

Odporność przeciw zakażeniu wirusem grypy koni

MAŁGORZATA PURZYCKA, WOJCIECH ROŻEK, JAN F. ŻMUDZIŃSKI

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

Purzycka M., Rożek W., Żmudziński J. F.

Immunity against equine influenza virus infection

Summary

Influenza virus plays an important role in respiratory diseases in horses. Equine influenza virus is represented by two different serotypes: H7N7 and H3N8. The strain H7N7 has not been isolated since 1980 and H3N8 circulates in the equine population throughout most of the world. For preventive and prophylactic measures inactivated and subunit vaccines are most commonly used. Contrary to natural infections, traditional vaccines induce neither cytotoxic lymphocytes T nor mucosal antibodies and they do not provide enduring immunity. There is also the difference in the immune response as the natural infection induces IgA, IgG_A and IgG_B antibodies whereas the traditional vaccines induce IgG_C and IgG(T) and no IgA. The low efficacy of the traditional vaccines also depends on an antigenic drift of the surface glycoprotein – hemagglutinin.

Keywords: equine influenza virus, lymphocytes T

Wirus grypy koni należy do rodziny *Orthomyxoviridae* do typu A i reprezentują go dwa serotypy: H7N7 (podtyp A1) oraz H3N8 (podtyp A2). Ostatnia izolacja wirusa H7N7 miała miejsce w 1980 r. w Jugosławii (19). Obecnie w populacji koni krąży tylko podtyp A2, który dzieli się na dwie linie ewolucyjne: linię szczepów amerykańskich oraz linię szczepów europejskich. Podstawę tej klasyfikacji stanowi lokalizacja geograficzna tych dwóch puli genowych wirusa grypy. Różnice między dwiema liniami ewolucyjnymi dotyczą genów kodujących następujące białka wirusowe: kompleks polimerazy (PB1, PB2 i PA), hemagglutyninę (HA), neuraminidazę (NA) oraz białka NS. Wirus grypy koni może występować endemicznie, może też wywoływać epidemie o dużym zasięgu geograficznym. Aktualnie epidemie grypy zazwyczaj występują poza Europą (14) i są powodowane przez wirus H3N8 (A2). Wirus powoduje straty zwłaszcza w hodowli koni wierzchowych, sportowych, bowiem zwierzęta rekonwalescencji często nie powracają do stanu zdrowia sprzed zachorowania (21, 22).

Chorobotwórczość wirusa grypy koni

Podobnie jak grypa u ludzi, grypa koni jest wysoce zaraźliwą chorobą. Wirus najczęściej przenosi się drogą inhalacji. Wymiana koni pomiędzy stadninami, torami wyścigowymi zwiększa ryzyko transmisji zakażenia. Po około 1 do 3 dni inkubacji występują pierwsze symptomy choroby: wzrost ciepłoty ciała do 41°C, napadowy, suchy kaszel, wyciek z nosa, niechęć do ruchu spowodowana bólem mięśni, brak apetytu, powiększenie podżuchwowych węzłów limfatycznych i osowienie. Szczególnie kaszel sprzyja rozprzestrzenianiu się wirusa. Nasilenie objawów chorobowych zależy od szczepu wirusowego oraz statusu immunologicznego za-

infekowanego zwierzęcia. Zapalenie oskrzeli, oskrzelików oraz płuc mogą być następstwami zakażenia wirusem grypy. W przypadku braku współzakażenia bakteryjnego, nasilenie objawów chorobowych słabnie w okresie 2 tygodni. Notowane były również przypadki (dotyczące koni o obniżonej odporności) penetracji wirusa grypy w głąb błony podstawowej komórek nabłonka dróg oddechowych, co w dalszej fazie może prowadzić do zapalenia mięśni, zapalenia mięśnia sercowego, obrzęku czy nawet zapalenia mózgu (3, 7).

Odpowiedź immunologiczna komórkowa i humoralna na zakażenie wirusem grypy koni

Wirus grypy koni wnika i replikuje się w komórkach nabłonka dróg oddechowych. W efekcie komórki nabłonka górnych dróg oddechowych tracą orzęsienie w ciągu 4-6 dni po zakażeniu. Inicjacja odpowiedzi immunologicznej związana jest z tkankami limfatycznymi górnych dróg oddechowych – NALT (nasal associated lymphoid tissue). Odporność przeciw grypie warunkowana jest zarówno przez komórkowe, jak i humoralne mechanizmy obronne. Mają one za zadanie zapobieganie oraz ograniczenie szerzenia się infekcji (18, 24). Odpowiedź komórkowa na zakażenie wirusem grypy koni jest długoterminowa i może być niezależna od wytwarzania przeciwciał. W toku odpowiedzi komórkowej indukowane są cytotoksyczne limfocyty T oraz pomocnicze limfocyty T. Cytotoksyczne limfocyty T (T_C) zależne od MHC klasy I (Major Histocompatibility Class I) rozpoznają antygeny wewnątrzkomórkowe. Natomiast pomocnicze limfocyty T (T_H) zależne od MHC klasy II rozpoznają antygeny egzogenne. HA wirusa grypy związana z błoną komórek gospodarza wywołuje jedynie słabą odpowiedź komórkową typu T_H. HA może również powstawać

w cytoplazmie jako wynik delecji sekwencji cDNA, kodującej N-końcowy peptyd sygnałowy HA. Wówczas indukowana jest silna odpowiedź komórek Tc przeciwko HA. Lokalizacja białka HA w komórce decyduje, czy stymulowana będzie odpowiedź zależna od MHC klasy I, czy od MHC klasy II (17). Ponadto aktywowane pomocnicze limfocyty T regulują funkcję komórek B i T poprzez wytwarzanie cytokin oraz innych czynników chemotaktycznych. Indukowana jest lokalna synteza interleukiny 6 (IL-6) oraz interferonu α/β (INF α/β). Następuje również wzrost poziomu interferonu γ (INF- γ), interleukiny 4 (IL-4) oraz interleukiny 2 (IL-2) we krwi obwodowej oraz w węzłach limfatycznych. Szczególną rolę odgrywa lokalna synteza cytokin zapalnych: IL-6 oraz INF α/β . IL-6 aktywuje limfocyty B i T, jest zaangażowana w produkcję wydzielniczych przeciwciał klasy IgA. INF α/β pobudza komórki NK (natural killer) oraz pomocnicze limfocyty T (9, 13, 16).

Odpowiedź humoralna skierowana jest przeciwko poszczególnym białkom wirusowym. Stopień glikozylacji, masa cząsteczkowa oraz liczba kopii danego białka w wirionie warunkują ich aktywność immunologiczną. Szczególną rolę w indukcji odpowiedzi humoralnej od-

grywiają dwa wirusowe białka powierzchniowe: hemaglutynina i neuraminidaza. Zarówno hemaglutyninę, jak i neuraminidazę cechuje duża zmienność. Źródłem zmienności są najczęściej mutacje typu missens. Wtedy konsekwencją zmiany pojedynczego nukleotydu jest zmiana aminokwasu w kodowanym białku wirusowym. Mutacje występują często, powodują dryft antygenowy i są przyczyną nieskuteczności stosowanych szczepionek (4). Mechanizmy immunologiczne stymulowane przez hemaglutyninę i neuraminidazę warunkują odporność homotypową. Odporność heterotypowa, obejmująca szersze spektrum szczepów wirusowych, oparta jest o mniej zmienne białka np. nukleoproteinę lub białko M1.

W obronie organizmu przed zakażeniem biorą udział przeciwciała zawarte w wydzielinach śluzowych, jak również neutralizujące przeciwciała zawarte w surowicy. U koni wyróżnia się immunoglobuliny klas: IgM, IgE, IgA oraz, w odróżnieniu od człowieka, 5 izotypów immunoglobulin klasy IgG: IgGa, IgGb, IgGc, IgG(T) oraz IgG(B). Niektóre źródła podają sześć izotypów immunoglobulin IgG (20). Szczególne znaczenie odgrywiają immunoglobuliny klasy IgA występujące w wydzielinach górnych dróg oddechowych. Stanowią one barierę ochronną przed wirusem (11). Podczas transportu przez komórki nabłonka przeciwciała IgA są zdolne do neutralizacji wewnątrzkomórkowych cząstek wirusowych już w pierwszym etapie zakażenia. Efektywna obrona przed zakażeniem uwarunkowana jest produkcją wydzielniczych przeciwciał IgA oraz humoralnych przeciwciał IgGa i IgGb.

Tab. 1. Wykaz szczepionek przeciw zakażeniom wywołanym przez wirus grypy koni dopuszczonych do obrotu na terytorium Polski wg Rejestru Produktów Leczniczych Weterynaryjnych (stan na sierpień 2006 r.)

Nazwa szczepionki	Skład szczepionki
Equiffa	glikoproteiny herpeswirusa koni typ 1, inaktywowane szczepy wirusa grypy koni: A/equine-1/Prague/56, A/equine-2/Newmarket/2/93
Equilis Equeza T	podjednostki HA i NA wirusa grypy koni szczepów: A/equine-1/Prague/56, A/equine-2/Newmarket/1/93, A/equine-2/Newmarket/2/93, toksyna tężcowa
Equilis Resequin NN Plus	inaktywowany szczep herpeswirusa koni: typu 1 (RAC-H) i typu 4 (2252), podjednostki HA wirusa grypy koni szczepów: A/equine-1/Prague/56, A/equine-2/Newmarket/1/93, A/equine-2/Newmarket/2/93
Tetagripiffa	inaktywowane szczepy wirusa grypy koni: A/equine-1/Prague/56, A/equine-2/Newmarket/2/93, toksyna tężcowa

Tab. 2. Wykaz szczepionek przeciw zakażeniom wywołanym przez wirus grypy koni dopuszczonych do obrotu na podstawie pozwoleń wydanych przez Radę Unii Europejskiej

Nazwa szczepionki	Skład szczepionki
Equilis Prequeza	podjednostki HA wirusa grypy koni szczepów: A/equine-1/Prague/56, A/equine-2/Newmarket/1/93, A/equine-2/Newmarket/2/93
Equilis Prequeza Te	podjednostki HA wirusa grypy koni szczepów: A/equine-1/Prague/56, A/equine-2/Newmarket/1/93, A/equine-2/Newmarket/2/93, toksyna tężcowa
ProteqFlu	2 rekombinanty wirusa canarypox (vCP1529 i vCP1533) posiadające właściwości ekspresji genu HA wirusa grypy koni szczepów: A/equine-2/Kentucky/94, A/equine-2/Newmarket/2/93
ProteqFlu-Te	2 rekombinanty wirusa canarypox (vCP1529 i vCP1533) posiadające właściwości ekspresji genu HA wirusa grypy koni szczepów: A/equine-2/Kentucky/94, A/equine-2/Newmarket/2/93, toksyna tężcowa

Szczepionki tradycyjne

Najpowszechniej stosowane są szczepionki zawierające inaktywowane wirusy oraz szczepionki podjednostkowe. Nie zapewniają one całkowitej ochrony przed zakażeniem, zwłaszcza u młodych koni (12). Tabele: 1 i 2 przedstawiają wykaz szczepionek zatwierdzonych do użytku na obszarze Polski i Unii Europejskiej. Szczepionki inaktywowane zawierają awirulentne, pozbawione zdolności namnażania się w organizmie biorcy wirusy, przy jak najmniejszej modyfikacji istotnych determinant antygenowych. Cząsteczki inaktywowanych wirionów dostają się do komórek gospodarza na drodze endocytozy. Wewnątrz endosomów ulegają degradacji do peptydów, gdzie łączą się z cząsteczkami MHC klasy II. Po pojawieniu się na powierzchni komórki gospodarza aktywują limfocyty T pomocnicze, tylko w znikomym stopniu antygeny zdegradowane w endosomach (egzogenne) wiążą się z cząsteczkami MHC klasy I, co, jak już wspomniano, warunkuje skuteczną odpowiedź cytotoksyczną. Szczepionki podjednostkowe zawierają w swym składzie oczyszczone wirusowe glikoproteiny powierzchniowe: hemaglutyninę (HA) i neuraminidazę (NA). Wobec dużej zmienności glikoprotein powierzchniowych wirusa grypy koni, przeciwciała indukowane przez szczepy szczepionkowe często nie rozpoznają i nie inaktywują antygenów pochodzących od mutantów, zatem szczepienie jest nieskuteczne (10, 15, 17, 23).

Porównanie odpowiedzi humoralnej koni po przechorowaniu oraz po szczepieniu szczepionką zawierającą inaktywowane wirusy

Naturalne zakażenie indukuje wytwarzanie immunoglobulin klas: IgA, IgG_a i IgG_b zarówno w surowicy, jak i w wydzielinie górnych dróg oddechowych. Poziom immunoglobulin IgA jest zdecydowanie wyższy w wydzielinie z górnych dróg oddechowych niż we krwi, odwrotne zjawisko ma miejsce w przypadku immunoglobulin IgG_a i IgG_b. Najwyższy poziom immunoglobulin IgA i IgG_a obserwowany jest 16. dnia po zakażeniu, po czym stabilizuje się w ciągu 53 dni w przypadku przeciwciał IgA i 100 dni dla przeciwciał IgG_a. Naturalna infekcja stymuluje indukcję przeciwciał IgA przez okres 3-5 miesięcy. Poziom immunoglobulin IgG_a osiąga swe apogeum przed 30. dniem po zakażeniu, następnie obniża się w ciągu kolejnych 72 dni do osiągnięcia stałego poziomu w surowicy, natomiast pozostaje podwyższony w wydzielinie z górnych dróg oddechowych. Przeciwciała: IgG_c i IgG(T) nie zostały wykryte. Całkowita kliniczna i immunologiczna odporność po przebyciu infekcji dla szczepów homologicznych utrzymuje się co najmniej 32 tygodnie, a odporność częściowa ponad rok (6).

Surowica oraz wydzielina z górnych dróg oddechowych koni immunizowanych szczepionką inaktywowaną charakteryzuje się brakiem przeciwciał w obrębie klasy IgA, i izotypów: IgG_a, IgG_b, natomiast stwierdzono obecność przeciwciał izotypu IgG(T) w surowicy. W 16. dniu po szczepieniu obserwowany jest najwyższy poziom przeciwciał IgG(T), po czym, w ciągu następnych 93 dni utrzymuje on stałą wartość. Przeciwciała IgG(T) indukowane szczepionką inaktywowaną utrzymują się w surowicy krócej niż 100 dni po szczepieniu i nie zapewniają całkowitej ochrony przed kolejną infekcją (8, 19).

Zatem długotrwała ochrona przed zakażeniem wirusem grypy jest warunkowana obecnością przeciwciał IgA w wydzielinach górnych dróg oddechowych oraz surowicznych przeciwciał IgG_a i IgG_b. Jak wspomniano wcześniej, inaktywowane szczepionki indukują produkcję przeciwciał IgG(T) i w niektórych przypadkach IgG_c (8). Mechanizmy regulujące indukcję immunoglobulin IgG_a/IgG_b różnią się zasadniczo od mechanizmów regulujących wytwarzanie przeciwciał IgG(T). Zarówno przeciwciała IgG(T), jak również przeciwciała IgG_c nie zapewniają skutecznej ochrony przed zakażeniem wirusowym. Przeciwciała IgG(T) odgrywają znaczącą rolę w neutralizacji toksyn bakteryjnych oraz są istotnym czynnikiem w zwalczaniu pasożytów jelitowych. Dodatkowo, zarówno immunoglobuliny IgG(T), jak IgG_c, nie wiążą dopełniacza i mogą hamować neutralizację antygenów wirusowych przez inne izotypy przeciwciał IgG. Monocyty i neutrofile nie posiadają miejsc receptorowych dla Fc immunoglobulin IgG(T), podczas gdy mogą wiązać inne izotypy IgG oraz przeciwciała IgA. Jak już wspomniano, te cechy immunoglobulin IgG(T) i IgG_c wskazują na ich niewielką skuteczność w ochronie przed zakażeniem wirusem grypy. W odróżnieniu, przeciwciała IgG_a i IgG_b są efektywne podczas procesu opsonizacji i pośredniczą w mechanizmie cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC – antibody dependent cellular cytotoxicity) (1, 13).

Odpowiedź immunologiczna indukowana przez naturalne zakażenie w dalszym ciągu jest najdoskonalsza (5), a szczepionki tradycyjne – inaktywowane i podjednostkowe nie indukują cytotoksycznych limfocytów T ani przeciwciał IgA w wydzielinach śluzowych, co ma kluczowe znaczenie w uzyskaniu odporności (2). Konieczne stało się wprowadzenie szczepionek nowej generacji, które bardziej skutecznie stymulowałyby układ immunologiczny gospodarza.

Piśmiennictwo

- Cox R. J., Brokstad K. A., Ogra P.: Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live attenuated influenza vaccines. *Scand. J. Immunol.* 2004, 59, 1-15.
- Daly J. M., Newton J. R., Mumford J. A.: Current perspectives on control of equine influenza. *Vet. Res.* 2004, 35, 411-423.
- Daly J. M., Whitwell K. E., Miller J., Dowd G., Cardwell J. M., Smith K. C.: Investigation of equine influenza cases exhibiting neurological disease: coincidence or association? *J. Comp. Path.* 2006, 134, 231-235.
- de Jong J. C., Rimmelzwaan G. F., Fouchier R. A. M., Osterhaus A. D. M. E.: Influenza virus: a master of metamorphosis. *J. Infect.* 2000, 40, 218-228.
- Fouchier R. A. M., Osterhaus A. D. M. E., Brown I. H.: Animal influenza virus surveillance. *Vaccine* 2003, 21, 1754-1757.
- Hannant D., Jessett D. M., O'Neil T., Sundquist B., Mumford J. A.: Nasopharyngeal, tracheobronchial and systemic immune responses to vaccination and aerosol infection with equine-2 influenza A virus (H3N8). *Proc. Fifth Internat. Conf., Equine Infectious Diseases.* University Press of Kentucky, Lexington 1987, s. 66-73.
- Hannant D., Mumford J. A.: *Virus Infection of Equines.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1996, 287-288.
- Holmes M. A., Townsend H. G., Hussey S., Breathnach C., Barnett C., Holland R., Lunn D. P.: Immune responses to commercial equine vaccines. *Int. Vet. Inf. Serv.* 2003, P0630.1103.
- Horohov D. W.: Immunology of the equine lung. *Int. Vet. Inf. Serv.* 2004, B0303.0804.
- Minke J. M., Audonnet J.-Ch., Fischer L.: Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet. Res.* 2004, 35, 425-443.
- Nelson K. M., Schram B. R., McGregor M. W., Sheoran A. S., Olsen C. W., Lunn D. P.: Local and systemic isotype-specific antibody responses to equine influenza virus infection versus conventional vaccination. *Vaccine* 1998, 16, 1306-1313.
- Newton J. R., Lakhani K. H., Wood J. L. N., Baker D. J.: Risk factors for equine influenza serum antibody titres in young thoroughbred racehorses given an inactivated vaccine. *Prev. Vet. Med.* 2000, 46, 129-141.
- Paillot R., Hannant D., Kydd J. H., Daly J. M.: Vaccination against equine influenza: Quid novi? *Vaccine* 2006, 24, 4047-4061.
- Palese P.: Making better influenza virus vaccines? *Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12, 61-65.
- Park A. W., Wood J. L., Newton J. R., Daly J., Mumford J. A., Grenfell B. T.: Optimising vaccination strategies in equine influenza. *Vaccine* 2003, 21, 2862-2870.
- Ramsay A. J., Husband A. J., Ramshaw I. A., Bao S., Matthaie K. I., Koehler G., Kopf M.: The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science* 1994, 264, 561-563.
- Roitt I., Brostoff J., Male D.: *Immunologia.* Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, Wyd. Medyczne Slotwiński Verlag, Bremen 2000, 116.
- Slater J., Hannant D.: Equine immunity to viruses. *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.* 2000, 16, 49-68.
- Soboll G., Horohov D. W., Aldridge B. M., Olsen C. W., McGregor M. W., Drape R. J., Macklin M. D., Swain W. F., Lunn D. P.: Regional antibody and cellular immune responses to equine influenza virus infection, and particle mediated DNA vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2003, 94, 47-62.
- Steinbach F., Deeg C., Mauel S., Wagner B.: Equine immunology: offspring of the serum horse. *Trends Immunol.* 2002, 23, 223-225.
- Timoney P. J.: Equine influenza. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1996, 19, 205-211.
- Wilson W. D.: Equine influenza. *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.* 1993, 9, 257-282.
- Yates P., Mumford J. A.: Equine influenza vaccine efficacy: the significance of antigenic variation. *Vet. Microbiol.* 2000, 74, 173-177.
- Zaleska M., Anusz K., Kita J.: Wpływ immunizacji przeciw grypie koni na parametry odporności komórkowej. *Medycyna Wet.* 1995, 51, 90-93.

Adres autora: mgr Małgorzata Purzycka, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: malgorzata.purzycka@piwet.pulawy.pl