

Ocena nieszkodliwości szczepień świń delecyjną szczepionką przeciw chorobie Aujeszky'ego

ELŻBIETA MIKULSKA-SKUPIEŃ, WOJCIECH SZWEDA, ZBIGNIEW PROCAJŁO

Zespół Epizootologii Katedry Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM,
ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

Mikulska-Skupień E., Szweda W., Procajło Z.

Evaluating the innocuousness of pig vaccinations against Aujeszky's disease using deleted vaccine

Summary

The purpose of the study was to evaluate the innocuousness of deleted vaccines against Aujeszky's disease (AD) in pigs administered intradermally (I.D.) compared to the traditional intramuscular (I.M.) route.

The study was carried out on 21 piglets, 8 weeks old, divided into three equal groups and vaccinated twice at 12 and 16 weeks of age using the deleted Porcilis Begonia (Intervet) vaccine: group I - 2.0 ml I.M., group U - 0.2 ml I.D. with needle-free apparatus SERENA, model SD 1-2, Emaplast, Italy and group K (control) - 2.0 ml PBS I.M. Local and general side-effects, body temperature and weight gain were examined for 70 days following the first vaccination.

The study revealed that I.D. administration of the deleted Porcilis Begonia vaccine gave no local or general side-effects and, just as I.M. vaccination, had no negative influence on the clinical status and weight gains in immunized pigs. Therefore, this can be an alternative route of vaccination to the traditional I.M. when realizing AD „vaccination-eradication” programs.

Keywords: Aujeszky's disease, intradermal vaccination, innocuousness

Koncepcja produkcji delecyjnych (markerowych) szczepionek przeciw chorobie Aujeszky'ego (chA) powstała dzięki odkryciu, przy pomocy metod biologii molekularnej, że niektóre wykorzystywane od wielu lat szczepionkowe szczepy konwencjonalne *Herpesvirus suis* typ 1 (SHV-1) zostały, drogą przypadkowych mutacji, pozbawione zdolności tworzenia otoczkowej glikoproteiny E (gE) (9, 10, 16, 18). Dalsze badania pozwoliły na stwierdzenie, że wszystkie dotychczas zbadane szczepy terenowe SHV-1 (ponad 300) stymulują produkcję przeciwciał anti-gE, ponieważ posiadają w genomie odpowiedni region kodujący, dzięki czemu powstała koncepcja serologicznego odróżniania osobników zakażonych SHV-1 od szczepionych (12, 13, 15). Twórcami pierwszego gE-ujemnego szczepu SHV-1, uzyskanego metodami inżynierii genetycznej, byli Quint i wsp. (19). W późniejszym okresie opracowano szereg mutantów delecyjnych, pozbawionych genów kodujących inne glikoproteiny, głównie gC lub gG oraz różnicujących testów diagnostycznych (6, 11, 15, 23). W oparciu o szczepionki delecyjne oraz odpowiadające im testy serologiczne (ELISA) opracowano, stosowany obecnie w wielu krajach europejskich, program „szczepienie – eliminacja” („vaccination – eradication programme”). Założeniem tego programu, bazującego aktualnie w celu unifikacji wyłącznie na szczepionkach gE-ujemnych oraz tes-

tach gE-ELISA, jest połączenie masowych szczepień świń szczepionkami delecyjnymi z wykrywaniem, przy pomocy odpowiednich testów serologicznych, świń zakażonych SHV-1 wśród świń szczepionych i ich eliminację ze stad (12, 13, 17, 20, 21).

Wprowadzenie w wielu krajach europejskich intensywnych szczepień świń w ramach realizacji programu „szczepienie – eliminacja” miało wpływ nie tylko na poszukiwanie najskuteczniejszych szczepionek, ale także na wybór optymalnej drogi ich podawania. Najbardziej rozpowszechniona i uważana za standardową drogę szczepienia przeciw chA jest iniekcja domięśniowa (I.M.) (24, 28). Jednak współczesne programy zwalczania chA zakładają intensywną immunizację dużej liczby zwierząt różnych grup wiekowych, przebywających w zróżnicowanych warunkach i systemach chowu, co stwarza pewne trudnienia w stosowaniu tego sposobu wakcynacji i przyczynia się do poszukiwania dróg alternatywnych.

Alternatywą dla szczepień domięśniowych może być śródskórne (I.D.) podawanie szczepionki przy pomocy specjalnych, bezigłowych aparatów. Zastosowanie I.D. iniekcji tą techniką pozwala na znaczne usprawnienie zabiegów, ze względu na łatwość podawania szczepionki, a co za tym idzie – brak konieczności unieruchamiania zwierząt, a także wyeliminowanie niekorzystnych reakcji lokalnych oraz możliwości

przenoszenia zakażeń (1, 2, 26, 29). W naszym kraju ocena szczepień I.D. przeciw chA nie była dotychczas przeprowadzona, a jej wyniki mogłyby być przydatne wobec bliskiej konieczności realizacji programu zwalczania chA (22). W związku z tym podjęto badania zmierzające do określenia przydatności tej techniki szczepień przeciw chA u trzody chlewnej.

Celem badań była ocena nieszkodliwości delecyjnej szczepionki przeciw chA u świń, podawanej drogą śródskórną w porównaniu z tradycyjnie stosowaną drogą domięśniową.

Materiał i metody

Zwierzęta. Badania przeprowadzono na 21 prosiątach rasy wbp, obu płci, w wieku 8 tyg., pochodzących od loch nie szczepionych przeciw chA, ze stada wolnego od SHV-1. Prosięta zostały umieszczone w pomieszczeniach Katedry Epizootiologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie, miały stały dostęp do wody i były żywione *ad libitum* paszami Trzoda Starter, Trzoda Grower i następnie Trzoda Finisz (Dobropasz – Grupa-Rolimpex Sp. z o.o.). Po odrobaczeniu zwierzęta zostały ponumerowane od 1 do 21 i podzielone na trzy grupy – dwie doświadczalne i jedną kontrolną, liczące po 7 osobników. Po 2 tyg. okresie adaptacji wszystkie prosięta poddano badaniu serologicznemu na obecność przeciwciał anti-gE SHV-1 testem gE-ELISA przy użyciu gotowego zestawu – Pseudorabies Virus gp I Antibody Test Kit (Herd Chek Anti-PRV gp I) firmy IDEXX Lab. Inc. USA, zgodnie z zaleceniami producenta.

Szczepionka. Do szczepień przeciw chA użyto delecyjnej, żywej atenuowanej szczepionki Porcilis Begonia (Intervet), seria 97553F, opartej na gE- i TK-ujemnym mutancie delecyjnym Begonia, uzyskanym ze zjadliwego szczepu Northern Ireland Aujeszky-3 (NIA-3) SHV-1 (30). Dawka szczepionki zawiera co najmniej $10^{6,0}$ TCID₅₀ wirusa. Jako rozcieńczalnik stosowano Diluvac Forte.

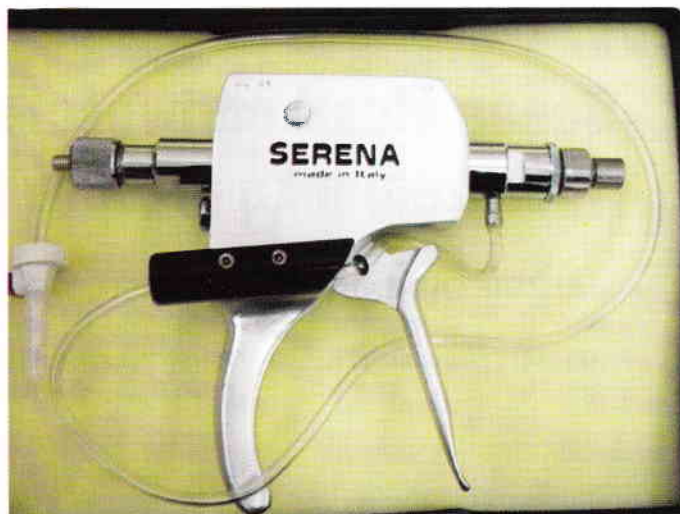
Szczepienie. Prosięta w wieku 12 i 16 tyg. poddano dwukrotnemu szczepieniu: gr. I – Porcilis Begonia w dawce 2 ml/szt. ($10^{6,0}$ TCID₅₀) domięśniowo (I.M.) w mięśnie szyi, gr. II – Porcilis Begonia w dawce 0,2 ml/szt. ($10^{5,0}$ TCID₅₀) śródskórną (I.D.) w okolicy szyi, grupa K – PBS w dawce 2 ml/szt. – domięśniowo w mięśnie szyi.

Do szczepień śródskórnych używano bezigłowego aparatu Serena model SD 1-2, prod. Emaplast, Włochy (ryc. 1).

Ocena nieszkodliwości szczepionki

Po szczepieniu świni wszystkich grup podlegały ocenie w oparciu o następujące kryteria (25):

- stan kliniczny – prowadzono codzienne obserwacje kliniczne w kierunku występowania reakcji lokalnych w miejscu iniekcji szczepionki oraz ogólnych,
- kształtowanie się wewnętrznej ciepłoty ciała – pomiary wewnętrznej ciepłoty ciała (w.c.c.) wykonywano przez 2 dni przed każdym szczepieniem, w dniu szczepienia oraz przez 6 dni po szczepieniu,
- kształtowanie się masy ciała – pomiarów masy ciała (m.c.) dokonywano indywidualnie w dniu I szczepienia, w 2 tyg. po I szczepieniu, w dniu II szczepienia oraz w 2 i 4 tyg. po II szczepieniu.



Ryc. 1. Bezigłowy aparat do szczepień śródskórnych (Serena model SD 1-2)



Ryc. 2. Grudka po właściwie wykonanej śródskórnej iniekcji szczepionki – zbliżenie (strzałka)

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie, porównując ze sobą wszystkie grupy, z zastosowaniem testu analizy wariancji dla porównania wielu średnich (test NIR) przy $p \leq 0,05$ oraz $p \leq 0,01$ i określeniem odchyłeń standardowych.

Wyniki i omówienie

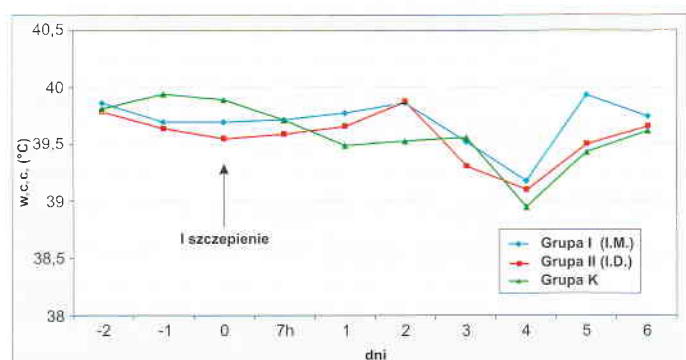
U świń w grupie I szczepionej I.M. nie zaobserwowano żadnego ubocznego odczynu lokalnego w miejscu iniekcji szczepionki. U świń w grupie II szczepionej I.D. stwierdzano obecność nieznacznie zaczerwienionych grudek o średnicy 3-6 mm, świadczących o właściwie wykonanej iniekcji (ryc. 2). Grudki te zanikały w ciągu 72-96 godz. U immunizowanych świń obu grup nie zaobserwowano żadnych ubocznych reakcji ogólnych, a ich stan kliniczny do 70. dnia po pierwszym szczepieniu nie budził zastrzeżeń.

Kształtowanie się w.c.c. u świń po I i II szczepieniu Porcilis Begonia przedstawiono na ryc. 3 i 4. Średnia dzienna w.c.c. w obu grupach doświadczalnych wzrastała nieznacznie po I szczepieniu, osiągając maksymalną wartość w drugim dniu – w grupie I – $39,86^{\circ}\text{C}$ i w grupie II – $39,88^{\circ}\text{C}$. W grupie K w tym samym dniu średnia w.c.c. wynosiła $39,53^{\circ}\text{C}$. Po II szczepieniu średnia dzienna w.c.c. świń we wszystkich gru-

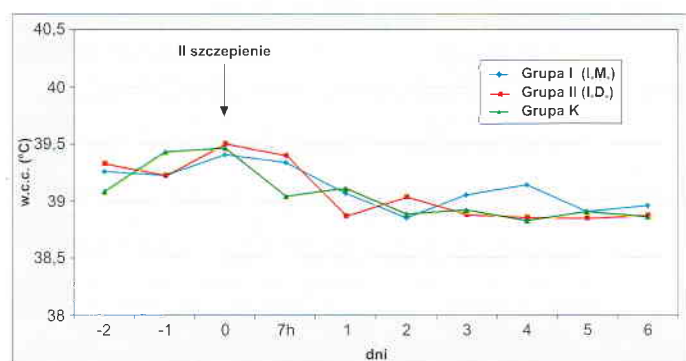
Tab. 1. Średnie przyrosty masy ciała świń po immunizacji szczepionką Porcilis Begonia

Wiek (tyg.)	Dni po szczepieniu	Masa ciała (kg)	Gr. I (I.M.)		Masa ciała (kg)	Gr. II (I.D.)		Masa ciała (kg)	Gr. K	
			Przyrosty masy ciała (kg)			Przyrosty masy ciała (kg)			Przyrosty masy ciała (kg)	
			x	dziennie		x	dziennie		x	dziennie
12 (I szczepienie)	0	27,63	-	-	28,30	-	-	24,50	-	-
14	14	41,60	+14,00	+1,000	38,80	+10,50	+0,750	35,00	+10,50	+0,750
16 (II szczepienie)	28	53,10 ^a	+25,50	+0,911	49,70	+21,40	+0,764	44,40 ^b	+19,90	+0,711
18	42	67,00 ^a	+39,40	+0,938	63,00	+34,70	+0,826	55,90 ^b	+31,40	+0,748
20	56	79,30 ^a	+51,70	+0,923	74,60	+46,30	+0,827	66,40 ^b	+41,90	+0,798
22	70	91,10 ^a	+63,50	+0,907	88,40	+60,10	+0,859	77,85 ^b	+53,35	+0,762

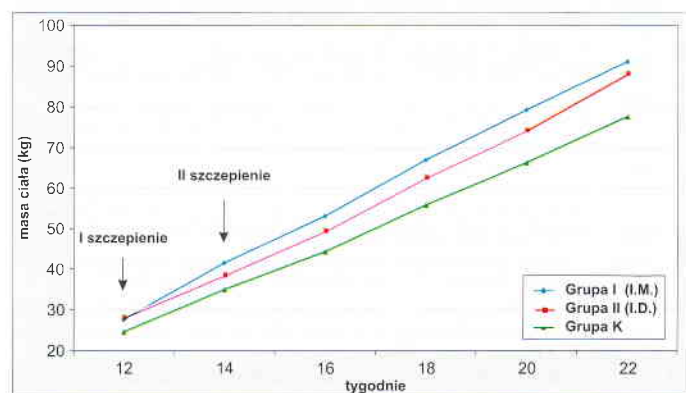
Objaśnienia: a, b – różnice istotne pomiędzy wszystkimi grupami przy $p \leq 0,05$, x – średni przyrost masy ciała w grupie określany w odstępach 2 tyg. narastająco w stosunku do dnia 0.



Ryc. 3. Średnia dzienna wewnętrzna ciepłota ciała świń po I szczepieniu Porcilis Begonia



Ryc. 4. Średnia dzienna wewnętrzna ciepłota ciała świń po II szczepieniu Porcilis Begonia



Ryc. 5. Średnie masy ciała świń po immunizacji Porcilis Begonia

pach pozostawała w granicach norm fizjologicznych, a pomiędzy grupami nie stwierdzono znaczących różnic.

Kształtowanie się masy ciała oraz przyrostów m.c. świń po immunizacji przedstawiono w tab. 1 i na ryc. 5. W obu grupach doświadczalnych po I i II szczepieniu, jak i w grupie kontrolnej wzrost świń do 70. dnia po pierwszym szczepieniu przebiegał prawidłowo i równomiernie. U świń grupy I stwierdzono po II szczepieniu statystycznie istotnie wyższe przyrosty m.c. w stosunku do świń grupy K.

W badaniach własnych dotyczących oceny nieszkodliwości szczepionki Porcilis Begonia, podawanej drogami I.D. lub I.M., nie wykazano występowania niekorzystnych reakcji miejscowych i ogólnych, zarówno po I, jak i po II szczepieniu w żadnej z grup świń szczepionych. Występujące w miejscu I.D. podania szczepionki niewielkie, nieznacznie zaczerwienione grudki sygnalizowały jedynie prawidłowo wykonaną iniekcję i całkowicie zanikały po 72-96 godz. (ryc. 2). Obecność podobnych zmian w miejscu szczepienia I.D. opisali również inni autorzy. Vannier i Cariolet (26) stwierdzali w miejscu iniekcji I.D. obecność grudek o średnicy 1-2 mm, które zanikały po 24 godz. Natomiast po podaniu dawki przypominającej w miejscu szczepienia pojawiały się duże (do 4 cm) grudki z nekrotycznym ogniskiem, utrzymujące się przez kilka tygodni. Podobnie Visser i wsp. (29) obserwowali pojawianie się w miejscu I.D. iniekcji szczepionki białych guzków o średnicy 3-4 mm, zanikających po kilku dniach i nie pozostawiających śladów możliwych do odnalezienia w badaniu poubojowym.

Zgodnie z zaleceniami (25) dla właściwej oceny nieszkodliwości szczepionek przeciw chA powinny być one podawane świniom dwukrotnie, ponieważ reakcje uboczne po szczepieniu jednokrotnym mogą być słabo wykrywalne. W badaniach własnych szczepionkę zawsze podawano dwukrotnie, nie stwierdzając wykrywalnych efektów ubocznych, zarówno po I, jak i po II szczepieniu. Uboczne reakcje miejscowe związane są najczęściej z użyciem adjuwantów stosowanych zwykle w szczepionkach inaktywowanych, ale ostat-

nio coraz częściej, dla wzmocnienia immunogenności, także w atenuowanych (29, 30). Vannier i Cariolet (26) podając I.D. szczepionkę inaktywowaną z adjuwantem olejowym zaobserwowali okresowe przyhamowanie wzrostu świń, zarówno w warunkach eksperymentalnych, jak i terenowych. Zjawisko to wiązało z miejscową reakcją po drugim szczepieniu, aczkolwiek po uboju świń zmiany w miejscu iniekcji szczepionki były minimalne lub żadne. W badaniach własnych takich reakcji nie stwierdzono, stosowano jednak szczepionkę atenuowaną z adjuwancyjnym rozcieńczalnikiem Diluvac Forte, opartym na alfa-tokoferolu.

Prawidłowe i równomierne kształtowanie się przyrostów m.c. (ryc. 5) oraz w.c.c. w granicach norm fizjologicznych (ryc. 3 i 4) u wszystkich świń, zarówno po I, jak i po II szczepieniu wskazują, że ani I.D., ani I.M. podanie szczepionki nie wpłynęło negatywnie na stan zdrowia uodpornianych świń. Zaobserwowano jedynie nieznaczny wzrost w.c.c. po I szczepieniu w obu immunizowanych grupach, przy czym średnia dzienna w.c.c. w żadnej z grup nie przekroczyła 40°C. Taką nieznaczną i krótkotrwałą poszczepienną reakcją termiczną, nie przekraczającą z reguły poziomu 40,3°C i będącą odpowiedzią organizmu na podanie antygeny szczepionkowego, odnotowali również inni autorzy (3, 4, 26, 27).

W latach 70.-80. ubiegłego stulecia szerokie badania kilkunastu stosowanych ówczynie w Europie atenuowanych i inaktywowanych szczepionek przeciw chA przeprowadziło wielu autorów (5, 7, 8, 14). Z reguły nie stwierdzali oni ubocznych reakcji poszczepiennych, poza krótkotrwałą utratą bądź zmniejszeniem apetytu oraz podwyższeniem w.c.c. do 40,3°C przez 1-3 dni w przypadku niektórych szczepionek.

W badaniach własnych nie stwierdzono natomiast wzrostu w.c.c. po II szczepieniu, zarówno w grupie szczepionej drogą I.M., jak i I.D. Podobne wyniki uzyskali Vannier i Cariolet (26), którzy po podaniu drogą I.D. inaktywowanej szczepionki przeciw chA zaobserwowali w okresie dwóch dni po I szczepieniu wzrost w.c.c. powyżej 40°C u wszystkich zwierząt w grupie, natomiast nie odnotowali takiego wzrostu po rewakcytacji przeprowadzonej 5 tygodni później.

Przeprowadzone badania wykazały, że I.D. szczepienie świń delecyjną szczepionką Porcilis Begonia przeciw chA nie wywołuje ubocznych reakcji miejscowych oraz ogólnych i podobnie jak szczepienie I.M. nie ma negatywnego wpływu na stan kliniczny i przyrosty masy ciała uodpornianych świń. Technika ta może stanowić alternatywę dla tradycyjnych szczepień domięśniowych w realizacji programu „szczepienie – eliminacja” zwalczania chA.

Piśmiennictwo

- Berneri C., Lodetti E., Amadoro M., Massirio I.: Immunizzazione dei suini per via intradermica. *Sel. Vet.* 1992, 33, 449-457.
- Brun A., Vannier P.: Essais de vaccination par la voie dermique chez le porc. *Journées Rech. Porcine en France* 1988, 20, 147-150.

- Ferrari M., Brack A., Romanelli M. G., Mettenleiter T. C., Corradi A., Dal Mas N., Losio M. N., Silini R., Pinoni C., Pratielli A.: A study of the ability of a TK-negative and gI/gE-negative pseudorabies virus (PRV) mutant inoculated by different routes to protect pigs against PRV infection. *J. Vet. Med. B* 2000, 47, 753-762.
- Gielkens A. L. J., Moormann R. J. M., Van Oirschot J. T., Bems A. J. M.: Vaccine efficacy and innocuity of strain 783 of Aujeszky's disease virus. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* 1989, 49, 27-35.
- Leeuw P. De, Van Oirschot J.: Vaccines against Aujeszky's disease: Evaluation of their efficacy under standardized laboratory conditions. *Vet. Quart.* 1985, 7, 191-197.
- Marchioli C. C., Yancey R. J., Wardley R. C., Thomsen D. R., Post L. E.: A vaccine strain of pseudorabies virus with deletions in the thymidine kinase and glycoprotein X genes. *Am. J. Vet. Res.* 1987, 48, 1577-1583.
- McFerran J. B., Dow C.: Studies on immunization of pigs with the Bartha strain of Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 1975, 19, 17-22.
- McFerran J. B., McCracken R. M., Dow C.: Comparative studies with inactivated and attenuated vaccines for protection of fattening pigs. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* 1982, 17, 163-170.
- Mettenleiter T. C.: Immunobiology of pseudorabies (Aujeszky's disease). *Vet. Immunol. Immunop.* 1996, 54, 221-229.
- Mettenleiter T. C., Lukacs N., Rziha H. J.: Pseudorabies virus avirulent strains fail to express a major glycoprotein. *J. Virol.* 1985, 56, 307-311.
- Nauwynck H. J., Labarque G. G., Pensaert M. B.: Efficacy of an intranasal immunization with gEgC and gEgI double-deletion mutants of Aujeszky's disease virus in maternally immune pigs and the effects of a successive intramuscular booster with commercial vaccines. *J. Vet. Med. B* 1999, 46, 713-722.
- Oirschot J. T. Van: The antibody response to glycoprotein I and the control of Aujeszky's disease. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* 1989, 49, 129-138.
- Oirschot J. T. Van, De Waal C. A. H.: An ELISA to distinguish between Aujeszky's disease vaccinated and infected pigs. *Vet. Rec.* 1987, 121, 305-306.
- Oirschot J. T. Van, Gielkens A. L. J.: Vaccines against Aujeszky's disease: comparison of efficacy, DNA fingerprints and antibody response to glycoprotein I. *Vet. Quart.* 1987, Vol. 9, Suppl. 1, 37-49.
- Oirschot J. T. Van, Gielkens A. L. J., Moormann R. J. M., Bems A. J. M.: Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Vet. Microbiol.* 1990, 23, 85-101.
- Oirschot J. T. Van, Rziha H. J., Moonen L. M., Pol J. M. A., Van Zaane D.: Aujeszky's disease: Infected pigs can be distinguished from vaccinated pigs. *Proc. 9th IPVS Congress, Barcelona 1986*, s. 355.
- Oirschot J. T. Van, Wijsmuller J. M., De Waal C. A. H., Van Lith P. M.: A novel concept for the control of Aujeszky's disease: Experiences in two vaccinated pig herds. *Vet. Rec.* 1990, 126, 159-163.
- Pejsak Z.: Teoretyczne podstawy oraz praktyczne możliwości zwalczania choroby Aujeszky'ego. *Medycyna Wet.* 1990, 46, 129-133.
- Quint W., Gielkens A. L. J., Van Oirschot J. T., Bems A. J. M., Cuypers H. T.: Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus: a new generation of „live” vaccines. *J. Gen. Virol.* 1987, 68, 523-534.
- Szweda W., Lipowski A., Bączek W., Dadun M., Platt-Samoraj A., Siemionek J.: Możliwości uwalniania populacji świń od wirusa choroby Aujeszky'ego przy pomocy programu „szczepienie – eliminacja”. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 177-181.
- Szweda W., Lipowski A., Bączek W., Dadun M., Platt-Samoraj A., Siemionek J.: Rola szczepień szczepionkami delecyjnymi w ograniczaniu rozprzestrzeniania wirusa choroby Aujeszky'ego w fermach świń objętych programem „szczepienie – eliminacja”. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 229-234.
- Szweda W., Lipowski A., Pejsak Z.: Strategia uwalniania państw Unii Europejskiej i Polski od choroby Aujeszky'ego. *Medycyna Wet.* 2004 (złożono do druku).
- Thomsen D. R., Marchioli C. C., Yancey R. J., Post L. E.: Replication and virulence of pseudorabies virus mutants lacking glycoprotein gX. *J. Virol.* 1987, 61, 229-232.
- Vanderpoorten A., Goddeeris B., De Roose P., Hendricx L., Biron P., Desmetre P.: Evaluation of parenteral vaccination methods with glycoproteins against Aujeszky's disease in pigs. *Vet. Microbiol.* 1997, 55, 81-89.
- Vannier P.: Testing of Aujeszky's disease vaccines (safety, efficacy, reduction of virus shedding). *Proc. O.I.E. Symp. on Aujeszky's Disease, Bangkok, Thailand 1994*, s. 23.
- Vannier P., Cariolet R.: Vaccination of pigs against Aujeszky's disease by the intradermal route using live attenuated and inactivated virus vaccines. *Vet. Microbiol.* 1991, 26, 11-23.
- Vannier P., Hutet E., Cariolet R.: Influence of passive immunity on pig immunization with deleted Aujeszky's disease vaccines measured by the amount of wild virus excretion after challenge. *Vet. Microbiol.* 1995, 43, 53-63.
- Visser N.: Vaccination strategies for improving the efficacy of programs to eradicate Aujeszky's disease virus. *Vet. Microbiol.* 1997, 55, 61-74.
- Visser N., Egger W., Lütticken D.: Intradermal application of Aujeszky's disease virus strain Begonia with tocopherol-based adjuvant and a novel design injection device. *Acta Vet. Hung.* 1994, 42, 413-418.
- Visser N., Lütticken D.: Experiences with a gI/TK modified live pseudorabies virus vaccine: strain Begonia. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* 1988, 49, 37-44.