

Możliwości i ograniczenia profilaktyki swoistej grypy świń

IWONA MARKOWSKA-DANIEL, ANDRZEJ KOWALCZYK

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

Markowska-Daniel I., Kowalczyk A.

Possibilities and limitations of swine influenza prophylaxis

Summary

The aim of the paper was the presentation of the newest information regarding abilities to prevent swine influenza using conventional vaccines and technologically advanced preparations obtained by using genetic engineering.

In the 90s most swine influenza isolates were closely related to human influenza virus and therefore the vaccine based on human virus type A, subtype H3N2, was widely used. Due to its subsequently decreased efficacy, resulting from antigenic drift and shift as well as the occurrence of new reassortants, a new generation of preparations was elaborated. Induction of natural protection against influenza virus is correlated with non-mutation-dependant antibodies, therefore the use of genes coding conserve proteins for immunoprophylaxis was tested. The use of protein NS1 as a differentiation marker between naturally exposed and vaccinated animals, as well as protein NP as an antigen inducing effective cell-mediated and humoral immunological response were suggested. Much attention was given to the selection of gene carriers like plasmid vectors and recombinant viruses; the mechanism of cross-immunoprotection between SIV subtypes; and the adjuvant function.

Currently we have no commercially available new generation vaccine that would be able to guarantee spectacular results of immunization for pig breeders, but we have to underline that pilot studies on animals models have as a goal the development of effective tools for the protection of humans against influenza.

Keywords: swine influenza

Po raz pierwszy wirus grypy świń (swine influenza virus – SIV) został wyizolowany od zwierząt chorujących z objawami zaburzeń ze strony układu oddechowego przez Richarda Shope'a w 1918 r. (21). Na podstawie charakterystyki serologicznej szczepów wirusa grypy izolowanych w tym czasie od ludzi i wykazanego ich bliskiego pokrewieństwa z pochodzącym od świń szczepem A/swine/Iowa/15/30, o wzorze antygenowym H1N1, określanym jako klasyczny podtyp wirusa grypy świń (classical swine influenza virus), Shope postawił hipotezę, że był on odpowiedzialny za wybuch pandemii grypy zwanej hiszpanką. Teoria ta została później potwierdzona przez wyniki analizy sekwencji nukleotydowej omawianych drobnoustrojów (10).

Analizy filogenetyczne wirusów grypy, jak również serologiczne badania diagnostyczne czy stosowane do oceny immunogenności szczepionek opierają się na budowie białek hemaglutyniny (H) i neuraminidazy (N). W populacji człowieka oraz świń występują najczęściej szczepy posiadające H typu 1 i 3 oraz N typu 1 i 2 (2).

Pochodzenie szczepów SIV występujących na świecie

Szczep klasyczny grypy świń H1N1 utrzymywał się na kontynencie północnoamerykańskim przez wiele lat, po czym w 1970 r. został zawleczony do Europy (głównie Włoch) i Azji (19). Pod koniec lat 70. stopniowo ustąpił miejsca ptasiej odmianie wirusa grypy (avian like) o tym samym podtypie, który rozpowszechnił się i utrwalił wśród europejskich świń (4). Równoległe do populacji trzody chlewnej został wprowadzony ludzki szczep wirusa grypy o wzorze H3N2, odpowiedzialny za epidemię grypy ludzi w 1968 r. Spowodował on masowe zachorowania świń w Czechosłowacji w 1975 r. (24), we Włoszech w 1980 r. (17), w Belgii (11) oraz Francji (1) w 1984 r., jak również w Wielkiej Brytanii w 1987 r. (27). W połowie lat 80. wśród izolatów SIV pojawiły się dwa reasortanty: H3N2 oraz H1N2. Pierwszy z nich występował w dwóch postaciach: reasortanta podwójnego oraz potrójnego. Podwójny reasortant powstał w wyniku wymieszania się genów

ludzkiego szczepu H3N2 oraz klasycznego świńskiego szczepu H1N1, zaś potrójny reasortant zawierał dodatkowo geny pochodzące z ptasiej odmiany wirusa (4). Z kolei szczep o wzorze H1N2 był nowym podtypem posiadającym gen H najbardziej zbliżony do ludzkiego wirusa H1N1 krążącego w latach 80. oraz gen N wykazujący pokrewieństwo z genem N szczepu występującego u ludzi (human-like) H3N2 (2). W Wielkiej Brytanii wykazano obecność szczepu H1N2 będącego wielokrotnym reasortantem, który powodował zachorowania świń na dużą skalę, krążąc daleko poza pierwotnym miejscem jego izolacji. Omawiany skok antygenowy jest typem mutacji występującym rzadko, ale powodującym poważne utrudnienia zarówno w diagnostyce, szczególnie serologicznej, jak i w immunoprofilaktyce.

Najczęściej występujący mechanizm zmienności polegający na pojedynczych mutacjach w genomie wirusa grypy w znacznie mniejszym stopniu wpływa na słabą ochronę obserwowaną po szczepieniu niż ma to miejsce w przypadku skoku antygenowego (2). Przykładem tego procesu może być nieznaczne zróżnicowanie szczepów SIV wyizolowanych w Holandii w latach 1995-1996, mające ścisły związek z miejscem izolacji wirusa (4). Nie stwierdzono natomiast rozbieżności między izolatami z dwóch następujących po sobie epizodów choroby w obrębie tej samej fermy. Przyjęto więc, że nowe „mikro-warianty” mogą rezydować w populacji stada przez kilka sezonów, powodując corocznie zachorowania zwierząt.

Szczepienia tradycyjne

Wśród scharakteryzowanych antygenowo izolatów SIV pochodzących z Europy, zgromadzonych w latach 1977-1995, większość wykazywała bliskie pokrewieństwo ze szczepami ludzkimi pochodzącymi z lat 1972-1979. Wskazuje to na wprowadzenie wirusa grypy z populacji ludzi do populacji trzody chlewnej na początku lat 70. Z tego powodu ludzki szczep wirusa grypy typu A, podtypu H3N2, stanowił szczepionkę stosowaną w profilaktyce grypy świń aż do końca lat dziewięćdziesiątych (5). Okazało się jednak, że izolaty pochodzące z przypadków grypy świń w Holandii począwszy od 1993 r. nie reagowały krzyżowo z surowicą przeciwko ludzkiej odmianie szczepu H3N2, co potwierdza, że niska efektywność szczepień mogła być spowodowana niedostosowaniem antygeny szczepionkowego do bieżącej sytuacji epizootycznej. Porównano także szczepy H3N2 izolowane od ludzi i świń w tym czasie na obszarze Holandii i Belgii. Okazało się, że uplasowały się one na odrębnej gałęzi powiązań filogenetycznych (5). Uznano więc, że przyczyną wspomnianych zachorowań świń był inny wirus H3N2, który dostał się do populacji trzody chlewnej, niż szczep zbliżony do stanowiącego szczepionkę. Przeprowadzone badania serologiczne wykazały reaktywność izolatów holenderskich skolekcjonowanych po 1993 r. z przeciwciałami dla odmiany świńskiej H3N2. Na tej podstawie de Jong i wsp. (5) odrzucili koncepcję wprowadzenia ludzkiego szczepu H3N2 do populacji świń na początku lat 90. Wyniki te wyraźnie kontrastowały z opisanymi przez

Donatelli i wsp. (6) badaniami przeprowadzonymi w 1995 r. we Włoszech, w których wykazano reaktywność izolatów SIV z surowicą posiadającą przeciwciała dla ludzkiej odmiany szczepu H3N2. Przedstawione rozbieżności mogły wynikać z różnego pochodzenia geograficznego szczepów SIV. Rozpatrując przyczyny nieskuteczności szczepień świń w krajach Beneluksu szczepionką zawierającą komponenty wirusa ludzkiego, postawiono dwie hipotezy. Według pierwszej brak reakcji krzyżowych w teście HI oraz oddzielny filogenetycznie podklaster izolatów świńskich w stosunku do szczepów ludzkich był spowodowany niezależnym dryftem nowego typu H3N2. Druga wskazywała na zmianę w budowie podstawników w łańcuchu aminokwasowym hemaglutyniny w pozycji 144, polegającą na glikozylacji. Zaznaczono jednak, że tego rodzaju zmiana nie wpływa na przebieg reakcji immunologicznej w sposób równoważny jak w przypadku substytucji aminokwasowej (5).

Znanym zjawiskiem jest indukcja wysokiego poziomu przeciwciał w następstwie szczepień homologicznych i słabsza ochrona oraz odpowiedź po szczepieniach heterologicznych (22). W celu prześledzenia występowania oraz mechanizmów immunoprotekcji krzyżowej między różnymi podtypami SIV, a szczególnie wobec nowego reasortanta H1N2, przeprowadzono szereg doświadczeń. Między innymi Van Reeth i wsp. (20) immunizowali zdrowe, seronegatywne świny szczepami H1N1, H1N2 oraz H3N2 w następujących 5 kombinacjach: oddzielnie każdym z trzech wariantów wirusa, podając równocześnie atenuowane szczepy H1N1 i H3N2 lub aplikując konwencjonalną szczepionkę zawierającą komponenty szczepów H1N1 oraz H3N2 z 1976 r. Po zakażeniu kontrolnym wszystkich osobników szczepem H1N2 wyizolowanym w 1998 r. stwierdzono wysokie miano przeciwciał w grupach szczepionych szczepami homologicznymi, słabą indukcję przeciwciał (2 osobniki na 9) w grupie immunizowanej H1N1 oraz H3N2 w sposób skojarzony, natomiast komercyjny biopreparat nie zapewniał ochrony. Prawdopodobnie było to spowodowane różnicami w sekwencji aminokwasowej białka H, bowiem 39 miejsc było odmiennych w genie H w podtypie H1N1 i H1N2. Brak ochrony immunologicznej ze strony szczepionki komercyjnej wskazuje jednoznacznie, że mutacje zachodzące w budowie hemaglutyniny mają znaczący wpływ na efektywność szczepień, potwierdzając tym samym konieczność okresowej aktualizacji składu biopreparatów stosowanych w zapobieganiu grypie świń.

W badaniach na myszach stwierdzono, że zakażenie kontrolne wirusem grypy analogicznym do zastosowanego w szczepionce nie wywołuje żadnych objawów klinicznych, a obecności wirusa nie wykrywa się w drogach oddechowych po upływie jednego dnia od zakażenia. Z kolei zakażenie szczepem heterologicznym wydłuża okres siewstwa z jednego dnia do pięciu, jednocześnie zwiększając proliferację i różnicowanie limfocytów T cytotoksycznych (28).

Naukowcy z Uniwersytetu w Ames (14) po podaniu prosiętom wirusa heterologicznego w stosunku do prze-

ciwiał obecnych w siarze macior zaobserwowali wzmożone objawy zapalenia płuc, będące prawdopodobnie konsekwencją interferencji i zmiany kierunku proliferacji limfocytów pomocniczych Th1 na Th2. Wzmocniona proliferacja Th2 hamuje tworzenie subpopulacji Th1 oraz wzmacnia wydzielanie interleukiny (IL) 4 i 10. W takim przypadku przeciwciała siarowe nie są w stanie wzbudzić szybkiej odpowiedzi komórkowej związanej z Th1 i doprowadzić do usunięcia wirusa z ustroju.

Szczepionki genetyczne i rekombinowane

Brak w pełni skutecznej ochrony przed zakażeniem wirusem grypy po zastosowaniu szczepionek konwencjonalnych zrodził potrzebę podjęcia badań zmierzających do opracowania nowoczesnych preparatów opartych m.in. na wykorzystaniu kwasów nukleinowych. Rozwój badań w tym kierunku uzasadniony był także koniecznością znalezienia alternatywnej metody immunizacji, pozwalającej uniknąć ryzyka wynikającego z wprowadzania całego wirusa, jego mutacji podczas pasażu w procesie produkcji czy objawów ubocznych będących konsekwencją alergizacji przez białka jaj kurzych, nadal powszechnie wykorzystywanych do produkcji antygeny szczepionkowego. Większość badań w tym zakresie koncentruje się na wykorzystaniu plazmidów DNA zawierających geny kodujące antygeny powierzchniowe H oraz N, wprowadzanych domięśniowo (i.m.), dożylnie, donosowo (i.n.) lub śródskórnio, najczęściej przy użyciu tzw. pistoletu genowego (gene gun) (9). Ponieważ wprowadzony materiał jest poddawany ekspresji *de novo* w komórkach, jego produkt jest ekspozycyjny przez receptory MHC klasy I i II, czego rezultatem jest stymulowanie zarówno odpowiedzi komórkowej, jak i humoralnej.

Zdania badaczy na temat skuteczności szczepionek DNA bazujących na genie H są podzielone. Dla przykładu: Ulmer i wsp. (25) sugerują brak znaczącej ochrony immunologicznej u świń po wstrzyknięciu DNA z genem H. Z kolei Larsen i wsp. (15) odnotowali wzrost poziomu przeciwciał po szczepieniu szczepionką genetyczną z genem H i dodatkowej immunizacji szczepionką tradycyjną.

Tian i wsp. z Instytutu Weterynarii w Harbin w Chinach (23) postanowili zwrócić uwagę na rodzaj wektora, pozostawiając wysoce zmienny gen H jako antygen szczepionkowy. W swoich badaniach wykorzystali wirus choroby Aujeszky'ego (PRV), w którym zastąpili nieistotne fragmenty repetytywne genem H wyciętym z izolatu podtypu H3N2 z 2001 r., pochodzącego od świni wykazującej objawy grypopodobne. Dzięki temu cząstka zakaźna nie straciła funkcji replikacyjnych *in vivo* oraz *in vitro*, nabywając zredukowaną wirulencję. Immunizacji poddano myszy podając jednej grupie zwierząt doświadczalnych i.n. wirusa transgenicznego, drugiej wyjściowy szczep PRV, a trzeciej grupie *placebo*. Dwadzieścia osiem dni później zwierzęta poddano zakażeniu kontrolnemu szczepem H3N2, z którego pochodził gen H. Przeciwciała anti-SIV wykryto wyłącznie w grupie myszy szczepionych transgenicznym PRV-H, przy czym ich poziom podnosił się do 6 tygodni po za-

każeniu. Badania histopatologiczne wykazały u nich brak typowych, związanych z zakażeniem SIV, zmian w obrębie układu oddechowego. U pozostałych zwierząt przeciwciała na minimalnym poziomie wykryto dopiero po 6 tygodniach. Na podstawie uzyskanych wyników Tian i wsp. uznali, że rekombinat PRV-H jest w stanie zapewnić ochronę myszy zakażonych SIV, indukując przede wszystkim odpowiedź typu komórkowego.

Kompleksowe badania w tym zakresie przeprowadzili także Macklin i wsp. (16). Dokonali oni oceny immunogenności oraz wartości ochronnej szczepionki DNA zawierającej plazmid niosący gen H lub gen nukleoproteiny (NP), opłaszczone na cząsteczkach złota, które aplikowali w 6 miejsc na skórze lub do językowo (celem penetracji do układu immunologicznego błon śluzowych). Porównali ponadto skuteczność szczepionek genetycznych z biopreparatem komercyjnym, zawierającym inaktywowane cząstki całego wirusa oraz z poziomem odporności nabytej po przechorowaniu grypy. Immunizowane jednorazowo lub dwukrotnie w odstępie 4 tygodni warchlaki poddano zakażeniu kontrolnemu szczepem H1N1 SIV, podanym i.n. 2 tygodnie po powtórnej immunizacji. Stwierdzono, że jednorazowa immunizacja konstrukcjami genetycznymi nie była wystarczająca do indukcji przeciwciał dla wirusa grypy na wykrywalnym poziomie. Wyższe miano przeciwciał zarejestrowano po dwukrotnej aplikacji antygeny szczepionkowego do układu immunologicznego błon śluzowych. Z kolei miano przeciwciał aglutynujących było wyższe u zwierząt immunizowanych śródskórnio. Najwyższy poziom odpowiedzi humoralnej stwierdzono u zwierząt immunizowanych szczepionką komercyjną. Zwierzęta zakażone naturalnie produkowały przeciwciała 3 tygodnie po zakażeniu, a poziom odpowiedzi immunologicznej był zbliżony do grup immunizowanych preparatami zawierającymi gen H. Oceniając wartość ochronną testowanych szczepionek brano pod uwagę miano wirusa w wydzielinie z nosa oraz czas trwania siewstwa. Szczepienie konstruktem zawierającym gen NP nie wpłynęło zasadniczo na ograniczenie amplifikacji wirusa. Zwierzęta immunizowane genem H także nie były w pełni chronione przed infekcją, ale siewstwo wirusa utrzymywało się o 2 dni krócej niż w grupie kontrolnej, a jego miano w grupie szczepionej językowo było istotnie niższe dzień po zakażeniu niż po immunizacji śródskórnej. Szczepionka komercyjna, pomimo indukcji najwyższego poziomu przeciwciał, zapewniła najniższy poziom ochrony na zakażenie kontrolne spośród wszystkich ocenianych biopreparatów. Jedynie przechorowanie infekcji dawało kompletną ochronę przed powtórny zakażeniem kontrolnym SIV. W związku z uzyskaniem wysokiego poziomu genowo specyficznej odpowiedzi humoralnej i wymiernego ograniczenia amplifikacji wirusa, autorzy tej pracy pokładają duże nadzieje w opracowaniu w pełni skutecznych szczepionek genetycznych przeciwko grypie ludzi.

Grupa naukowców amerykańskich (26) podjęła badania nad wykorzystaniem rekombinowanego adenowirusa 5 (ADV5) jako wektora cząsteczek RNA wirusa

grypy. Stworzono trzy konstrukty zawierające: gen H, NP oraz obydwie geny, pochodzące ze szczepu H3N2 powodującego kliniczne przypadki grypy świń w Ameryce Północnej. Podawano je i.m. prosiętom po odsadzeniu. Wesley i wsp. (26) zarejestrowali wysokie miano przeciwciał u osobników szczepionych ADV5 z genem H oraz z kombinacją dwóch genów, począwszy od drugiego tygodnia po immunizacji. Zwierzęta szczepione preparatem zawierającym obydwie geny były całkowicie chronione przed zakażeniem, co wyrażało się brakiem objawów grypy po zakażeniu doświadczalnym oraz zmian patologicznych w płucach 1 tydzień po infekcji, nie wykrywano u nich również obecności wirusa w wymazach z nosa. U świń szczepionych wektorem z samym genem H miano wirusa kształtowało się na niskim poziomie. Z kolei grupa zwierząt immunizowana wyłącznie genem NP oraz grupa kontrolna nie wytworzyły odpowiedzi humoralnej do 5. tygodnia po immunizacji. Typowe dla grypy zmiany histopatologiczne w tkance płucnej zarejestrowano wyłącznie u zwierząt kontrolnych. Na tej podstawie za istotny czynnik determinujący skuteczną ochronę przeciwko wirusowi grypy uznano kombinację dwóch insertów H oraz NP. Autorzy ci uważają, że zaletą opracowanej przez nich szczepionki jest brak interferencji antygeny szczepionkowego z przeciwciałami siarowymi, które mogą blokować efekty immunizacji młodych prosiąt szczepionkami tradycyjnymi. Wyniki tych badań korespondują z zaprezentowanymi wcześniej rezultatami prac Macklina i wsp. (16).

Liczne zachorowania powodowane w ostatnich latach przez wysoce patogenne szczepy wirusa grypy ptasiej podtypu H5N1 skłoniły do badań nad możliwością wykorzystania rekombinantów ADV z konserwatywnym genem NP tego szczepu. Epstein i wsp. (7) zaobserwowali, że immunizacja myszy ADV z genem NP wyraźnie zwiększała odpowiedź humoralną oraz wydzielanie IFN- γ i TNF- α , a także limfocytów T CD4+ oraz CD8+ w stosunku do zwierząt szczepionych wyłącznie plazmidem z genem NP. Taka immunizacja dawała efektywną ochronę przeciwko 200-krotnie większej dawce wirusa H1N1 użytej do challenge, która dla myszy kontrolnych okazała się letalna. W przypadku zakażenia wysoce patogennym szczepem H5N1 myszy immunizowane plazmidem z genem NP utraciły mniej masy ciała w stosunku do grupy kontrolnej, a 50% z nich przeżyło challenge, podczas gdy wszystkie myszy kontrolne padły po zakażeniu. Wykazano również wyraźnie niższe miano wirusa w płucach myszy z grupy doświadczalnej. Uznano, że wektor adenowirusowy wpływa korzystnie na podwyższenie skuteczności szczepionki, stymulując zarówno odpowiedź humoralną, jak i komórkową oraz hamując replikację wirusa. Badania te potwierdziły również przydatność preparatów opartych na konserwatywnych fragmentach genomu wirusa grypy oraz większą wydajność i skuteczność rekombinantów w porównaniu do iniekcji plazmidowego DNA (8).

Wytworzenie naturalnej ochrony przeciwko wirusowi grypy typu A jest skorelowane z obecnością przeciwciał, które w dużej mierze nie byłyby związane ze

zmiennością antygenową (12). Głównym zadaniem takich szczepień byłaby indukcja odpowiedzi immunologicznej w stosunku do bardziej konserwatywnych białek lub epitopów, stąd podjęto badania zmierzające do określenia właściwości immunogennych białek wewnętrznych SIV, w tym: niestrukturalnego (NS1 i NS2), NP oraz matrix (M1). Kim i wsp. (13) wykorzystali dwie grupy warchlaków: pierwszą stanowiły zwierzęta zakażane i.n. izolatami H1N1 i H3N2, natomiast drugą warchlaki szczepione i.m. szczepionką komercyjną opartą na komponentach tych samych podtypów wirusa. Odpowiedź immunologiczna wobec białek NP i M1 była w grupie pierwszej zbliżona w odniesieniu do obydwu podtypów wirusa. Obecność IgM oraz IgG rejestrowano już 7. dnia po zakażeniu wobec białek NP, a także NS1 i NS2. IgM utrzymywały się u wielu świń, a IgG u wszystkich zwierząt do 28. dnia po zakażeniu. Żadne ze zwierząt nie wytworzyło natomiast przeciwciał klasy IgM anty M1, zaś przeciwciała klasy IgG wykryto 14 dni po infekcji. Dla porównania, w grupie składającej się ze świń szczepionych rejestrowano słabą odpowiedź na białka NP i M1 oraz całkowity brak odpowiedzi na białko NS. Podobne obserwacje poczyniono wcześniej śledząc odpowiedź immunologiczną przeciwko wirusowi grypy koni (18). Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano aby białko NS1 wykorzystać jako marker różnicujący zwierzęta naturalnie ekspozowane na działanie wirusa od zwierząt szczepionych, natomiast ze względu na znaczny konserwatyzm w budowie aminokwasowej i zdolność do wczesnej indukcji przeciwciał, za najlepszy antygen szczepionkowy uznano białko NP.

Heinen i wsp. (12) opracowali wektor bazujący na korowej części wirusa żółtaczkowy typu B (HeB), na którym opłaszczyli zewnątrzotoczkowy fragment białka M2 oraz gen NP (szczepionka HeB-M2-NP). Dołączenie genu NP było podyktowane dodatkową indukcją proliferacji cytotoksycznych limfocytów T. Oba inserty: białkowy i DNA pochodziły ze szczepu H3N2 A/Sw/Oederoode/96, wyizolowanego od chorej świni w tym samym roku. Do badań wykorzystano 10-tygodniowe warchlaki, które immunizowano 3-krotnie w odstępach 3-tygodniowych. Grupa I otrzymała i.m. wektor posiadający jedynie białko M2, grupa II otrzymała i.m. ten sam konstrukt z dodatkiem adiuwantu, świnię grupy III immunizowano śródskórnie szczepionką zawierającą obydwie inserty, natomiast zwierzęta z grupy IV stanowiły kontrolę. Cztery tygodnie po ostatnim szczepieniu zwierzęta poddano zakażeniu kontrolnemu szczepem H1N1. Rejestrowano wysoki poziom przeciwciał przeciwko białku M, a w grupie III dodatkowo wirusowo specyficzną odpowiedź proliferacyjną ze strony limfocytów T. Pomimo potencjalnie szerokiego spektrum działania skonstruowanej szczepionki nie stwierdzono jej skuteczności, bowiem nie zabezpieczyła ona żadnej ze świń przed zakażeniem kontrolnym. Zaobserwowano natomiast większe nasilenie objawów chorobowych u świń szczepionych w porównaniu z grupą kontrolną, a współczynnik śmiertelności w grupie III wynosił aż 50%. Także szczepienie konstruktem z samym białkiem M2,

w odróżnieniu od odporności, jaką uzyskały immunizowane porównawczo myszy, nie zapewniło świniom ochrony przed zakażeniem, aczkolwiek objawy kliniczne grypy były znacznie łagodniejsze w porównaniu do świń kontrolnych czy zwierząt z grupy III. Nie wyjaśniono jednoznacznie tego zjawiska, przypuszczalnie limfocyty Th nasiliły proces zapalny. Brak protekcji mógł również wynikać z niezgodności podtypów szczepu szczepionkowego oraz użytego do zakażenia. Podobne zjawisko rejestrowano w przebiegu zakażenia wirusem gorączki Denga, gdzie obserwowano nasilenie objawów chorobowych przez heterotypowe przeciwciała nieneutralizujące (12).

Prowadząc badania nad szczepionkami przeciwko grypie, ukierunkowanymi na stymulację mechanizmów odpornościowych błon śluzowych, de Filette i wsp. (3) zwrócili uwagę na dobór bezpiecznego i skutecznego adjuwantu. W tym celu do rekombinowanej szczepionki opartej na genie M2 wklonowanym do wirusa zapalenia wątroby typu B jako adjuwant zastosowali enzymatycznie aktywną podjednostkę toksyny pałeczki cholery połączonej z genem kodującym fragment proteiny *A Staphylococcus aureus*, która wiąże się z receptorem dla IgG. Okazało się, że donosowa aplikacja szczepionki dała stuprocentową ochronę zakażonych kontrolnie myszy, u których rozwinęła się zarówno odpowiedź humoralna, jak i odpowiedź ze strony limfocytów Th1. Z kolei podanie dootrzewnowe preparatu powodowało wprawdzie wzrost miana przeciwciał, ale nie redukowało współczynnika śmiertelności.

Podsumowanie

Pomimo wielu wysiłków, na razie brak jest komercyjnego biopreparatu nowej generacji, który mógłby zagwarantować hodowcom trzody chlewnej spektakularne efekty immunizacji, co powoduje, że szczepienia przeciwko grypie świń nie są powszechnie stosowane. Należy pamiętać, że badania prowadzone na modelach zwierzęcych mają charakter eksperymentalny, a ich zasadniczym celem jest opracowanie skutecznych metod ochrony ludzi przeciwko grypie. W związku z dynamicznym rozwojem technik molekularnych, być może, w niedalekiej przyszłości cel ten zostanie osiągnięty. Biorąc pod uwagę postępującą ewolucję wirusa zaleca się stały monitoring aktualnie krążących szczepów w celu oceny zgodności antygenów zawartych w szczepionce ze szczepami występującymi na danym obszarze geograficznym.

Piśmiennictwo

1. Aymard M., Gourreau J. M., Kaiser C., Fontaine M., Madec F., Tillon J. P.: Immunovirologic markers of the risk of influenza A H3N2 among swine. *Rev. Epidemiol. Sante Publ.* 1985, 33, 283-291.
2. Brown H. I.: The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet. Microbiol.* 2000, 74, 29-46.
3. de Filette M., Ramne A., Birkett A., Lycke N., Lowenadler B., Min Jou W., Saelens X., Fiers W.: The universal influenza vaccine M2e-HBc administered intranasally in combination with the adjuvant CTA1-DD provides complete protection. *Vaccine* 2006, 24, 544-551.
4. de Jong J. C., Heinen P. P., Loeffen W. L., van Nieuwstadt A. P., Claas E. C., Bestebroer T. M., Bijlsma K., Verweij C., Osterhaus A. D., Rimmelzwaan G. F., Fouchier R. A., Kimman T. G.: Antigenic and molecular heterogeneity in recent swine influenza A (H1N1) virus isolates with possible implications for vaccination policy. *Vaccine* 2001, 19, 4452-4464.

5. de Jong J. C., van Nieuwstadt A. P., Kimman T. G., Loeffen W. L., Bestebroer T. M., Bijlsma K., Verweij C., Osterhaus A. D., Claas E. C.: Antigenic drift in swine influenza H3 haemagglutinins with implications for vaccination policy. *Vaccine* 1999, 17, 1321-1328.
6. Donatelli I., Campitelli L., Di Trani L., Puzelli S., Selli L., Fioretti A., Alexander D. J., Tollis M., Krauss S., Webster R. G.: Characterization of H5N2 influenza viruses from Italian poultry. *J. Gen. Virol.* 2001, 82, 623-630.
7. Epstein S. L., Kong W. P., Misplon J. A., Lo C. Y., Tumpey T. M., Xu L., Nabel G. J.: Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. *Vaccine* 2005, 23, 5404-5410.
8. Epstein S. L., Stack A., Misplon J. A., Lo C. Y., Mostowski H., Bemmink J.: Vaccination with DNA encoding internal proteins of influenza virus does not require CD8+ CTL: either CD4+ or CD8+ T cells can promote survival and recovery after challenge. *Int. Immunol.* 2000, 12, 91-101.
9. Eriksson E., Yao F., Svensjo T., Winkler T., Slama J., Macklin M. D., Andree C., McGregor M., Hinshaw V., Swain W. F.: In vivo gene transfer to skin and wound by microseeding. *J. Surg. Res.* 1998, 78, 85-91.
10. Fanning T. G., Slemons R. D., Reid A. H., Janczewski T. A., Dean J., Taubenberger J. K.: 1917 avian influenza virus sequences suggest that the 1918 pandemic virus did not acquire its hemagglutinin directly from birds. *J. Virol.* 2002, 76, 7860-7862.
11. Haesebrouck F., Pensaert M.: Influenza in swine in Belgium (1969-1986): epizootologic aspects. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1988, 11, 215-222.
12. Heinen P. P., Rijsewijk F. A., de Boer-Luijze E. A., Bianchi A. T.: Vaccination of pigs with a DNA construct expressing an influenza virus M2-nucleoprotein fusion protein exacerbates disease after challenge with influenza A virus. *J. Gen. Virol.* 2002, 83, 1851-1859.
13. Kim W. I., Wu W. H., Janke B., Yoon K. J.: Characterization of the humoral immune response of experimentally infected and vaccinated pigs to swine influenza viral proteins. *Arch. Virol.* 2006, 151, 23-36.
14. Kitikoon P., Nilubol D., Erickson B. J., Janke B. H., Hoover T. C., Sornsen S. A., Thacker E. L.: The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006, 112, 117-128.
15. Larsen D. L., Karasin A., Olsen C. W.: Immunization of pigs against influenza virus infection by DNA vaccine priming followed by killed-virus vaccine boosting. *Vaccine* 2001, 19, 2842-2853.
16. Macklin M. D., McCabe D., McGregor M. W., Neumann V., Meyer T., Callan R., Hinshaw V. S., Swain W. F.: Immunization of pigs with a particle-mediated DNA vaccine to influenza A virus protects against challenge with homologous virus. *J. Virol.* 1998, 72, 1491-1496.
17. Mancini G., Donatelli I., Rozera C., Arangio Ruiz G., Butto S.: Antigenic and biochemical analysis of influenza „A” H3N2 viruses isolated from pigs. *Arch. Virol.* 1985, 83, 157-167.
18. Ozaki H., Sugiura T., Sugita S., Imagawa H., Kida H.: Detection of antibodies to the nonstructural protein (NS1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses. *Vet. Microbiol.* 2001, 82, 111-119.
19. Reid A. H., Fanning T. G., Janczewski T. A., Taubenberger J. K.: Characterization of the 1918 „Spanish” influenza virus neuraminidase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 6785-6790.
20. Van Reeth K. V., Brown I., Essen S., Pensaert M.: Genetic relationships, serological cross-reaction and cross-protection between H1N2 and other influenza A virus subtypes endemic in European pigs. *Virus Res.* 2004, 103, 115-124.
21. Shope R. E.: The swine lungworm as a reservoir and intermediate host for swine influenza virus. V. Provocation of swine influenza by exposure of prepared swine to adverse weather. *J. Exp. Med.* 1955, 102, 567-572.
22. Tamura S., Tanimoto T., Kurata T.: Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. *Jpn J. Infect. Dis.* 2005, 58, 195-207.
23. Tian Z. J., Zhou G. H., Zheng B. L., Qiu H. J., Ni J. Q., Yang H. L., Yin X. N., Hu S. P., Tong G. Z.: A recombinant pseudorabies virus encoding the HA gene from H3N2 subtype swine influenza virus protects mice from virulent challenge. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006, 111, 211-218.
24. Tamova B., Veznikova D., Mensik J., Stumpa A.: Surveillance of influenza in pig herds in Czechoslovakia in 1974-1979. 1. Introduction of influenza epidemic A (H3N2) viruses into pig herds. *Zntbl. Vetmed B* 1980, 27, 517-523.
25. Ulmer J. B., Donnelly J. J., Parker S. E., Rhodes G. H., Felgner P. L., Dworki V. J., Gromkowski S. H., Deck R. R., DeWitt C. M., Friedman A.: Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993, 259, 1745-1749.
26. Wesley R. D., Tang M., Lager K. M.: Protection of weaned pigs by vaccination with human adenovirus 5 recombinant viruses expressing the hemagglutinin and the nucleoprotein of H3N2 swine influenza virus. *Vaccine* 2004, 22, 3427-3434.
27. Wibberley G., Swallow C., Roberts D. H.: Characterization of an influenza A (H3N2) virus isolated from pigs in England in 1987. *Br. Vet. J.* 1988, 144, 196-201.
28. Yoshikawa T., Matsuo K., Matsuo K., Suzuki Y., Nomoto A., Tamura S., Kurata T., Sata T.: Total viral genome copies and virus-Ig complexes after infection with influenza virus in the nasal secretions of immunized mice. *J. Gen. Virol.* 2004, 85, 2339-2346.