

IWONA MARKOWSKA-DANIEL, ZYGMUNT PEJSAK

Opracowanie szczepionki przeciw rotawirusowym zakażeniom prosiąt*)

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Development of a vaccine against rotaviral infections in piglets

The aim of this study was to select swine rotavirus strains for the production of a live vaccine against rotaviral porcine diarrhoeas.

The estimation of biological properties of strains was carried out under laboratory and field conditions. Seventeen swine field rotavirus strains were used for the investigations. The *in vivo* experiments were performed on colostrum-free piglets infected *per os* or intramuscularly with individual rotaviral strains. The virulence of strains was determined on the basis of their clinical condition after infection and the duration of shedder-state for 14 days after infection. In the *in vitro* estimation of strains, molecular biology methods were used by which extracts of viral RNA were examined by the polyacrylamide gel electrophoresis technique (PAGE).

In the *in vivo* experiments a distinct difference in virulence of particular strains was demonstrated. A correlation between the virulence of particular strains was demonstrated. A correlation between the virulence of rotaviruses for colostrum-free piglets and the presence of rotaviral particles in faeces was found in electron microscopic examinations of faecal samples collected in the from infected sucklings. In some cases no viruses were detected in the faeces of infected piglets. Different electrophoretic mobility of particular genome RNA segments in examined strains was determined by electrophoresis. A rotavirus strain showing lack of virulence for colostrum-free piglets was selected for vaccine production. This strain differed considerably in the distribution of electrophoretic bands from the virulent reference OSU strain of swine rotavirus.

Choroby przewodu pokarmowego, manifestujące się objawami biegunki, są jednym z głównych problemów, który rzuca na wyniki ekonomiczne uzyskiwane w hodowli trzody chlewnej (2, 20, 21, 22). Wśród najczęściej wykrywanych patogenów, w próbach kału lub treści przewodu pokarmowego prosiąt chorujących z objawami biegunki, wymienia się *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* typ C, *Isospora suis*, rotawirusy i koronawirusy (1, 2, 8, 11, 16). Najczęściej obserwuje się u osesków jednoczesne występowanie rotawirusów i enterotoksycznych szczepów *E. coli*. Wykazano, że szcze-

gólnie ciężki przebieg infekcji ma miejsce w przypadkach, gdy rotawirus i pałeczki okrężnicy atakują makroorganizm jednocześnie lub jeden po drugim. Pojedyncze infekcje tymi samymi szczepami wymienionych drobnoustrojów przebiegają znacznie łagodniej (4, 19).

Jak już wielokrotnie wykazano (2, 4, 13, 19), w tym również w Polsce (20), rotawirusy świń występują ubikwitarne, powodując występowanie biegunek u prosiąt ssących i prosiąt w okresie odsadzeniowym. Biorąc to pod uwagę uznano za właściwe podjęcie badań zmierzających do opracowania szczepionki przeciw zakażeniom rotawirusowym u prosiąt. W ramach tych badań dokonano m.in. analizy i wyboru nie patogennych dla prosiąt bezsiarowych szczepów rotawirusa świń.

Materiał i metody

Zwierzęta. Do badań użyto 85 prosiąt bezsiarowych rasy wielka biała polska, urodzonych przez maciory nie szczepione przeciwko rotawirusowym zakażeniom świń, odchowywanych w izolatorach Państwowego Instytutu Weterynaryjnego (PIWet) w Puławach.

Szczepy wirusowe. W badaniach wykorzystano 17 izolatów terenowych rotawirusa świń, pochodzących z własnego banku szczepów oraz szczep referencyjny grupy A rotawirusów – OSU.

Hodowla komórkowa. Szczepy rotawirusa namnażano w hodowli ciągłej komórek nerki płodu małpy indonezyjskiej rodu Makak MA-104.

Przygotowanie puli szczepów rotawirusa świń w aspekcie produkcji szczepionki doświadczalnej. Każdy oceniany szczep rotawirusa świń, przechowywany we własnym banku szczepów w temperaturze -80°C , po rozmrożeniu, namnażano w hodowli komórek MA-104, które pasażowano w butelkach plastikowych o powierzchni dna 75 cm^2 , zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami. Po uzyskaniu całkowitego pokrycia dna butelki, komórki pasażowano w stosunku 1:3 lub 1:4 co 48–72 godz. Jako podłoża wzrostowego używano płynu Eagle'a z solami Earle'a zawierającego 10%–15% surowicy płodowej bydłowej, trypsynę krystaliczną (typ IX) w ilości $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ oraz antybiotyki (gentamycyna $50\text{ }\mu\text{g/ml}$). W składzie podłoża utrzymującego nie było surowicy, natomiast zawarty był dodatek trypsyny w tym samym stężeniu końcowym. Do trypsynizacji komórek stosowano trypsyno-wersen (0,02% werseniu i 0,05% trypsyny).

Ocena właściwości biologicznych szczepów rotawirusa świń *in vivo*. Selekcji szczepów rotawirusa świń *in vivo* dokonywano przy użyciu prosiąt nie pobierających siary. Po namnożeniu i wystandaryzowaniu minimalnej dawki zakaźnej, jeden z kolejno ocenianych szczepów rotawirusa podawano 5 prosiątom *per os* w dawce 2 ml/zwierzę. Obserwację kliniczną zakażonych zwierząt prowadzono przez 14 dni po infekcji, zwracając uwagę na stan ogólny prosiąt, w.c.c. oraz zaburzenia czynności przewodu pokarmowego w postaci biegunki.

Oceny zjadliwości szczepów, poza obserwacją kliniczną prosiąt po zakażeniu, dokonywano na podstawie badań laboratoryjnych.

*) Praca została wykonana w ramach realizacji projektu PL-AES-236 finansowanego przez II Polsko-Amerykański Fundusz im. M. Skłodowicz-Curie

Dla oceny siewstwa rotawirusów w kale zainfekowanych zwierząt wykonywano badanie elektronomikroskopowe (EM). Próbkę kału do badań pobierano 2, 4, 7 i 14 dni po zakażeniu prosiąt. Przygotowywano 30% zawiesinę kału w buforowanym roztworze soli (PBS), którą wirowano przez 15–20 minut (1500–2000 obr./min.) (obr./min.). Uzyskany po odwirowaniu supernatant sączono przez sączki membranowe o średnicy porów 0,45 μm . Zawiesiny rotawirusów наносono pipetką pasterowską na siateczkę, używaną jako szkiełko podstawowe w mikroskopii elektronowej, pokrytą błoną z 0,5% roztworu butvar B-98 (Electron Microscopy of Science) w chloroformie. Nadmiar zawiesiny odciągano bibułą filtracyjną a następnie nakraplano 2% molibdenian amonu i niesuszoną siateczkę wprowadzano do kolumny mikroskopu (Tesla BS-500). Preparaty oceniano stosując powiększenie 44 000–60 000 \times . Mikrofotografie wykonywano na błonach Agfa Scientia 23D56.

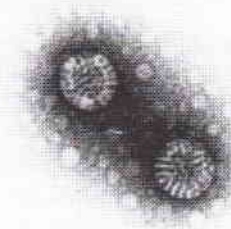
Podstawową metodą wykrywania i określania przynależności grupowej ocenianych szczepów rotawirusowych była elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (PAGE). W tym celu hodowle komórkowe zakażano poszczególnymi szczepami rotawirusa świń. Zbiór wirusów dokonywano, gdy obserwowano wyraźny charakterystyczny efekt cytopatyczny (cpe), poprzez 3-krotne zamrożenie i rozmrożenie hodowli. Supernatant z hodowli komórek zawierający zawiesinę wirusa klarowano wirowaniem stosując 3000 obr./min. przez 15 minut i zagęszczano przy pomocy 20% glikolu polietylenowego w 2,5 M NaCl. Precypitację materiału wirusowego przeprowadzano w temperaturze 4°C w okresie 12 godzin. Agregaty wirusa osadzano wirowaniem stosując 12 000 obr./min. przez 30 minut. Peletkę wirusa poddawano lizie w 1% SDS i 0,1 M octanie sodu i ekstrahowano równą objętością fenolu. Fazę wodną precypitowano 95% etanolem w obecności 3 M octanu sodu przez noc i wirowano stosując 14 000 obr./min. przez 30 minut. Peletkę RNA zawieszano w wodzie redestylowanej i określano ilość kwasu nukleinowego spektrofotometrycznie, przy długości fali 260 nm. Ruchliwość elektroforetyczną poszczególnych segmentów genomowego RNA rotawirusów odnoszono do elektroferogramu ds. RNA wyekstrahowanego z wzorcowego szczepu OSU (3). Próbkę kwasu nukleinowego, otrzymane w wyniku ekstrakcji chemicznej, obciążone roztworem bromofenolu rozdzielano w 10% PAGE w 1X TBE, bez dodatku SDS, przez 15 godzin, przy 10 mA. Żele wybarwiano solami srebra przy użyciu zestawu firmy Amersham lub bromkiem etydyny.

Przygotowanie szczepionki. Do namnażania szczepu rotawirusa, wybranego do przygotowania szczepionki doświadczalnej, użyto wyrośniętej, 1–2 dniowej hodowli komórek MA-104 kultywowanej w warunkach hodowli obrotowej. Po określeniu, przy pomocy testów ELISA, immunofluorescencji bezpośredniej (IF) i izolacji wirusa, miana TCID₅₀ wybranego do produkcji szczepionki szczepu, hodowlę inkubowano zawiesiną tego wirusa w ilości 1 TCID₅₀/1 komórkę. W celu odsłonięcia białek powierzchniowych rotawirusa przeprowadzano wstępną inkubację wirusa z trypsyną krystaliczną (typ IX) w ilości 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ w stężeniu końcowym, przez 30–60 min. w temperaturze 37°C bezpośrednio przed zakażeniem komórek (18). Do butelki rollerowej typu NBS á 250 ml wprowadzano 10 ml zawiesiny wirusa. Inokulum dla jednej butelki NBS stanowił namnożony uprzednio wirus o mianie TCID₅₀ co najmniej 10⁵. Po 18–24 godz. inkubacji, kiedy efekt cytopatyczny (cpe) osiągał wartość 80–90%, dokonywano zbioru wirusa. W tym celu zawartość butelek zamrażano i rozmrażano 3-krotnie, odwirowywano resztki komórkowe przy 5000 obr./min. w ciągu 30 min., a powstały supernatant, po stwierdzeniu jałowości i określeniu jego miana, zamrażano w temperaturze -80°C. W zależności od wysokości miana szczepu produkcyjnego uzyskaną hodowlę wirusa rozcieńczano tak, aby miano przed liofilizacją wynosiło co najmniej 10³ TCID₅₀. Po odpowiednim rozcieńczeniu antygen szczepionkowy mieszano w stosunku 2:1 z osłaniającym laktoalbuminowym i liofilizowano. Objętość jednej tere-

nowej dawki szczepionki ustalono na 5 ml; winna ona zawierać co najmniej 10^{4,5} TCID₅₀ szczepu szczepionkowego.

Wyniki i omówienie

Po doustnym zakażeniu prosiąt poszczególnymi szczepami rotawirusa świń u większości (71) infekowanych zwierząt wykazano zaburzenia stanu ogólnego o różnym stopniu nasilenia. Średnia grupowa w.c.c. zakażanych prosiąt w okresie 14 dni po infekcji wahała się w zależności od użytego szczepu w granicach 38,5–41,7°C. Prosięta, u których stwierdzono podwyższenie w.c.c. do 40,5°C wykazywały apatię, brak apetytu, zmiany w zachowaniu manifestujące się odchodzeniem od pozostałych prosiąt w miecie oraz zaburzenia czynności przewodu pokarmowego w postaci intensywnej biegunki. Po kilkunastu godzinach występowały u wspomnianych zwierząt objawy odwodnienia organizmu. Dwa szczepy IWet 15 oraz IWet 16 nie doprowadziły do wystąpienia biegunki u żadnego z 10 zainfekowanych prosiąt.

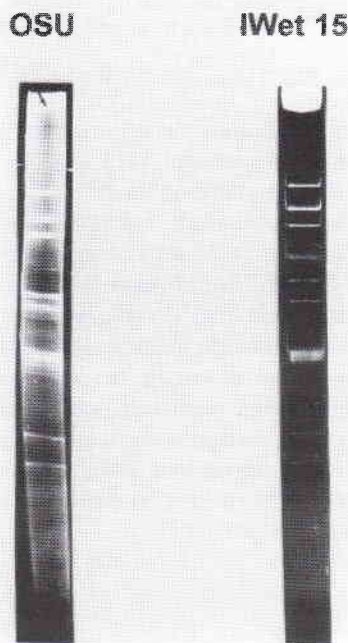


Ryc. 1. Elektronograf szczepu IWet 15 rotawirusa – widoczne wiriony jednowarstwowe o charakterystycznej morfologii (pow. 44 000 \times , barwienie negatywowe molibdenianem amonu)

W badaniu elektronomikroskopowym prób kału pobranego od zakażonych prosiąt uzyskano zróżnicowany obraz; widoczne były 2 formy kapsydów rotawirusa – kompletne, dwuwarstwowe cząsteczki wirionów, wielkości około 70 nm i pojedyncze cząstki niepełne z brakującą warstwą zewnętrzną, wielkości 60 nm. Dwadzieścia prób uzyskanych od prosiąt zakażonych czterema różnymi szczepami rotawirusa było negatywnych. Na uwagę zasługuje fakt, że zaobserwowano korelację pomiędzy zjadliwością rotawirusów dla prosiąt bezsiarowych i występowaniem u nich biegunki. Nie wykazano obecności wirusa w kale prosiąt infekowanych szczepami IWet 15 i IWet 16.

Za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym uzyskano elektroferogramy świadczące o obecności rotawirusów w większości badanych prób kału z wyjątkiem tych, które uzyskano od prosiąt infekowanych szczepami IWet 15 i IWet 16. Uzyskane profile elektroforetyczne składały się z 11 segmentów, ułożonych charakterystycznie dla rotawirusów należących do grupy A. Ruchliwość elektroforetyczna poszczególnych segmentów genomowego RNA badanych szczepów różniła się w sposób wyraźny od rozkładu prążków elektroforetycznych szczepu OSU.

Na podstawie wyników badań przeprowadzonych na prosiątach oraz badań laboratoryjnych za prototyp szczepu szczepionkowego uznano izolat terenowy rotawirusa IWet 15, który nie był patogenny dla prosiąt bezsiarowych, cechował się zdolnością do namnażania w hodowli komórkowej, brakiem



Ryc. 2. Elektroferogramy dsRNA rotawirusów – OSU i IWET 15 (elektroforeza w żelu poliakrylamidowym, barwienie bromkiem etydy)

siewstwa w kale oraz zdecydowanie różnym profilem elektroforetycznym od zjadliwego szczepu referencyjnego.

Rotawirusy posiadają genom zbudowany z 11 segmentów dwuniciowego kwasu rybonukleinowego dsRNA (3). Zewnętrzna warstwa dojrzałego kapsydu utworzona jest głównie z białek VP4 i VP7, na których obecne są epitopy neutralizujące, natomiast dominującym elementem struktury rdzenia jest białko VP6 (14, 17). Uwaga badaczy jest skupiona na tych trzech białkach strukturalnych wirionu i kodujących je segmentach genomu, ponieważ stanowią one kryteria oceny zasadniczych cech wirusa – zjadliwości i jego właściwości immunogennych. Większość przeciwciał neutralizujących indukowanych w organizmie infekcją lub immunizacją reaguje z determinantami na glikoproteinie VP7, co spowodowane jest jej wysoką immunogennością oraz masą, glikoproteina ta tworzy 30% wszystkich białek wirusa (6, 7, 13). Determinanty antygenowe zlokalizowane na VP4 również są immunogenne i indukują odporność ochronną u zwierząt, a stymulowane przez nie przeciwciała neutralizują wirus *in vitro* oraz biernie chronią przeciw zakażeniu heterologicznym szczepem rotawirusa *in vivo* (5, 6, 10, 12). Oprócz struktury pierwszorzędowej, wpływ na aktywność immunologiczną białek antygenowych rotawirusów ma ich budowa przestrzenna oraz wzajemne oddziaływania białek i struktur kapsydu (9, 15).

Jak wskazują dane piśmiennictwa, na świecie produkowanych jest szereg szczepionek (Ambico, SolcoEnterit 2, SolcoEnterit 3) przeznaczonych do profilaktyki swoistej zakażeń rotawirusowych u prosiąt. Wytwarzane biopreparaty zawierają w swoim składzie żywe szczepy rotawirusów cechujące się brakiem zjadliwości dla prosiąt. Ze względów oczywistych brak jest szczegółowych danych odnośnie zasad selekcji szczepów rotawirusowych do produkcji szczepionek. Poza nieszkodliwością, charakteryzują się one na pewno zdolnością indukowania odporności miejscowej i ogólnej przeciw zakażeniom rotawirusowym.

Celem dalszych badań będzie ustalenie wartości ochronnej szczepionki własnej oraz ewentualne porównanie jej z innymi – odpowiednimi biopreparatami.

Piśmiennictwo

1. Benfield D., Francis D., McAdaragh J., Johnson D., Bergeland M., Rossow K., Moore R.: Am. J. vet. Res. 49, 330, 1988.
2. Bohl E., Kohler E., Saif L., Cross R., Agnes A., Theil K.: J. Am. vet. med. Assoc. 172, 458, 1978.
3. Bohl E., Theil K., Saif L.: J. Clin. Microbiol. 19, 105, 1984.
4. Bridger J. C.: Pig news and information 9, 23, 1988.
5. Chen D., Estes M. K., Ramig R. F.: J. Virol. 66, 432, 1992.
6. Estes M. K., Cohen J.: Microbiol. Rev. 53, 410, 1989.
7. Estes M. K.: Rotaviruses and their replication, w: Virology, Second Edition, Raven Press Ltd. New York 1990, rozdz. 48.
8. Fitzgerald G. R., Barker T., Welter M. W., Welter C. J.: Vet. Med. 88, 80, 1988.
9. Greenberg H., Valdesuso J., van Wyke K., Midhun K., Walsh M., McAuliffe V., Wyatt R. G., Kalica A. R., Flores J., Hoshino Y.: J. Virol. 47, 267, 1983.
10. Huang J., Nagesha H. S., Holmes J. H.: Virology 196, 319, 1993.
11. Janke B., Morehouse L., Solorzano R.: Single and mixed infections of neonatal pigs with Rotaviruses and Enteroviruses: Virological studies. Can. J. Vet. Res., 52, 360–363, 1988.
12. Kang S. Y., Benfield D. A., Gorziglia M., Saif L. J.: J. Clin. Microbiol. 31, 2291, 1993.
13. Kapikian A. Z., Chanock R. M.: Rotaviruses, w: Virology, Second Edition, Raven Press Ltd. New York 1990, rozdz. 49.
14. Mackow E. R., Shaw R. D., Matsui S. M., Vo P. T., Benfield D. A., Greenberg H. E.: Virology 165, 511, 1988.
15. Nagesha H. S., Brown L. E., Holmes J. H.: J. Virol. 63, 3545, 1989.
16. Pospishil A., Gussetti F.: Pig News 10, 337, 1989.
17. Taniguchi K., Hoshino Y., Nishikawa K., Green K. Y., Maloy W. L., Morita Y., Urasawa S., Kapikian A. Z., Chanock R. M., Gorziglia M.: J. Virol. 62, 1870, 1988.
18. Theil K. W., Bohl E. H., Agnes A. G.: Am. J. Vet. Res. 38, 1765, 1977.
19. Tzipori S., Chandler D., Makin T., Smith M.: Aust. vet. J. 56, 279, 1980.
20. Winiarczyk S.: Zastosowanie metod biologii molekularnej w diagnostyce zakażeń rotawirusowych u świń. Praca hab. AR Lublin, 1995.
21. Wood G., Crouch C.: Am. J. Vet. Med. Ass. 173, 522, 1978.
22. Wood G.: Porcine rotavirus infection, w: Diseases of swine. Leman A., Straw B., Glock R., Mengeling W., Penny R., Scholl E., Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, s. 368, 1986.

Adres autora: dr Iwona Markowska-Daniel, ul. Norwida 3/15, 24-100 Puławy

NELSON K. M., DARIEN B. J., KONKLE D. M., HARTMANN F. A.: Posocznica na tle *Actinobacillus suis* u dwóch źrebiąt. (*Actinobacillus suis* septicaemia in two foals). Vet. Rec. 138, 39–40, 1996 (2)

Posocznica jest częstą przyczyną padnięć nowo narodzonych źrebiąt. Usposabia do jej wystąpienia zaburzenie przekazywania odporności z matki na potomstwo. Czynnikiem etiologicznym jest najczęściej *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Actinobacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Staphylococcus* i *Streptococcus*. U źrebięcia w wieku 24 godzin wystąpiła depresja, zaburzenie ssania, osłabienie, zaostrzenie szmerów nad płucami. Natomiast u drugiego źrebięcia w wieku 48 godzin, u którego pobieranie pokarmu nie było zaburzone, wystąpiła ostra biegunka prowadząca do osłabienia. Poziom surowiczych IgG u obydwu źrebiąt wynosił około 800 mg/dl. Jednakże występowała ostra neutrofilia z przesunięciem obrazu krwi w lewo. Z krwi wyizolowano w czystej hodowli *Actinobacillus suis*. Jeden izolat był w pełni wrażliwy na amikacynę, ampicylinę, cefazolinę, ceftiofur, cefalotynę, chloramfenikol, cyprofloksacynę, klawamox, gentamycynę, penicylinę G, tetracyklinę i TMP+ sulfadiazynę. Natomiast drugi izolat *A. suis* był oporny na amikacynę, penicylinę G, słabo wrażliwy na ceftiofur, gentamycynę, tetracyklinę i tobramycynę.