

IWONA MARKOWSKA-DANIEL, ZYGMUNT PEJSAK, KAZIMIERZ TARASIUK,
BOGUSŁAW BŁASZCZYK, STANISŁAW SZMIGIELSKI *, GERHARD PULVERER **

Zastosowanie *Propionibacterium avidum* (PA) KP-40 w stymulacji układu odpornościowego świń immunizowanych wybranymi antygenami wirusowymi

Zakład Chorób Świń Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy
* Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, ul. Szaserów 128, 00-909 Warszawa
** Institute for Medical Microbiology and Hygiene, University of Cologne,
Goldenfelsstr. 19-21, D-5000 Köln 41, RFN

Summary

Application of *Propionibacterium avidum* (PA) KP-40 in stimulation of pigs immunized with selected viral antigens

Stimulatory properties of *Propionibacterium avidum* were estimated on the basis of humoral immunity firmation in pigs and protective value of combined vaccination with Suivac A and PA KP-40 (experiment a). In this experiment 22 piglets were treated with Suivac A and/or PA KP-40. 8 weeks after vaccination piglets were challenged with virulent NIA 3 strain of pseudorabies virus. The analysis of body weight gains and persistence of increased internal temperature revealed, that nonspecific immune stimulation together with specific vaccine gives better protection of animals than vaccination with Suivac A only. Influence of immunostimulation with PA KP-40 preparation on piglets challenged with hog cholera (HC) virus was investigated in experiment (b). 30 piglets were inoculated with lapinized vaccine Lapest and/or PA KP-40 and then challenged with virulent HC strain. Treatment of piglets with PA KP-40 resulted in twofold prolonged period of survival, comparing to untreated, infected controls.

W ostatnich latach obserwuje się szybki rozwój badań w zakresie modulacji odpowiedzi immunologicznej poprzez podawanie różnych naturalnych lub chemicznych immunomodulatorów (15, 19, 21, 23, 24). Szczególnie duże znaczenie przypisuje się preparatom nieswoistym, cechującym się wielokierunkowym oddziaływaniem na układ odpornościowy (7, 9, 10, 11, 15, 17, 18). Zalicza się do nich m.in. drobnoustroje z rodzaju *Propionibacterium* sp.

W piśmiennictwie spotyka się doniesienia o korzystnych rezultatach stosowania stymulacji wymienionym rodzajem bakterii u cieląt (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8), nie ma natomiast danych o próbach tego rodzaju postępowania u trzody chlewnej. Uzasadnia to celowość podjęcia badań zmierzających do określenia możliwości zastosowania propionibakterii w podnoszeniu poziomu nieswoistej odporności świń, m.in. na zakażenia wirusowe.

Dla osiągnięcia przedstawionego celu wykonano w izolatoriach I Wet dwa (a) i (b) niezależnie doświadczenia. W pierwszym (a) wartość immunostymulującą propionibakterii ustalono na podstawie oceny właściwości ochronnych szczepionki Suivac A aplikowanej świnom oddzielnie oraz w skojarzeniu z preparatem PA KP-40. W drugim (b) oceniono wpływ propionibakterii na przebieg doświadczalnego zakażenia świń wirusem pomoru klasycznego (CSFV).

Materiał i metody

Doświadczenie (a)

Zwierzęta

Do badań użyto 22 warchlaków rasy wielka biała polska (w. b. p.), w wieku 5 m-cy, o masie ciała (m. c.) średnio 60 kg, pochodzących z hodowli IWet. Warchlaki podzielono według

podanego poniżej schematu na 3 grupy doświadczalne (I, II, III) oraz grupę kontrolną (IV):

I — 5 świń 2-krotnie immunizowanych atenuowaną szczepionką przeciw chA równocześnie z preparatem KP-40;

II — 7 świń 2-krotnie szczepionych szczepionką atenuowaną;

III — 5 świń 2-krotnie stymulowanych preparatem KP-40;

IV — 5 świń kontrolnych.

Biopreparaty

Szczepionka. Suivac A (Biowet Puławy) — żywa atenuowana szczepionka, zawierająca liofilizowany szczep TK 904 wirusa chA, adaptowany i namnażany w hodowli komórek zarodka kurzego, o mianie TCID₅₀ wynoszącym 10^{5,5}, którą podawano warchlakom domięśniowo (i.m.) dwukrotnie, w odstępie 4 tygodni, w dawce 2 ml/zwierzę.

Propionibacterium avidum szczep KP-40. Do nieswoistej stymulacji zwierząt użyto liofilizowanych ścian komórkowych zabitych termicznie bakterii *Propionibacterium avidum* szczep KP-40, przygotowanych według metody opisanej przez Ko (13) oraz Pulverera (20), które podawano dożylnie, dwukrotnie, w odstępie 4 tygodni, w dawce 5 mg/5 ml roztworu/zwierzę.

Hodowla komórkowa

W badaniach użyto linii ciągłej komórek nerki królika RK-13, kultywowanej wg ogólnie przyjętych zasad (12) z dodatkiem 10% surowicy cielęcej (s. c.).

Szczepy wirusowe

Posługiwano się atenuowanym szczepem TK-900 wirusa chA o mianie TCID₅₀ = 10⁵/0,05 ml oraz szczepem NIA-3 wirusa chA o mianie TCID₅₀ = 5^{4,5}.

Surowice referencyjne

Jako kontrolę w odczynie SN stosowano surowicę dodatnią chA a mianie 1/512 roza surowicę ujemną, nie zawierającą przeciwciał — sn — wirusa chA.

Postępowanie

Poddane immunizacji świnie doświadczalne i kontrolne zakażano szczepem NIA-3 wirusa chA 8 tygodni po rewakcytacji. Wirus wprowadzano donosowo, po 0,5 ml do każdego otworu nosowego.

Bezpośrednio przed pierwszym szczepieniem, a następnie co 7 dni do 21 dni po zakażeniu, od wszystkich świń pobierano próbki krwi w celu oznaczenia poziomu przeciwciał neutralizujących wirus chA testem SN w odmianie mikro (12). Ponadto 24 godziny przed szczepieniem oraz przez 7 dni po pierwszym i drugim uodpornieniu, a także 1 dzień przed i przez 22 dni po zakażeniu kontrolnym rejestrowano wewnętrzną ciepłotę ciała (w. c. c.). W dniu pierwszej immunizacji oraz 7 dni po pierwszym i drugim szczepieniu, a następnie w odstępach 3-dniowych aż do 22 dnia po zakażeniu kontrolnym dokonywano pomiarów m. c. świń z poszczególnych grup.

Doświadczenie (b)

Zwierzęta

Badania wykonano przy użyciu 30 warchlaków rasy w. b. p. o m. c. około 27 kg. Zwierzęta podzielono losowo, według podanego poniżej schematu na 3 równe grupy (I, II, III):

I grupa — 10 świń stymulowanych PA KP-40

II grupa — 10 świń kontrolnych, którym podawano placebo (kontrola ujemna)

III grupa — 10 świń szczepionych 20 dawkami terenowymi Lapestu (kontrola dodatnia)

Biopreparaty

Lapest (Biowet Puławy) — liofilizowana mieszanina krwi oraz miazgi śledziony królików zakażonych uprzednio lapinizowanym — chińskim (C) szczepem wirusa pomoru świń.

Propionibacterium avidum szczep KP-40

Postępowanie

Immunizację świń Lapestem prowadzono jednorazowo; sposób uodporniania świń przedstawiono uprzednio. Preparat *Propionibacterium avidum* KP-40 podano warchlakom dwukrotnie, dootrzewnowo w dawce 5 mg/5 ml roztworu/zwierzę. Po upływie 14 dni od immunizacji wszystkie zwierzęta zakażano dawką 100.000 ID₅₀ zjadliwego szczepu Washington wirusa CSF, podając 1 ml zawiesiny wirusa i. m.

Kontrolę stopnia pobudzenia układu immunologicznego organizmu świń doświadczalnych i kontrolnych prowadzono poprzez wykonywanie następujących oznaczeń:

- 1) liczba dni od zakażenia zwierząt do wystąpienia podwyższonej $\geq 40^{\circ}\text{C}$ ciepłoty wewnętrznej
- 2) okres utrzymywania się w. c. c. $\geq 40^{\circ}\text{C}$
- 3) liczba dni od zachorowania do padnięcia świń z poszczególnych grup zwierząt.

Analiza statystyczna wyników

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej stosując test t-Studenta oraz test Tukey'a. Istotność różnic określono na poziomie $p \leq 0,05$.

Wyniki i omówienie

W doświadczeniu (a) po 1-szym i 2-gim szczepieniu szczepionką Suivac A i/lub PA KP-40 nie obserwowano u immunizowanych świń zmian miejscowych ani odchyłań w ich stanie klinicznym, a średnia grupowa w. c. c. badanych zwierząt mieściła się w granicach norm fizjologicznych (38,0—40,0). Po zakażeniu doświadczalnym u większości świń uodpornianych stwierdzono początkowo posmutnienie, zmniejszenie lub brak łaknienia, a u pojedynczych zwierząt kichanie i nieznaczny śluzowy wpływ z nosa. Najłagodniejszy kliniczny przebieg choroby obserwowano u świń grupy I. W grupie tej nie stwierdzono padnięć zwierząt. W grupach II i III choroba przybrała bardziej nasiloną postać; w grupach tych padło po jednej świni. Badaniem wirusologicznym wycinków narządów pobranych w czasie sekcji zwierząt wykazano, że przyczyną padnięć było zakażenie wirusem chA.

Zwierzęta kontrolne, nie szczepione i nie poddane stymulacji wykazywały apatię, brak łaknienia, kichanie, pierwotnie śluzowy, a następnie ropny wpływ z nosa

oraz objawy duszności. U wspomnianych zwierząt nie stwierdzono objawów nerwowych, dwa warchlaki kontrolne padły w wyniku zakażenia. Powrót do zdrowia świń kontrolnych przebiegał znacznie wolniej niż doświadczalnych. Zakażenie kontrolne doprowadziło również do mniej lub bardziej nasilonej utraty łaknienia; z pomiarów dynamiki przyrostów m. c. (tab. 1.) wynika, że najniższy średni spadek m. c. zarejestrowano w omawianym zakresie u zwierząt grupy I — wynosił on 2,37 kg, w porównaniu do wartości 8,12 kg stwierdzonej w grupie IV. W grupie II omawiany wskaźnik kształtował się na poziomie 6,8 kg; w grupie III — 4,4 kg. Różnice te były statystycznie istotne.

Z danych przedstawionych we wspomnianej tabeli wynika, że u zwierząt doświadczalnych oraz kontrolnych najwyższy spadek m. c. nastąpił w okresie do 8 dni po zakażeniu kontrolnym. Okres zahamowania m. c. wahał się od 3 do 5 dni u świń immunizowanych, u świń kontrolnych powrót do wyjściowej m. c. nastąpił dopiero w ciągu 13 dni po zakażeniu. Z omówionymi wynikami korelują dane dotyczące kształtowania się w. c. c. Okres utrzymywania się w. c. c. $\geq 40^{\circ}\text{C}$ u świń grup doświadczalnych wynosił od 0,75 (grupa I) do 5 dni (grupa III); natomiast u zwierząt kontrolnych wynosił on średnio 5,8 dnia, co stanowiło różnicę istotną statystycznie.

Oceniając wyniki badań serologicznych (tab. 2) wykazano, że najwyższą dynamikę narastania poziomu przeciwciał po pierwszym szczepieniu oraz po rewakcytacji wykazywały zwierzęta grupy I, tzn. warchlaki, którym podano Suivac A oraz PA KP-40. U świń kontrolnych oraz stymulowanych nieswoiście nie stwierdzono serokonwersji dla antygenu chA aż do 7 dnia po infekcji tym wirusem. Między 7 a 14 dniem po zakażeniu nastąpił u nich wzrost miana przeciwciał, jego średnia geometryczna nie różniła się od średniej obliczonej dla zwierząt grupy doświadczalnej II i była jedynie nieznacznie niższa od omawianego wskaźnika u warchlaków grupy I.

W tabeli 3 przedstawiono wyniki wpływu stosowania

Tab. 1. Kształtowanie się przyrostów masy ciała i ciepłoty wewnętrznej świń immunizowanych szczepionką Suivac A i/lub *Propionibacterium avidum* KP-40 oraz zakażanych kontrolnie (z.k.)

Grupa **	\bar{x} wartość m.c. 1 dzień po z.k.	\bar{x} dzienne ubytki lub przyrosty m.c. (w kg) po z.k. (dni po zakażeniu)				Najniższy ubytek m.c. (w kg) (\bar{x} w grupie)	Okres zahamowania przyrostów m.c. (\bar{x} dni)	w.c.c. $\geq 40^{\circ}\text{C}$ (\bar{x} dni)
		6	8	15	22			
I	46,25	+0,541 *	+0,328	+0,55 *	+0,573	2,37 *	2,75 *	0,75 *
II	73,0	+0,838 *	+0,500 *	+0,819 *	+0,717 *	6,87 *	3,74 *	3,4 *
III	49,3	-0,645 *	-0,406 *	+0,158 *	+0,323 *	4,37 *	4,75 *	5,0 *
IV	70,7	-0,27 *	-0,328 *	+0,15 *	+0,27 *	8,12 *	5,75 *	5,8 *

Objaśnienia: * — różnica istotna statystycznie przy $p \leq 0,05$, ** — grupa I Suivac A + KP-40, grupa II Suivac A, grupa III KP-40, grupa IV kontrola.

Tab. 2. Poziom przeciwciał (-log SN) dla wirusa choroby Aujeszkiego (chA) i wyniki zakażenia kontrolnego u świń po zastosowaniu szczepionki Suivac A i/lub *Propionibacterium avidum* KP-40

Grupa	Liczba świń	Poziom przeciwciał sn, dni po szczepieniu					Wynik zakażenia kontrolnego (liczba zwierząt zdrowych/zakażonych)	Poziom przeciwciał sn (dni po zakażeniu)		
		0	14	28	42	56		7	14	21
I	5	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,6 *	0,6 *	3/5 *	1,2 *	1,5 *	1,8 *
II	7	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3 *	< 0,3 *	2/7 *	1,2	1,5	1,5 *
III	5	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3 *	< 0,3 *	0/5 *	< 0,3 *	1,2 *	1,5 *
IV	6	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3 *	< 0,3 *	0/6 *	< 0,3 *	1,2 *	1,5 *

Objaśnienie: * — różnica istotna statystycznie przy $p \leq 0,05$.

Tab. 3. Kształtowanie się wewnętrznej ciepłoty ciała (w.c.c.) u świń immunizowanych szczepionką Lapest lub *Propionibacterium avidum* KP-40 oraz zakażanych kontrolnie zjadliwym szczepem wirusa pomoru klasycznego świń

Grupa**	Liczba zwierząt	Liczba					
		dni od zakażenia do wystąpienia w.c.c. $\geq 40^{\circ}\text{C}$		dni z w.c.c. $\geq 40^{\circ}\text{C}$		dni od zakażenia do padnięcia	
		\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
I	10	5,33 *	0,86	4,30	0,94	11,8*	1,47
II	10	3,33 *	0,91	4,16	0,69	6,33*	1,15
III	10	0	—	0	—	—	—

Objaśnienia: * różnica istotna statystycznie przy $p \leq 0,05$, ** grupa I — KP-40, grupa II — kontrola ujemna, grupa III — kontrola dodatnia.

PA KP-40 na przebieg zakażenia świń wirusem pomoru klasycznego. Jak wskazują na to przedstawione dane dwukrotna dootrzewnowa aplikacja PA KP-40 wpływa korzystnie na przebieg zakażenia kontrolnego świń wirusem pomoru, w stosunku do przebiegu infekcji u świń nie uodpornianych. Dowodem powyższego jest wyraźne wydłużenie czasu przeżywalności wszystkich świń doświadczalnych w stosunku do kontroli ujemnej. Średni okres, jaki upłynął od zakażenia do padnięcia świń był w grupie I prawie dwukrotnie dłuższy niż w grupie zwierząt kontrolnych nie uodpornianych; wynosił on 11,80 dnia w porównaniu do 6,33 dni stanowiących wartość uzyskaną w grupie II. Uzyskane różnice były istotne statystycznie. Wszystkie zwierzęta grupy III, stanowiące kontrolę dodatnią, przeżyły zakażenie zjadliwym szczepem wirusa CSF.

Nieswoista stymulacja układu odpornościowego zwierząt wpłynęła również na długość okresu czasu, jaki upłynął od momentu zakażenia świń szczepem Washington CSFV do wystąpienia podwyższonej w.c.c. $\geq 40^{\circ}\text{C}$. Zwierzęta grupy I zareagowały podwyższeniem w.c.c. $\geq 40^{\circ}\text{C}$ po upływie średnio 5,33 dnia od dnia zakażenia, podczas gdy u świń grupy II, stanowiącej kontrolę ujemną, wzrost omawianego wskaźnika stwierdzono już po upływie średnio 3,33 dnia. Świnie grupy III, szczepione Lapestem i zakażone doświadczalnie, nie zareagowały podwyższeniem w.c.c. powyżej granicy norm fizjologicznych.

Odmienne kształtował się kolejny analizowany wskaźnik, którym był okres utrzymywania się podwyższonej w.c.c. $\geq 40^{\circ}\text{C}$. U świń poddanych immunostymulacji nieswoistej, okres utrzymywania się podwyższonej w.c.c. po zakażeniu wirusem CSF był dłuższy niż u zwierząt grupy II i wynosił średnio 4,3 dnia; świnie nie uodporniane (grupa II) gorączkowały przez 4,16 dnia. Przyczyną tego była znacznie krótsza przeżywalność zwierząt omawianej grupy po zakażeniu kontrolnym, dlatego wskaźnik ten nie jest przydatny do oceny wpływu PA KP-40 na przebieg doświadczalnego zakażenia świń CSFV.

W dostępnym piśmiennictwie krajowym i zagranicznym brak jest doniesień o wykorzystaniu bakterii z rodzaju *Propionibacterium* sp. w stymulacji układu odpornościowego zwierząt w przebiegu naturalnych lub doświadczalnych infekcji wirusowych, dlatego porównanie wyników badań własnych do rezultatów uzyskiwanych przez innych autorów nie jest możliwe. Są natomiast nieliczne dane na temat zastosowania propionibakterii w przebiegu zakażeń wirusowych ludzi i myszy. Dla przykładu omawiany rodzaj bakterii znalazł natomiast zastosowanie w zwalczaniu wirusowego prze-

wlekłego aktywnego zapalenia wątroby typu B (PAZW) u ludzi (7). U chorych z PAZW leczonych przy użyciu propionibakterii obserwowano spadek aktywności transaminaz, fosfatazy zasadowej oraz obniżenie się poziomu antygenu HBsAg i HBeAg, jak również spadek aktywności DNA-polimerazy. Wykazano ponadto wzrost miana interferonu, utrzymujący się na wysokim poziomie co najmniej miesiąc po leczeniu. Po zakończeniu leczenia u pacjentów nie obserwowano cech zapalenia. Wykazano ponadto, że przestrojenie immunologiczne wywołane przez te bakterie utrzymuje się dość długi okres czasu (około 5 lat) i po zapoczątkowaniu przez nie procesu eliminacji immunologicznej antygenów wirusowych, potem proces ten następuje już siłami naturalnej odporności przeciwwirusowej ustroju.

W badaniach innych autorów (7, 14, 16, 22) wykazano, że myszy immunizowane przy pomocy propionibakterii były mniej wrażliwe na zakażenie wirusem opryszczki HSV, wirusem mysiego zapalenia wątroby MHV-3, wirusem EMC i choroby Newcastle niż zwierzęta kontrolne. Wyniki badań własnych przeprowadzonych na świnich potwierdzają w pewnym stopniu uzyskane wcześniej rezultaty u ludzi oraz u zwierząt laboratoryjnych.

Korzystne efekty skojarzonego stosowania szczepionki Suivac A i *Propionibacterium avidum* KP-40 oraz wolniejszy rozwój choroby u świń immunizowanych PA KP-40 i zakażonych wirusem pomoru klasycznego dowodzą adiuwantowych i immunostymulacyjnych właściwości wymienionego szczepu propionibakterii.

Piśmiennictwo

- Furowicz A. J., Łoczewski P., Lewandowska S., Sułkowski Z.: Mat. V Zjazdu PTI, Immunol. Pol. 11, 250, 1986.
- Furowicz A. J., Sułkowski Z., Lewandowska S., Gos Z.: Mat. V Zjazdu PTI, Immunol. Pol. 11, 251, 1986.
- Furowicz A., Broda D., Łoczewski P., Czernomysy-Furowicz D.: Medycyna Wet. 45, 30, 1989.
- Furowicz A., Gos Z., Grupiński T., Czernomysy-Furowicz D.: Medycyna Wet. 5, 289, 1989.
- Furowicz A., Czernomysy-Furowicz D., Gos Z., Grupiński D., Lewandowska S.: Nowości Wet. 2, 77, 1989.
- Furowicz A.: Przegl. hod. 8, 28, 1989.
- Gil J.: Badania doświadczalne i kliniczne nad działaniem preparatu *Propionibacterium granulosum* w zakażeniach wirusowych wątroby ze szczególnym uwzględnieniem PAZW HBsAg(+). Praca habilit. Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Warszawa, 1984.
- Gos Z., Furowicz A. J., Hejman A.: Medycyna Wet. 40, 206, 1984.
- Janiak M.: Modyfikacja nieswoistej reakcji cytotoksyczności komórkowej pod wpływem preparatu *Propionibacterium granulosum* KP-45. Praca habilit. Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Warszawa 1986.
- Janiak M., Furowicz A. J., Czernomysy-Furowicz D.: Medycyna Wet., 46, 133, 1990.
- Janiak M., Furowicz A. J., Czernomysy-Furowicz D.: Nowości Wet. 2, 73, 1990.
- Karpiński S., Lipowski A., Tereszczuk S.: Medycyna Wet. 37, 210, 1981.
- Ko H. L., Roszkowski W., Jeljaszewicz J., Pulverer G.: Med. Microbiol. Immunol. 170, 1, 1981.
- Kobus M., Luczak M., Panasiak W., Szmigielski S.: Mat. IV Kraj. Symp. Wirusol. Łódź, 1985, s. 102.
- Kotowski K.: Medycyna Wet. 47, 123, 1991.
- Kowalska M., Denys, Szydłowska T., Białek J.: Mat. IV Kraj. Symp. Wirusol. Łódź, 1985, s. 71.
- Markowska-Daniel I., Pejsak Z., Furowicz A., Czernomysy-Furowicz D., Szmigielski S., Jeljaszewicz J., Pulverer G.: Dt. tierarztl. Wschr. 98, 384, 1991.
- Markowska-Daniel I., Pejsak Z., Szmigielski S., Jeljaszewicz J., Pulverer G.: Br. vet. J. — w druku.
- Mulcahy G., Quinn P. J.: J. Pharmac. exp. Ther. 9, 119, 1986.
- Pulverer G., Ko H. L., Roszkowski K., Roszkowski W., Jeljaszewicz J.: Clin. Immun. Newslett. 6, 51, 1985.
- Switata M., Hebel T., Wernicki A., Dzmira R., Stradot P.: Medycyna Wet. 44, 239, 1988.
- Zgórniak-Nowosielska I., Jarońska K., Kryczko E.: Mat. IV Kraj. Symp. Wirusol., Łódź, 1985, s. 93.
- Zingelboim J., Berd D.: Immunology of *Corynebacterium parvum*, Pergamon Press, New York, 1985.
- Zola H.: Clin. exp. Immun. 22, 514, 1975.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Pejsak, ul. Kościuszki 12/9, 24-100 Puławy