

Inaktywowana szczepionka przeciwko zakażeniom parwowirusowym lisów i nerek

Beata Mizak¹

Andrzej Kęsy²

Grażyna Paprocka²

¹Zakład Chorób Zwierząt Mięsożernych i Futerkowych
Państwowy Instytut Weterynaryjny, Puławy

²Zakład Pruszczycy
Państwowy Instytut Weterynaryjny, Zduńska Wola

1. Wstęp

W 1983 r. w Finlandii zanotowano pierwsze przypadki zakażeń parwowirusowych u lisów niebieskich (14). Przebiegały one bezobjawowo, z wyjątkiem samic ciężarnych, u których prowadziły do zamierania i mumifikacji płodów, co w sposób niekorzystny wpływało na wyniki hodowlane i ekonomiczne. Prowadzone w Polsce w latach 1993-1995 badania serologiczne lisów pochodzących z ferm, w których stwierdzono złe wyniki w rozrodzie, w postaci znaczącego zmniejszenia się liczby młodych urodzonych od jednej samicy, wykazały jednoznacznie szerzenie się zakażeń parwowirusowych (4,10). W badaniach serologicznych przeprowadzonych w fermach nerek, w których stwierdzono bardzo niski procent urodzonych młodych, wykazano w surowicach zwierząt wysokie miana przeciwciał przeciwko parwowirusom (10). Izolacje parwowirusów z kału lisów oraz z macicy ciężarnej norki potwierdziły udział tych drobnoustrojów w etiologii wczesnych ronień (9,10).

Znaczące straty ponoszone przez hodowców mięsożernych zwierząt futerkowych w Polsce wskazywały na pilną potrzebę opracowania krajowej szczepionki przeciwko zakażeniom parwowirusowym dla lisów i nerek.

W roku 1993 opracowano szczepionkę doświadczalną, zawierającą atenuowany szczep parwowirusa nerek. Użycie wirusa heterologicznego było uzasadnione znacznym pokrewieństwem serologicznym i genetycznym parwowirusów zwierząt mięsożernych (7,12). Ponadto potwierdzono najbliższe pokrewieństwo parwowirusa lisów niebieskich z parwowirusem nerek (15). W roku 1995 szczepionka Foxvac Parwo została wpisana do rejestru preparatów dopuszczonych do obrotu w Polsce. W latach 1994 - 1995 wyprodukowano i zastosowano w fermach lisów hodowlanych na terenie całego kraju ponad 150 000 dawek preparatu. Właściwości immunogenne szczepionki przedstawiono w pracy (11). Z uwagi na tropizm parwowirusów do komórek aktywnie

dzielących się, a takimi są tkanki rozwijających się w macicy płodów oraz związanej z tym konieczności rygorystycznego przestrzegania terminu szczepień, minimum na 6 tygodni przed terminem krycia na fermie, przeprowadzono badania nad uzyskaniem bezpiecznej i skutecznej szczepionki inaktywowanej. Ich wyniki stanowią temat tej pracy.

2. Komórki i szczepy wirusowe

W badaniach użyto atenuowany wirus zakaźnego zapalenia jelit nerek szczep MEV 143, namnażany w hodowli komórek płuc kota (Fc). Podłoże wzrostowe stanowił płyn Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy płodowej oraz gentamycyny. Miano TCID₅₀ szczepu wynosiło co najmniej log 3,5 zaś miano określane testem hemaglutynacji było równe 512.

3. Przygotowanie szczepionki

Świeżo trypsynowaną hodowlę komórek Fc zakażono szczepem MEV 143, zgodnie z dokumentacją technologiczną (6). Wirus zbierano po 48 i 72 godzinach inkubacji, gdy efekt cytopatyczny stwierdzono w około 75% komórek. Jednocześnie potwierdzano namnażanie się wirusa przez określenie jego miana hemaglutynacyjnego (HA), w płynie z hodowli komórek. Wszystkie butle, w których stwierdzono wysokie miano HA, poddawano 3-krotnemu zamrażaniu i rozmrażaniu. Zebraną zawiesinę wirusa wirowano przy 5000 g, filtrowano przez sączki Millipore o średnicy por 0,22 μm i oznaczano miano TCID₅₀ oraz miano hemaglutynacyjne wirusa (8).

4. Inaktywacja wirusa

Inaktywację wirusa przeprowadzono w fermentorach, przy ciągłym mieszaniu, w temperaturze 30°C przez 16 godzin. Stosowano następujące inaktywatory:

1) formalina w stężeniu końcowym 0,2% (formalinę 36-38% wstępnie rozcieńczano w stosunku 1:10) — wg metody Rowlansa i Sangara (13);

2) 0,1 M Binary Ethylene Imine (BEI) — wg metody Bahnemanna i wsp.(1). W 0,2 N roztworze NaOH rozpuszczano BEI i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Do inaktywacji zastosowano 0,1 M BEI o stężeniu końcowym 4%;

3) β-propiolakton — wg metody Fagga (2). Przygotowano 5% roztwór inaktywatora, następnie przesączono go przez filtr Millipore o średnicy por 0,22 μm i użyto w stężeniu końcowym 0,05%;

4) kontrolę stanowił atenuowany szczep MEV 143, do którego w miejsce inaktywatora dodano PBS. W celu określenia miana TCID₅₀ i HA wirusa, próbki do badań pobierano przed oraz po 2, 4, 6, 8 i 16 godzinach inaktywacji.

5. Przygotowanie szczepionek

Zawiesinę wirusa schładzano do 4°C. Szczepionki doświadczalne zawierały adiuwant mineralny — $\text{Al}(\text{OH})_3$ - Alhydrogel (Superphos, Dania), w stężeniu końcowym 5% v/v (stężenie wyjściowe adiuwantu wynosiło 3%), lub osłaniacz DSG-72, 30% (3). Przygotowano następujące serie szczepionek doświadczalnych zawierających wirus:

- inaktywowany formaliną,
- inaktywowany formaliną z dodatkiem $\text{Al}(\text{OH})_3$,
- inaktywowany BEI,
- inaktywowany BEI z dodatkiem $\text{Al}(\text{OH})_3$,
- inaktywowany β -propiolaktonem,
- inaktywowany β -propiolaktonem z dodatkiem $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Kontrolę stanowiły dwie szczepionki, w skład których wchodził wirus atenuowany, poddany ogrzewaniu w 30°C przez 16 godzin bez inaktywatorów. Pierwsza, zawierała osłaniacz DSG — 30%, druga — 5% żelu wodorotlenku glinu. Skuteczność inaktywacji wirusa w badanych próbach określono w hodowli komórek Fc. Miano HA wirusa w szczepionkach sprawdzono po 1, 2, 3, 4 i 5 miesiącach od ich sporządzenia.

6. Oznaczenie trwałości wirusa w szczepionce

Miano TCID_{50} oraz HA atenuowanego wirusa w płynnej szczepionce Foxvac Parwo określano metodą Larskiego (8) po 3, 6, 8 i 12 miesiącach przechowywania w temperaturze -25°C oraz 4°C.

7. Określenie czystości elektroforetycznej białek wirusa w szczepionce

Białka szczepu MEV 143 w szczepionce Foxvac Parwo określano metodą *Western blot* z zastosowaniem surowicy psiej hiperimmunizowanej o mianie HI równym 2560 oraz koniugatu (znakowane peroksydazą IgG królicze, przeciwko immunoglobulinom psa).

8. Określenie skuteczności szczepionek inaktywowanych

Doświadczalne szczepionki inaktywowane oraz atenuowaną szczepionkę Foxvac Parwo zastosowano u lisów jednorazowo, podskórnie, w dawce 2 ml na sztukę oraz u nerek, w dawce 1 ml na sztukę. Do badań porównawczych zastosowano szczepionki referencyjne Biovac D oraz Nordent vet, zawierające inaktywowany parwovirus nerek, a także dostępne w kraju szczepionki zawierające parwovirus psów (Canivac P, Canivac FHP, Parvodog). Szczepienia

przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Krew do badań w kierunku obecności specyficznych przeciwciał pobierano przed szczepieniem oraz dwudziestego pierwszego dnia po immunizacji. Do badań wybierano tylko zwierzęta w surowicy których nie stwierdzono obecności przeciwciał w dniu szczepienia. Poziom przeciwciał przeciwko parwowirusom określano testem zahamowania hemaglutynacji (HI).

9. Odczyn zahamowania hemaglutynacji

Test przeprowadzono w sposób opisany przez Górskiego i wsp. (5). Antygen stanowił parwowirus psów używany standardowo do kontroli skuteczności szczepionek parwowirusowych dla psów oraz szczep norczy MEV, używany do kontroli szczepionek dla lisów.

10. Omówienie wyników

Miano TCID₅₀ wirusa MEV użytego do inaktywacji wynosiło log 3,5. Analiza białek wirusa metodą *Western blot* wykazała obecność czystych protein VP1 i VP2 parwowirusa nerek. Trwałość szczepu atenuowanego MEV 143 oznaczano po 3, 6, 8 i 12 miesiącach przechowywania w temperaturze 4 i -25°C. Jego miano TCID₅₀ i HA nie uległo zmianie przez 8 miesięcy przechowywania w wymienionych temperaturach, a po 12 miesiącach miano TCID₅₀ i HA wirusa obniżyło się do wartości log 3,0 oraz 256 jednostek HA. Wyniki badań świadczą zarówno o wysokiej trwałości, jak i stabilności szczepu MEV użytego do produkcji szczepionki Foxvac Parwo.

Porównanie dynamiki narastania przeciwciał poszczepiennych u lisów, po stosowaniu szczepionki Foxvac Parwo oraz szczepionek referencyjnych Biovac D i Nordent vet, które są w krajach skandynawskich używane do szczepień profilaktycznych przeciwko zakażeniom parwowirusowym lisów i nerek, przedstawiono w tabeli 1. Szczepionki referencyjne są sporządzone również z wirusa zakaźnego zapalenia jelit nerek. W badaniach zastosowano także szczepionki komercyjne zawierające atenuowany parwowirus psów: Canivac P, Canivac FHP oraz Parvodog. Odpowiedź immunologiczną badano po 10-14 i 28 dniach od szczepienia. Najwyższy poziom przeciwciał zanotowano u lisów immunizowanych szczepionką Foxvac Parwo oraz szczepionkami referencyjnymi. Uzyskane wyniki były porównywalne. Mniej skuteczne okazały się immunopreparaty zawierające parwowirus psów. Należy jednak podkreślić, że szczepionki te spowodowały u lisów, po jednokrotnym podaniu, powstawanie swoistych przeciwciał. Odsetek zwierząt produkujących przeciwciała i poziom przeciwciał w ich surowicach były jednakże niższe od indukowanych szczepionkami zawierającymi wirus zakaźnego zapalenia jelit nerek. U ponad 95% immunizowanych zwierząt maksymalne poziomy przeciwciał stwierdzono w dwudziestym ósmym dniu po szczepieniu. Dlatego też zaleca się stosowanie szcze-

pionek przeciwko zakażeniom parwowirusowym u lisów na minimum 6 tygodni przed przewidywanym terminem pokryć.

Prezentowane wyniki badań potwierdzają trwałość użytego szczepu i jego wysokie właściwości immunogenne.

TABELA 1
PORÓWNANIE ODPOWIEDZI HUMORALNEJ LISÓW
NA SZCZEPIONKĘ FOXVAC PARWO I PREPARATY REFERENCYJNE

Nazwa szczepionki	Liczba zwierząt szczepionych	Dni po szczepieniu		
		10-14	28	miano HI**
Foxvac Parwo	20	8/20*	20/20	640
Nordent	12	9/12	12/12	320
Biovac D	15	10/15	14/15	640
Canivac P	10	3/10	8/10	80
Canivac FHP	15	8/15	13/15	80/160
Parvodog	10	4/10	4/10	80
Kontrola	6	0/6	2/6	10

* — w liczniku liczba zwierząt z przeciwciałami, w mianowniku liczba zwierząt szczepionych,

** — miano HI w 28 dniu po szczepieniu.

W dalszych badaniach zmierzano do przygotowania szczepionek doświadczalnych zawierających inaktywowany wirus MEV 143 oraz porównania właściwości immunogennych szczepionek inaktywowanych i szczepionki Foxvac Parwo. Określono właściwości hemaglutynacyjne wirusa w szczepionce inaktywowanej 0,2% formaliną, 0,1 M BEI lub 0,05% β -propiolaktonem, przez 16 godzin. Miano HA wirusa przed inaktywacją wynosiło 512 i nie uległo zmianie w żadnej inaktywowanej próbie. Skuteczność inaktywacji wirusa określono w hodowli komórek Fc, w których nie stwierdzono efektu cytotycznego. Wyniki badania stabilności antygeny w czasie jego przechowywania w temperaturze 4°C przedstawiono w tabeli 2. Miano HA wirusa inaktywowanego formaliną obniżyło się z 256 do 4 jednostek HA po 4 miesiącach przechowywania szczepionki w chłodni. Miano wirusa inaktywowanego 0,1M BEI obniżyło się nieznacznie z 512 do 256 jednostek HA, zaś miano HA wirusa inaktywowanego 0,05% β -propiolaktonem, jak i atenuowanego (kontrola) zostało zachowane na nie zmienionym poziomie.

Wyniki badania skuteczności inaktywowanych szczepionek doświadczalnych po ich zastosowaniu u lisów hodowlanych, przedstawiono w tabeli 3. Najlepszymi właściwościami immunogennymi charakteryzowała się szczepionka zawierająca wirus inaktywowany β -propiolaktonem oraz żel wodorotlenku glinu. Miana przeciwciał poszczepiennych w surowicach zwierząt otrzymujących tę szczepionkę, określone w dwudziestym pierwszym dniu po immunizacji, utrzymywały się na poziomie 160-640 jednostek HI. Po zastosowaniu innych inaktywatorów obserwowano słabszą produkcję przeciwciał, w granicach 10-80 jednostek HI. Poziomy przeciwciał indukowanych przez szczepionkę zawierającą wirus atenuowany były porównywalne z występującymi po szcze-

TABELA 2
OKREŚLENIE STABILNOŚCI MIANA HA SZCZEPIONEK PRZECHOWYWANYCH W 4°C

Czas przechowywania w miesiącach	Inaktywator — Miano HA			
	formalina	BEI	β-propiolakton	kontrola
0	256	512	512	512
1	128	512	512	512
2	32	512	512	512
3	16	512	512	512
4	4	256	512	512
5	4	256	512	512

pieniu: preparatem zawierającym wirus inaktywowany β-propiolaktonem oraz żelazem wodorotlenku glinu. Analogiczne wyniki uzyskano po stosowaniu szczepionek u nerek. Miano HI u zwierząt szczepionych wirusem inaktywowanym β-propiolaktonem, z dodatkiem wodorotlenku glinu było najwyższe i wahało się od 160 do 640 jednostek HI. Na uwagę zasługuje fakt, że przeciwciała poszczepienne po immunizacji lisów wirusem inaktywowanym β-propiolaktonem stwierdzono w surowicach zwierząt już po 21 dniach od szczepienia. Ich miano było porównywalne z obserwowanym u lisów w dwudziestym ósmym dniu po podaniu szczepionki Foxvac Parwo. Ponadto przeciwciała parwovirusowe stwierdzono u wszystkich lisów szczepionych szczepionką inaktywowaną.

TABELA 3
PORÓWNANIE IMMUNOGENNYCH WŁAŚCIWOŚCI
INAKTYWOWANYCH SZCZEPIONEK PARWOWIRUSOWYCH U LISÓW

Liczba zwierząt szczepionych	Rodzaj szczepionki	Poziom przeciwciał HI w surowicach lisów:	
		przed szczepieniem	21 dni po szczepieniu
6	inakt. BEI + Al(OH) ₃	10	10-40
6	inakt. BEI	10	10-20
6	inakt. form. + Al(OH) ₃	10	20-80
6	inakt. form.	10	20-40
6	inakt. β-prop. + Al(OH) ₃	10	160-640
6	inakt. β-prop.	10	40-80
6	aten.	10	80-320
6	aten. + Al(OH) ₃	10	80-160

inakt. – szczepionka inaktywowana, aten. – szczepionka atenuowana, form. – formalina, prop. – β-propiolakton, BEI – Binary Ethylene Imine.

Przedstawione wyniki jednoznacznie wskazują na możliwość użycia w immunoprofilaktyce zakażeń parwovirusowych lisów i nerek szczepionki zawierającej wirus inaktywowany β-propiolaktonem. Jej właściwości immunogenne są równorzędne z immunogennością szczepionki Foxvac Parwo.

Literatura

1. Bahnemann H.G., Auge de Millo P., Abaracon D., (1974), Bull. Off. Int. Epiz., 81, 11 – 12.
2. Fagg R. H., (1965), *Commission Europeenne de lutte contre la fièvre aphteuse, reunion* FAO, Lyon.
3. Górski C., (1982), Praca habilitacyjna.
4. Górski J., Zwierzchowski J., Mizak B., Daniel A., (1993), Acta Microbiol. Polon., 42, 157 – 158.
5. Górski J., Daniel A., Mizak B., Zwierzchowski J., (1993), Bull. Vet. Inst. Puławy, 38, 59-60.
6. Górski J., Mizak B., Kęsy A., Paprocka G., (1995), Foxvac Parwo — dokumentacja technologii produkcji i kontroli szczepionki, Puławy.
7. Kariatsumari T., Horiuchi M., Hama E., Yaguchi K., Ishiguro N., Goto H., Shinagawa M., (1991), J. General. Virol., 72, 867 – 869.
8. Larski Z., (1971), *Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt*, PWRiL, Warszawa.
9. Mizak B., (1994), Bull. Vet. Inst. Puławy, 38, 98-100.
10. Mizak B., Górski J., (1966), Medycyna Wet., (druku).
11. Mizak B., Górski J., (1966), Medycyna Wet., (w druku).
12. Reed P., Jones E. V., Miller T. J., (1988), J. Virol., 62, 266 – 268.
13. Rowlands D. J., Sangar D. V., Brown F., (1972), Arch. Ges. Virusforsch., 39, 274 – 276.
14. Veijalainen P., (1987), National Veterinary Institute, Helsinki, praca doktorska.
15. Veijalainen P., (1988), Vet. Microbiol., 16, 219-221.

Inactivated vaccine against fox and mink parvovirus infection

Summary

Parvovirus infections were demonstrated to be the main reason for reproductive losses in fox and mink breeding farms in Poland. A close serological and genetical relationship between blue fox parvovirus and mink enteritis virus was confirmed. Based on this finding, experimental vaccines containing live attenuated and inactivated mink enteritis virus (strain MEV-143) were prepared. Both vaccines were safe and immunogenic when administered in foxes and minks. Among the inactivated vaccines, the MEV-143 virus inactivated with β -propiolactone demonstrated best antigenic properties. The level of antibodies in the sera of immunized animals was equal to antibody titre induced by attenuated virus of Polish vaccine Foxvac Parwo or reference vaccines Biovac D and Nordent vet.

Key words:

vaccine, fox, mink, antibody level, virus.

Adres do korespondencji:

Beata Mizak, Zakład Chorób Zwierząt Mięsożernych i Futerkowych,
Państwowy Instytut Weterynaryjny, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy.