Objaśnienie: * miano nie przekracza 3125.

stosowaniem preparatu, co jest korzystniejsze ze względów ekonomicznych.

Porównanie immunogenności badanej szczepionki „Adenovac 2” z innymi preparatami adenowirusowymi jest trudne ze względu na nieliczne badania prowadzone w tym kierunku.

Reaktywność immunologiczna zwierząt w warunkach terenowych zależy, szczególnie w hodowlach wielkostadnych od bardzo wielu czynników zewnętrznych, między innymi od stanu utrzymania, żywienia i warunków klimatycznych (3). Stąd też wydawało się celowe przeprowadzenie doświadczeń na cielętach w różnych porach roku.

Wyniki zestawione w tab. 3 i 4 nie wskazują jednak na wystąpienie istotnych różnic w reaktywności cieląt w zależności od czasu przeprowadzonej immunizacji. Słabszą stosunkowo odpowiedź immunologiczną na badany preparat zaobserwowano po jednorazowym szczepieniu w okresie letnim (tab. 3), co należy tłumaczyć wystąpieniem ciężkiej biegunki spowodowanej czynnikami żywieniowymi.

W grupie cieląt immunizowanych dwukrotnie, badanie w lecie prowadzono tylko do 30 dnia od pierwszej iniekcji, ze względów organizacyjnych zaistniałych na fermie doświadczalnej. Obserwacje poczynione po dwukrotnej immunizacji na przełomie zimny i wiosny (tab. 4) wskazują na podobną dynamikę wytwarzania się ich jak w grupie badanej latem.

Zastosowany test SN do oceny wartości immunologicznej szczepionki „Adenovac 2” pozwolił wykazać występowanie wyjątkowo silnego pobudzenia odporności humoralnej u uodpornianych zwierząt. Według Bürkiego (9) jedynie ten test jest najbardziej miarodajny do oceny odporności indukowanej szczepionkami adenowirusowymi. Dla pełnej jednak oceny efektywności szczepionki „Adenovac 2” celowym wydaje się przeprowadzenie dodatkowych badań, z uwzględnieniem próby „challenge”.

Wnioski

1. Inaktywowana szczepionka „Adenovac 2” indukuje u cieląt immunizowanych jedno- i dwukrotnie dobrą odporność humoralną, wyrażoną wysokimi mianami surowic.

2. Jednorazowa immunizacja szczepionką „Adenovac 2” skutecznie zabezpiecza cielęta na okres 3 tygodni, co jest szczególnie zalecane przy nagłych zmianach

runków bytowych zwierząt.

3. Szczepionka „Adenovac 2” może być stosowana bez względu na porę roku.

Piśmiennictwo

- Baczyński Z., Majewska H., Zmudziński J.: Bull. vet. Inst. Puławy 22, 14, 1978.
- Bartha A.: Acta Vet. hung. 17, 209, 1967.
- Bartha A., Vetesi F., Mate Z.: Magy. Allatorv. Lap. 39, 27, 1984.
- Bangelsdorff H. J., Moser H., Pranter W.: Tierärztl. Umsch. 41, 453, 1986.
- Bibrack B., McKercher D. G.: Am. J. Vet. Res. 32, 805, 1971.
- Buczek J., Wrzosek-Łobocka G.: Med. Wet. 33, 741, 1977.
- Buczek J., Wrzosek G., Ziolkowska G.: Acta microb. pol. A, 5, 109, 1973.
- Burgin I., Toker A.: Vet. Fak. Derg. Ankara Univ. 32, 223, 1985.
- Bürki F.: J. Am. vet. med. Ass. 183, 897, 1973.
- Ceccarelli A., Farina R., Mani P.: Archo vet. ital. 30, 28, 1979.
- Cole A. M.: Aust. vet. J. 47, 306, 1971.
- Cole A. M.: Aust. vet. J. 46, 569, 1970.
- Fiammini C. F., Allegri G., Cavirani S., Valla G., Galvani G.: Obiettivi e Documenti Vet. 2, 39, 1984.
- Frolov V. S., Belousova R. V.: Veterinarija Moskwa 38, 1985.
- Litvinov O. B., Belousova R. V., Syurin V. N., Kolenkova L. M., Burtseva I. A.: Tr. Vses. Inst. eksp. Vet. 57, 116, 1983.
- Majewska H., Baczyński Z., Dzierżawski A.: Bull. vet. Inst. Puławy 22, 48, 1978.
- Nunez A., Castell S.: Rev. Salud anim. 7, 367, 1985.
- Reed L. J., Muench H.: Am. J. Hyg. 27, 493, 1938.
- Reed D. E., Wheeler J. G., Lupton H. W.: Am. J. vet. Res. 39, 1968, 1978.
- Rondhuis P. R.: Drukkerij — Uitgeverij G. van Dijk N. V., Breukelen 9 Dys. Rijksuniversiteit te Utrecht 1970.
- Stauber E. H., Abinanti F. R., Whitbeck G. D.: Am. J. vet. Res. 47, 774, 1986.
- Wrzosek-Łobocka G.: Annls Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sect. DD 39, 167, 1984.
- Wrzosek-Łobocka G.: Annls Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sect. DD 39, 153, 1984.
- Zupancic Z., Cvetnic S., Mayer V.: Vet. Arh. 54, 67, 1984.

Adres autora: dr Grażyna Wrzosek-Łobocka, ul. Kiepury 11/67, 20-838 Lublin

BROWNING J. W., SLEE K. J., MALMO J., BRICKSLING P.: Syndrom zapaści związany z zakażeniem bakteriami gram ujemnymi u krów, u których indukowano poród przy pomocy deksametazonu. (A collapse syndrome associated with gram negative infection in cows treated with dexamethazone to induce parturition). Aust. vet. J., 67, 28—29, 1990 (1)

Celem jak najlepszego wykorzystania okresu pastwiskowego przyspieszono porody podając krowom domięśniowo 25—30 mg syntetycznego deksametazonu o przedłużonym działaniu. Jeżeli poród nie wystąpił w okresie 9 dni podawano domięśniowo 500 µg cloprostenole. U części krów po deksametazonie rozwinął się zespół zapaści cechujący się otępieniem, depresją, odwodnieniem, wodnistą biegunką i ustaniem ruchów żwacza. W miarę rozwoju objawów klinicznych ciepłota wewnętrzna spadała poniżej normy. U 16 z 17 krów z objawami syndromu badania wykazały neutrofilię. Z mleka 19 z 32 krów z objawami syndromu wyizolowano bakterie gram ujemne, w tym *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* i *Pseudomonas* sp.