

MAGDALENA ZALESKA, KRZYSZTOF ANUSZ, JERZY KITA

Testy HI, ELISA, SRH i odporności komórkowej w ocenie szczepień przeciw grypie koni*)

Katedra Epizootiologii z Kliniką Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego SGGW, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Summary

HI, ELISA, SRH and cellular immunity tests in evaluating immunization against equine influenza

A study group of six horses was immunized twice (day 0 and 29 of the experimental) with an inactivated vaccine (Solvay-Duphar, the Netherlands). The control group was formed of six unvaccinated horses. Blood for hematological examinations, cellular immune responses, specific humoral immunity (HI, ELISA, SRH) was collected on days 0, 14, 29, 43, 63, 131, 138 and 182 of the experiment. A viral challenge of 3 vaccinated and 3 nonvaccinated horses was made on day 131. One of the animals from each of these two groups was challenged intranasally with viral subtype A1 (Prague/56), another with A2 (Miami/63) and the third with A2 (Suffolk/89).

It is worth noting that 14 days after first vaccination a statistically significant increase of the lymphocyte stimulation index for the A2 subtype was observed in vaccinated horses. At the same time the percentage of rod neutrophils was also significantly elevated in the same group. This was not found in nonvaccinated horses at the same time, but it was observed in that group of animals after viral challenge. The leukocyte migration inhibition index was significantly higher for the A2 subtype in vaccinated horses during the whole experiment. It was not found for the A1 subtype.

A statistically significant increase of the specific antibody titres was observed in vaccinated horses after the second vaccination (HI, ELISA, SRH). It was also determined after the challenge in vaccinated and nonvaccinated horses, but only in the SRH test. A total correlation (regression) between ELISA and SRH tests was observed before the viral challenge. Attempts to reisolate the virus from nasal cavities of the horses were unsuccessful.

Zwalczanie grypy (influenzy) koni polega na szczepieniu koni zagrożonych zakażeniem (1, 2, 12, 19). Wiadomo, że antygeny powierzchniowe obydwu podtypów wirusa grypy – H3N8 (A-equi/1) i H7N7 (A-equi/2) nie reagują krzyżowo w reakcjach serologicznych *in vitro* ani nie wywołują krzyżowej odporności (10, 16, 17, 18). Dlatego też wszystkie inaktywowane szczepionki przeciw grypie koni zawierają antygeny obydwu podtypów wi-

rusa. Ponadto szczepionki te często łączone są z innymi antygenami, w tym także z anatoksyną tężcową (1, 2, 19).

Pierwszą szczepionkę przeciw grypie koni opracowano w 1965 r. w USA (16). W tym czasie zalecano dwukrotne szczepienie koni w odstępie 4-6 tygodni, a potem coroczne doszczepianie. Obserwacje terenowe wskazywały, że systematyczne szczepienie chroniło przed zakażeniem podtypem A1, natomiast dawało niepełną ochronę przed zakażeniem podtypem A2 wirusa. Świadomość, że szczepionka inaktywowana daje krótką odporność, spowodowała, że przez pewien czas w USA szczepiono konie co 30-60 dni. Podjęto wtedy badania nad immunogennością szczepionki, adjuwantami, programem szczepień oraz zmiennością antygenową wirusa. Między innymi wykazano, że ta sama dawka wirusa podtypu A1, w porównaniu z podtypem A2, stymuluje powstawanie niższego miana przeciwciał, określanego testem zahamowania hemaglutynacji (HI). Dopiero rozbicie cząsteczek wirusa pozwoliło na uzyskanie podobnych mian w teście HI dla obydwu podtypów (9), co udowodniło, że przyczyną była odmienna struktura badanych wirusów. W ostatnich latach do oceny wartości szczepionki i odporności humoralnej tworzącej się po szczepieniu wprowadzono test pojedynczej radialnej hemolizy – SRH, który okazał się bardziej miarodajny i nie wymagający rozbijania wirusa. Wykazano również, że dynamika kształtowania się miana przeciwciał po szczepieniu może być bardzo dokładnie określana testem ELISA (11).

W dalszych doświadczeniach stwierdzono, że immunogenność szczepionki zależy od zawartości w niej mikrogramów hemaglutyniny (HA), co określa się testem pojedynczej radialnej immunodyfuzji – SRD. Dostateczna zawartość wynosi 1-5 µg (13). Tak więc, standaryzację szczepionki oparto na tym teście, a poziom przeciwciał u koni określa się najczęściej testem SRH. Do oceny szczepionki wprowadzono także doświadczałne zakażenie, początkowo metodą donosową, a następnie aerozoliową.

Dotychczasowe badania dostarczają dowodów, że istnieje korelacja pomiędzy poziomem przeciwciał typu HA, a stopniem ochrony. Rouse i Ditchfield (14) wykazali przeciwciała neutralizujące w śluzie nosa przeciw podtypowi A2 wirusa, po dwukrotnym szczepieniu domięśniowym szczepionką inaktywowaną. Tym niemniej przyjmuje się, że szczepionki inaktywowane chronią głównie poprzez stymulowanie wytwarzania wysokiego miana przeciwciał typu HA, określanego w surowicy. Przyjęto, że miana od 1:8 do 1:128 są wystarczające do zapewnienia ochrony przed zakażeniem (4, 5, 6, 14, 15).

*) Praca wykonana w ramach grantu KBN 5 P06K 008 10

W ostatnim czasie szereg autorów wskazuje na znaczną rolę mechanizmów odporności komórkowej w zabezpieczeniu koni przed zakażeniem wirusem grypy (1, 8, 11). Zaleska i wsp. (19) sugerują wprowadzenie oceny odporności komórkowej zarówno w początkowym okresie podejmowania akcji profilaktyki swoistej, jak również w okresie późniejszym, w trakcie regularnie prowadzonego doszczepiania.

Celem badań było sprawdzenie korelacji (regresji) wyników testów odporności humoralnej (HI, ELISA, SRH) oraz poznanie dynamiki kształtowania się wybranych parametrów odporności komórkowej po immunizacji przeciw grypie koni.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 12 jednorocznych koniach pełnej krwi angielskiej. Grupę badaną stanowiło 6 koni, które zaszczepiono dwukrotnie (0 i 29 dzień doświadczenia) szczepionką Duvaxyn IE-T Plus (Solvay Duphar, Holandia). 6 koni nieszczepionych stanowiło grupę kontrolną. Użyta w doświadczeniu inaktywowana szczepionka z wodorotlenkiem glinu, zawiera antygeny trzech szczepów wirusa grypy – A equi 1/Praga 56, A equi 2/Miami 63 i A equi 2/Suffolk 89 oraz anatoksynę tężcową.

Krew do badań hematologicznych (liczby leukocytów i erytrocytów, odsetki limfocytów i granulocytów obojętnochnych, hematokryt), odporności komórkowej i humoralnej pobrano siedmiokrotnie w 0, 14, 29, 43, 62, 131, 138, 182 dniu doświadczenia.

W 131 dniu doświadczenia dokonano doświadczonego donosowego zakażenia (po 1,5 ml do jamy nosowej) 3 koni szczepionych i 3 nieszczepionych, kolejno po jednym z każdej z tych grup odpowiednio wirusem A1/Praga 56 (miano wirusa – $10^{2,7}$ TCID₅₀/ml), A2/Miami 63 (miano wirusa – $10^{2,1}$ TCID₅₀/ml) i A2/Suffolk 89 (miano wirusa – $10^{2,2}$ TCID₅₀/ml). Namnażanie obydwu podtypów wirusa przed doświadczonego zakażeniem oraz próby reizolacji w 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dniu po zakażeniu z wymazów z jam nosowych, prowadzono na zarodkach kurzych (19). W tych dniach prowadzono również obserwacje kliniczne i pomiary temperatury ciała.

Do oceny odporności komórkowej zastosowano test swoistej (inkorporacja ³H tymidyny o aktywności 40 Mbq/ml, Chempol, Praga, Czechy) transformacji blastycznej limfocytów, w którym, jako stymulatora tych komórek w hodowlach zastosowano antygen A1 (w rozcieńczeniu 1:800) i antygen A2 (w rozcieńczeniu 1:700), zgodnie z wynikiem wcześniejszej standaryzacji (19). Limfocyty izolowano z krwi w gradiencie Gradisolu L (Polfa, Kutno, Polska) o gęstości $1,077 \pm 0,001$ g/cm³. Do badania radioaktywności użyto licznika scyntylicyjnego promieniowania B. Aktywność immunologiczną limfocytów określano poprzez wyliczanie indeksów stymulacji tych komórek.

Do oceny aktywności immunologicznej leukocytów zastosowano test hamowania migracji, w którym użyto antygenów A1 i A2 wirusa grypy w stężeniach 20 µg/ml (19).

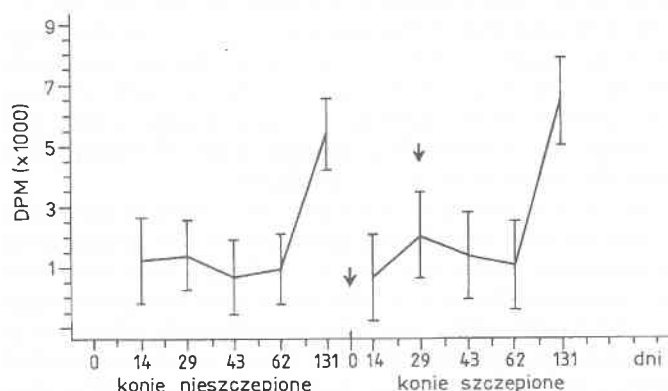
Kontrolę swoistej odporności humoralnej prowadzono testami HI, ELISA i SRH (2, 3). Poziom przeciwić w surowicach określano w teście HI oddzielnie dla podtypów A1 i A2 wirusa, w teście ELISA dla mieszaniny antygenów obydwu podtypów, w teście SRH dla podtypu A2 (Suffolk 89).

Średnie wartości badanych parametrów u koni szczepionych niezakażonych i zakażonych i nieszczepionych zakażonych i niezakażonych porównywano testem dwukrotnej analizy wariancji (ANOVA). Również tym testem analizowano istotność zmian wartości badanych parametrów w przebiegu doświadczenia u koni obydwu grup doświadczonego.

Wzajemne związki między wynikami testów HI, ELISA i SRH uzyskanymi przed doświadczonego zakażeniem koni, określano przy pomocy regresji liniowej i korelacji, zarówno u koni szczepionych, jak i nieszczepionych.

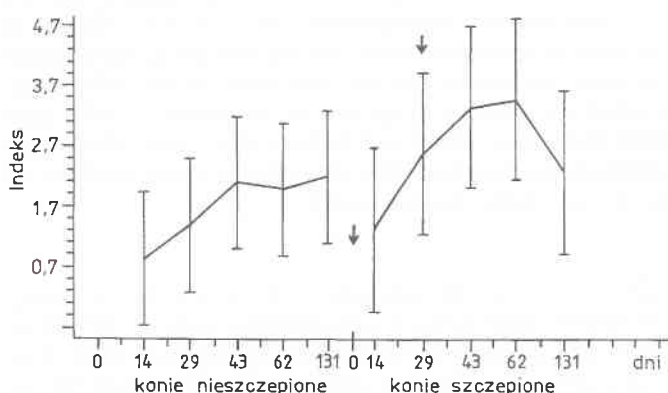
Wyniki i omówienie

W 29 dniu doświadczenia, w dniu drugiego szczepienia, u koni szczepionych wykazano istotny wzrost stymulacji limfocytów w hodowlach stymulowanych antygenami wirusa grypy podtypu A2, jak również istotny wzrost indeksów stymulacji tych komórek ($p \leq 0,04$) (ryc. 1, 2). Zaleska i wsp. (19), stwierdzili wzrost indeksów stymulacji limfocytów stymulowanych mieszaniną antygenów wirusów grypy podtypów A1 i A2 już 17 dni po pierwszym szczepieniu koni szczepionką Equigrip (Rhône-Mérieux, Francja). Szczepionka ta zawiera antygeny obydwu podtypów wirusa grypy, nie zawiera zaś anatoksyny tężcowej. Autorzy ci wykazali również wzrost indeksów stymulacji limfocytów zarówno u koni szczepionych, jak i nieszczepionych 6 dni po doświadczonego zakażeniu. Nie stwierdzono tego w powyższych badaniach. Obserwowano natomiast wzrost indeksu stymulacji w dniu doświadczonego zakażenia (131 dzień doświadczenia) koni szczepionych i nieszczepionych (ryc. 1). Nieznany jest czynnik, który spowodował wzrost tego parametru.



Ryc. 1. Średnie wartości pobudzenia limfocytów koni szczepionych i nieszczepionych (DPM) w hodowlach stymulowanych antygenami wirusa grypy A2 przed zakażeniem

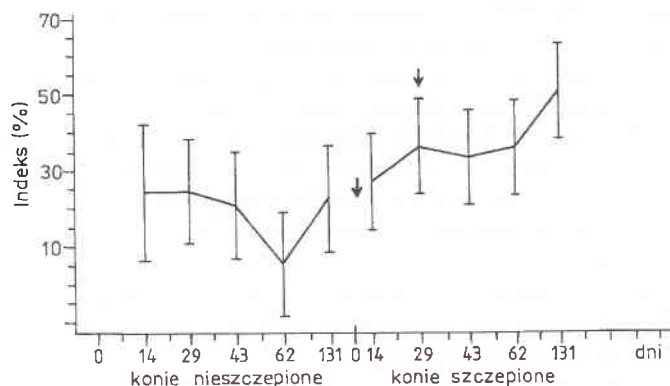
Objaśnienia: ! – szczepienie, * – zakażenie



Ryc. 2. Średnie wartości indeksów stymulacji limfocytów antygenami wirusa grypy A2 u koni szczepionych i nieszczepionych przed zakażeniem

Objaśnienie:

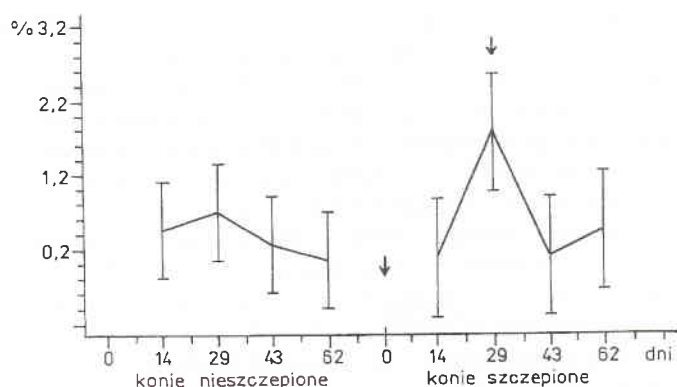
$$\text{indeks stymulacji} = \frac{\text{liczba DPM hodowli stymulowanej}}{\text{liczba DPM hodowli niestymulowanej}}$$



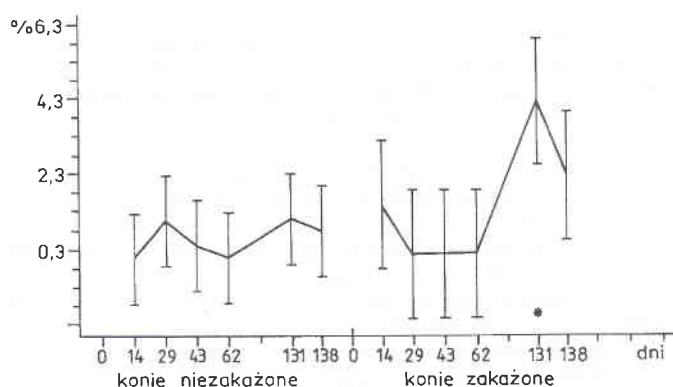
Ryc. 3. Średnie wartości indeksów hamowania migracji leukocytów przez antygeny wirusa grypy A2 u koni szczepionych i nieszczepionych przed zakażeniem

Objaśnienie:

$$\text{indeks migracji leukocytów} = 1 - \frac{\text{średnia strefa migracji z antygenem}}{\text{średnia strefa migracji bez antygeny}} \times 100$$



Ryc. 4. Średnie wartości odsetków granulocytów obojętnochłonnych pałeczkowatych u koni szczepionych i nieszczepionych przed zakażeniem

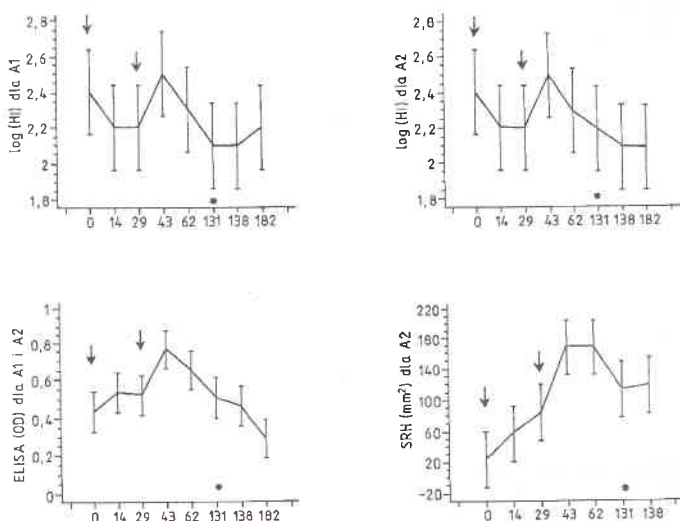


Ryc. 5. Średnie wartości odsetków granulocytów obojętnochłonnych pałeczkowatych u koni nieszczepionych

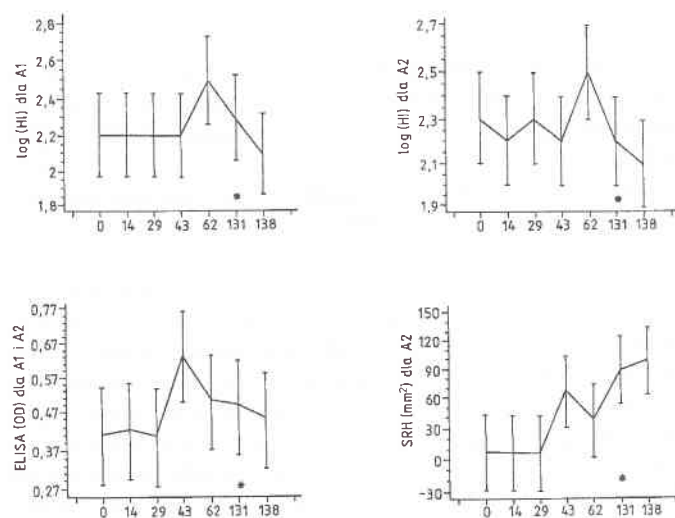
Średnie wartości indeksu hamowania migracji leukocytów przez antygeny wirusa grypy podtypu A2 były istotnie wyższe u koni szczepionych niż nieszczepionych ($p \leq 0,01$) (ryc. 3). Średnie wartości tego parametru, ale w odniesieniu do antygenów wirusa podtypu A1, były jednakowe w przebiegu doświadczenia u koni szczepionych i nieszczepionych. Zakażenie doświadczalne nie spowodowało zmian średnich wartości in-

deksów hamowania migracji leukocytów w odniesieniu do antygenów obydwu podtypów wirusa grypy. Zaleska i wsp. (19) zastosowali do oceny aktywności immunologicznej leukocytów test hamowania migracji, w którym użyto mieszaniny antygenów podtypów A1 i A2 wirusa grypy. Autorzy wykazali jedynie zarówno u koni szczepionych, jak i nieszczepionych istotne różnice średnich wartości indeksów hamowania migracji leukocytów uzależnione od okresu doświadczenia, co wynikało z nieznacznego spadku wartości tego parametru po doświadczalnym zakażeniu wirusowym.

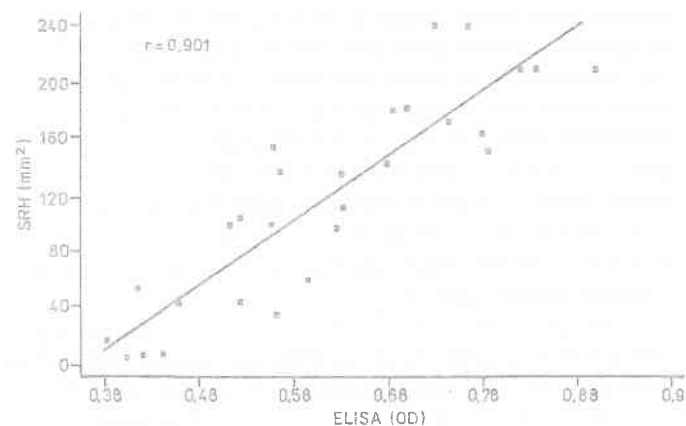
29 dni po pierwszym szczepieniu, w dniu drugiego szczepienia u koni szczepionych stwierdzono istotnie wyższy odsetek granulocytów obojętnochłonnych pałeczkowatych niż u koni nieszczepionych ($p \leq 0,02$) (ryc. 4). Natomiast u koni nieszczepionych istotny wzrost odsetka tych komórek nastąpił dopiero po doświadczalnym zakażeniu (ryc. 5) (porównanie z końmi nieszczepionymi i niezakażonymi). Po zakażeniu nie stwierdzono wzrostu odsetków granulocytów obojętnochłonnych pałeczkowatych u koni uprzednio szczepionych (porównanie z poprzednim pomiarem). W przebiegu doświadczenia nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic średnich war-



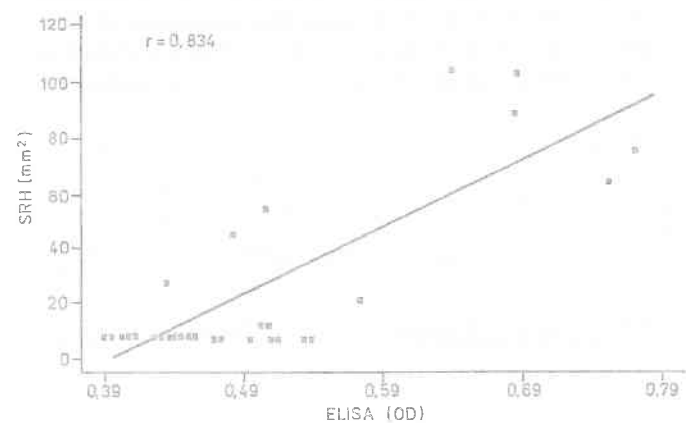
Ryc. 6. Średnie wartości mian przeciwciał przeciwko wirusowi grypy oznaczane testami HI, ELISA i SRH u koni szczepionych



Ryc. 7. Średnie wartości mian przeciwciał przeciwko wirusowi grypy koni oznaczane testami HI, ELISA i SRH u koni nieszczepionych



Ryc. 8. Regresja między testami SRH i ELISA u koni szczepionych przed ich zakażeniem wirusem grypy



Ryc. 9. Regresja między testami SRH i ELISA u koni nieszczepionych przed ich zakażeniem wirusem grypy

tości innych parametrów badań hematologicznych u koni szczepionych i nieszczepionych.

Badania odporności humoralnej testami HI, ELISA i SRH wykazywały istotny wzrost mian przeciwciał u koni szczepionych dopiero po drugim szczepieniu, w 43 dniu doświadczenia (ryc. 6). Wzrost miana przeciwciał po doświadczeniu wykazał zarówno u koni uprzednio szczepionych, jak i nieszczepionych, jedynie test SRH (ryc. 6, 7).

Do momentu doświadczonego zakażenia (131 dzień doświadczenia) stwierdzono całkowitą zgodność (regresję) kształtowania się mian przeciwciał w testach ELISA i SRH u koni szczepionych i nieszczepionych (ryc. 8, 9) (regresja $r=0,901$ przy maksymalnej wartości $r=1,0$) i niepełną zgodność wyników tych testów z wynikami testu HI. U koni nieszczepionych w 43 dniu doświadczenia obserwowano wzrost mian przeciwciał określanych testami ELISA i SRH. W teście HI nie stwierdzano w tym dniu wzrostu miana przeciwciał przeciw podtypowi A1 wirusa grypy, bądź obserwowano spadek miana przeciw podtypowi A2 tego wirusa. W 43 dniu doświadczenia u koni szczepionych wszystkie testy wykazywały wzrost miana przeciwciał. Pomimo to, że porównywano wyniki testów swoistej odporności humoralnej, które wykrywały w surowicach koni przeciwciała jedynie przeciwko podtypowi A2 wirusa

grypy (HI, SRH) lub jedynie przeciwko podtypowi A1 (HI) lub przeciwko mieszaninie podtypów A1 i A2 wirusa (ELISA) to wydaje się, że nie wpłynęło to w znaczący sposób na wiarygodność opisu regresji między nimi.

W kolejnych dniach po zakażeniu (132, 133, 134, 135, 136, 137 i 138 dzień doświadczenia) nie obserwowano istotnych różnic w kształtowaniu się średnich temperatur ciała u koni uprzednio szczepionych i nieszczepionych. Wartości wahały się między $37,1^{\circ}\text{C}$ a $38,2^{\circ}\text{C}$. Żaden z koni nie wykazywał objawów charakterystycznych dla ostrego przebiegu grypy. Prowadzone w tych dniach próby reizolacji obydwu podtypów wirusa grypy nie dały rezultatu.

Podsumowując można stwierdzić, że badania potwierdziły ważną rolę mechanizmów odporności komórkowej w ochronie koni przed zakażeniem wirusem grypy. Są one szczególnie ważne w początkowym okresie szczepień (po pierwszym szczepieniu), kiedy nie stwierdza się jeszcze statystycznie istotnego wzrostu mian przeciwciał swoistych w surowicach koni szczepionych. Wydaje się, że oprócz limfocytów również granulocyty obojętnochłonne są populacją komórek immunokompetentnych, od której uzależniona jest pierwotna odpowiedź immunologiczna na kontakt z antygenami wirusa grypy. Takiej roli nie odgrywają one już po ponownym kontakcie z tymi antygenami. Można jednak przypuszczać, że rodzaj komórek immunokompetentnych oraz intensywność ich pobudzenia po szczepieniu szczepionką inaktywowaną zależą w pewnym stopniu od użytego preparatu np. może na to wpływać dodatek anatoksyny tężcowej.

Podejmując badania odporności humoralnej poszczepiennej należałoby uzależniać rodzaj stosowanego testu (HI, ELISA, SRH) od tego, czy chcemy badać dynamikę kształtowania się mian przeciwciał w czasie – wtedy wskazane jest użycie testu SRH lub ELISA (nieco czulszy jest test SRH), czy też jedynie chcemy stwierdzić obecność przeciwciał w surowicach koni – w tej sytuacji można zastosować testy HI, ELISA i SRH.

Piśmiennictwo

1. Baczyński Z., Skulmowska-Kryszkowska D., Żmudziński J.: Medycyna Wet. 35, 42, 1979.
2. Baczyński Z., Skulmowska-Kryszkowska D.: Medycyna Wet. 41, 320, 1986.
3. Becht H., Malde B.: Med. Microb. Immunol. 162, 43, 1975.
4. Bryans J. T., Doll E. R., Wilson J. C.: J. Am. vet. med. Ass. 48, 413, 1966.
5. Burrows R., Denyer H., Gadridge D., Hamilton F.: Vet. Rec. 109, 353, 1981.
6. Burrows R., Denyer M.: Arch. Viral. 73, 15, 1982.
7. Gerencer M., Palpotic I., Jukic B., Tomaskovic M., Basic I.: Arch. Virol. 104, 249, 1989.
8. Hannant D., Mumford J. A.: Vet. Immunol. Immunopathol. 21, 327, 1989.
9. Kemen M.: Cornell Vet. 75, 277, 1985.
10. Kita J.: Medycyna Wet. 49, 500, 1993.
11. Kita J., Anusz K., Zaleska M., Lis M.: Życie Wet. 9, 302, 1995.
12. Kita J.: Medycyna Wet. 52, 359, 1996.
13. Mumford J. A., Wood J. M., Folkers C., Shild G. C.: Epidemiol. Infect. 100, 501, 1988.
14. Rouse B. T., Ditchfield W. J. B.: Can. J. comp. Med. 34, 7, 1970.
15. Thompson G. R., Mumford J. A., Sporer P., Burrows R., Powell D. G.: Vet. Rec. 100, 465, 1977.
16. Woyciechowska S., Kita J., Brzosko W.: Exp. Med. Microb. 24, 1, 1972.
17. Woyciechowska S., Kita J.: Medycyna Wet. 28, 76, 1972.
18. Woyciechowska S., Kita J.: Medycyna Wet. 28, 133, 1972.
19. Zaleska M., Anusz K., Kita J.: Medycyna Wet. 51, 90, 1995.

Adres autora: lek. wet. Magdalena Zaleska, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa