

Wpływ zmienności wirusa grypy koni na skuteczność szczepień ochronnych

Jerzy Kita, Magdalena Zaleska

z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

Grypa koni należy do bardzo zaraźliwych chorób wirusowych. W związku z tym szczepienie jest ważną częścią postępowania w zapobieganiu tej chorobie, szczególnie u koni sportowych odbywających często podróże na zawody lub pokazy oraz u koni na torach wyścigowych. Szczepionka przeciwko grypie koni wzbudza ochronną odporność podobną do uzyskanej w przebiegu naturalnego zakażenia, zapobiega klinicznemu objawom choroby i siewstwu wirusa. Jednak w praktyce, z uwagi na zmienność antygenową wirusa, skuteczna immunoprofilaktyka napotyka na pewne trudności. Podobnie jak to jest u ludzi, przeciwciała neutralizujące wytworzone przeciwko antygenom wirusa zawartym w szczepionce nie będą w pełni chronić przed zakażeniem innymi lub zmienionymi szczepami wirusa. To jest główną przyczyną okresowego występowania grypy u koni szczepionych. Należy także pamiętać, że odporność poszczepiona różni się w pewnym stopniu od odporności powstałej w następstwie naturalnego zakażenia EIV. Wprawdzie inaktywowana szczepionka z dodatkiem adiuwantu stymuluje na ogół wytworzenie dość wysokiego poziomu przeciwciał przeciwko białku hemaglutyniny wirusa szczepionkowego o działaniu ochronnym w stosunku do spokrewnionych wirusów terenowych, jednak poziom ten nie utrzymuje się zbyt długo. Uważa się także, że szczepionki inaktywowane nie stymulują dobrej odporności komórkowej, która wspólnie z przeciwciałami ułatwia ochronę krzyżową przed szczepami terenowymi niewiele różniącymi się od wirusa szczepionkowego. W związku z tym prowadzi się badania nad uzyskaniem nowych szczepionek udoskonalonych technologicznie przez zastosowanie nowych adiuwantów zwiększających odporność poszczepioną u koni. Tym samym stała, niewielka zmienność wirusa (antigenic drift) pozostaje nadal przyczyną okresowego uaktualnienia szczepów EIV używanych do produkcji szczepionek.

Wirus grypy koni należy do wirusów grypy grupy A i ma na swojej powierzchni dwie ważne glikoproteiny hemaglutyninę (HA) i neuraminidazę (NA), które odgrywają istotną rolę w cyklu replikacyjnym wirusa. Glikoproteiny te są wykorzystywane do identyfikacji podtypów wirusów grypy H3N8. Szczepy wirusów określane jako

H7N7, które krążyły stale w populacji koni nie były już od wielu lat izolowane z przypadków terenowych. Hemaglutynina odgrywa ważną rolę we wnikanii wirusa do komórek nabłonkowych układu oddechowego, bowiem łączy się swoiście z receptorem na tych komórkach. Natomiast neuraminidaza ułatwia uwalnianie wirusa z komórek i utrudnia bariere śluzowej ochronę układu oddechowego. Oba te białka są wysoce immunogenne i stymulują humoralną odpowiedź immunologiczną u naturalnie zakażonych zwierząt. Wobec tego jednak, że białka te podlegają również zmienności antygenowej stopniowo pogłębiające się różnice aminokwasowe pomiędzy nimi mogą prowadzić do obniżenia zdolności rozpoznawania i neutralizowania HA i NA przez krążące przeciwciała.

Szczepienia przeciwko grypie koni umożliwiają zapobieganie masowym wybuchom choroby czy enzootiom, pod warunkiem że szczepionkę sporządzono z odpowiednich szczepów EIV, które reprezentują szczepy wirusa aktualnie krążące w populacji koni. Wówczas szczepienia wraz z innymi elementami środowiskowymi i kondycją koni gwarantują lepszą odporność. Dla przykładu, dawne szczepionki, które zawierały szczep A/equine/Miami/63, dobrze chroniły przed zakażeniami szczepami terenowymi EIV izolowanymi w latach 60. XX wieku. Natomiast trudno oczekiwać, że szczepionki te będą zapobiegać zakażeniom wirusami grypy aktualnie krążącymi w populacji koni. Warto przypomnieć wybuch grypy koni w Europie w 1979 r., w przebiegu którego chorowały zarówno konie szczepione, jak i nieszczepione (2, 3, 4). Kolejny przykład, wybuch grypy w 1989 r., gdy choroba atakowała również konie ostatnio szczepione. Przytoczone przykłady potwierdzają negatywny wpływ zmienności wirusa grypy na wartość profilaktycznych szczepień u koni. Przywołane epizootie w Wielkiej Brytanii wskazują na dość regularne pojawianie się nowych szczepów EIV w cyklach 10–15-letnich. Badania potwierdziły, że wystarczająca zmiana jednego lub dwu aminokwasów w białku HA, aby spowodować znaczącą różnicę antygenową. Ten rodzaj zmian może pojawić się dość szybko, co potwierdza konieczność ciągłego monitorowania szczepów terenowych wirusa (1, 5). Białko HA wirusa grypy jest odpowiedzialne za

The influence of equine influenza virus genetic instability on the vaccination efficacy in horses

Kita J., Zaleska M., Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

The purpose of this paper was to present and discuss genetic instability of equine influenza virus (EIV) in the context of vaccination efficacy in horses. Equine influenza (EI) is the most infectious respiratory diseases of horses. Vaccination is a very important part of control programmes. Vaccine would also reduce natural infection, protect against clinical disease and prevent virus shedding. However, possible antigenic drift of EIV makes prophylactic programmes for equine influenza difficult to successful implementation. The antigenic drift forces to remember that the strains used for vaccine production should be updated periodically. The current recommendation for vaccine production are Florida clade-1 EI virus such as A/equine/Ohio/03 and Florida clade-2 virus represented by A/equine/Richmond/07. Clade-2 strains currently predominate in Europe and clade-1 dominates in the North and South America. Nevertheless, this situation may change due to intensive movement of horses between countries.

Keywords: equine influenza, antigenic drift, vaccines.

rozpoznanie receptora powierzchniowego i przyłączenie się za jego pośrednictwem do komórki gospodarza. Reakcja ta umożliwia wirusowi zakażenie komórki. Przeciwciała skierowane przeciwko hemaglutyninie mają działanie neutralizujące, blokują reakcję łączenia wirusa z receptorem komórkowym i w ten sposób zapobiegają zakażeniu wrażliwych komórek. Tak więc przeciwciała neutralizujące hemaglutyninę wirusową mogą także odgrywać rolę w zmienności wirusa przez brak wychwytywania niektórych fragmentów hemaglutyniny. Doświadczenia zdobyte w pracach nad wirusem grypy ludzi pozwalają mieć nadzieję na opracowanie bardziej uniwersalnej szczepionki (1).

Przeciwciała przeciwko hemaglutyninie dobrze chronią zwierzę przed zakażeniem, jednak ich działanie jest utrudnione przez zmienność antygenową wirusa. W przypadku zakażenia szczepem różniącym się antygenowo od wirusa szczepionkowego, zwłaszcza gdy te różnice są znaczne, jedynie bardzo wysoki poziom przeciwciał neutralizujących może częściowo przeciwdziałać zakażeniu. Dlatego tak ważne jest aktualizowanie szczepionek przeciwko grypie w oparciu o monitorowanie występowania EIV w terenie (1, 5).

Im większe różnice antygenowe występują pomiędzy szczepem szczepionkowym i krążącymi w terenie szczepami wirusa

grypy koni, tym większe jest zagrożenie wybuchem choroby. W ostatnich latach przeprowadzono wiele doświadczeń nad krzyżową odpornością przeciwwirusową, które potwierdziły te obserwacje. Otóż konie zaszczone mogą ulec zakażeniu, jednak wytworzona odporność poszczepienna będzie je chronić przed wystąpieniem objawów klinicznych choroby, ale nie musi zaopiegiwać siewstwu wirusa. Takie zwierzęta stanowią bezpośrednie zagrożenie dla nieszczepionych koni wrażliwych. Wykazano, że nieszczepione kuce pozostawione na padoku uległy zakażeniu przez konie szczepione przeciwko grypie, które wróciły niedawno do stada po zawodach lub pokazach. Taka sytuacja miała miejsce w przypadku wybuchu grypy koni w Australii, kiedy wprowadzono wirus grypy do stada za pośrednictwem koni szczepionych, zakażonych subklinicznie nowym szczepem wirusa terenowego. W opisywanym przypadku zakażeniu uległy i zachorowały setki koni. Jak wynika z tych danych, obecnie stosowane szczepionki skutecznie chronią przed wystąpieniem objawów klinicznych i obniżają wydalanie wirusa przez konie zaszczone, które uległy naturalnemu zakażeniu szczepem terenowym. Oczekiwania hodowców idą jednak w kierunku opracowania takiej szczepionki, której stosowanie będzie pozwalać na bezpieczne łączenie koni szczepionych z nieszczepionymi. Ograniczanie siewstwu wirusa jest skorelowane ze stopniem podobieństwa antygenowego pomiędzy szczepem szczepionkowym i szczepem terenowym, który zakażył konie zaszczone. Badania nad przebiegiem wybuchów grypy koni w Irlandii w latach 2010–2012 potwierdziły, że krzyżowa odporność po szczepieniu jest niewielka i zależy od wielkości różnic antygenowych pomiędzy wirusem szczepionkowym i szczepami krążącymi w danej populacji koni (4). W związku z tym w sytuacji pojawienia się nowych terenowych wariantów wirusa grypy koni wymagany jest wyższy poziom przeciwciał neutralizujących, mierzony testem pojedynczej radialnej hemolizy (SRH), niż ma to miejsce w przypadku większego podobieństwa antygenowego pomiędzy wirusem szczepionkowym i terenowymi szczepami wirusa (1).

Od 2000 r. większość izolowanych od koni wirusów grypy należała do podlinii Floryda amerykańskiej linii EIV. To one były odpowiedzialne za większość wybuchów choroby w Wielkiej Brytanii i Południowej Afryce w 2003 r., w Australii w 2007 r. oraz w kilku krajach azjatyckich pomiędzy 2007 r. i 2012 r., a także w Ameryce Południowej w 2012 r. Wymienione podlinie zostały podzielone na Floryda kład-1 i Floryda kład-2 w oparciu o wyniki badań genetycznych i różnice antygenowe szczepów wirusa grypy

koni izolowanych w Stanach Zjednoczonych Ameryki. W USA dominują wirusy należące do kładu -1, podczas gdy w Europie dominują szczepy należące do kładu -2l, ale także w Europie zdarzały się wybuchy grypy koni wywołane przez szczepy należące do kładu-1. Przykładami są Wielka Brytania, Francja i Irlandia (2, 3, 4, 5). Zatem obecnie uważa się, że oba klady linii Floryda powinny być używane do produkcji szczepionek przeciwko grypie koni w celu uzyskania optymalnej ochrony. Poprzednio rekomendowano szczepy wirusów do produkcji szczepionki należące do linii europejskiej, jak A/equine/Suffolk/89, A/equine/Borlange/91 i A/equine/Newmarket/2/93. Szczepy te jednak od 2005 r. nie były izolowane z przypadków grypy u koni ani w Wielkiej Brytanii, ani w Irlandii.

Światowa Organizacja Zdrowia Zwierząt (OIE) jest odpowiedzialna za rekomendowanie odpowiednich szczepów wirusów do produkcji szczepionek. W związku z tym każdego roku wirusy izolowane od chorych koni są poddawane szczegółowej charakterystyce w referencyjnych laboratoriach OIE. Następnie zespół specjalistów OIE z laboratoriów referencyjnych wraz ze specjalistami z krajów europejskich i USA co roku analizuje występujące szczepy terenowe, a także zakażenia u koni szczepionych i na podstawie badań genetycznych porównuje się izolaty terenowe ze szczepem szczepionkowym. W oparciu o wspomniane wyniki badań rekomenduje się określone szczepy EIV do produkcji szczepionki. Ostatnie rekomendacje OIE zalecają jako szczepionkowe szczepy należące do Floryda kład-1, do którego należy A/equine/Ohio/03 oraz kład-2, który jest reprezentowany przez szczep A/equine/Richmond/07. Obecnie kład-2 dominuje w Europie, a kład-1 w Ameryce Północnej i Południowej, chociaż ta sytuacja może ulec szybkiej zmianie w przypadku ruchu koni między kontynentami.

Z badań autorów polskich wynika, że szczepy wirusa grypy koni izolowane w latach 2005–2006 należały zarówno do linii europejskiej (A/eq/Pulawy/05), jak i linii amerykańskiej (A/eq/Pulawy/06) (6). Proces doboru szczepów szczepionkowych zależy więc od kolekcji szczepów izolowanych od koni zakażonych EIV. Bardzo ważny jest więc ciągły monitoring grypy koni przy współpracy lekarzy praktyków i zabezpieczeniu koniecznych funduszy.

Zaleca się szczepienie przeciwko grypie wszystkich koni w stadzie począwszy od 6 miesiąca życia. Oznacza to, że wszystkie konie w danym stadzie powyżej 6 miesiąca życia powinny otrzymać pierwsze, podstawowe szczepienie z planowanych dwóch i pierwszego doszczepienia, tzw. booster, po 5–6 miesiącach, a następnie regularne doszczepianie zwierząt co 6 miesięcy. Konie

na ogół wykazują dość wyrównaną poszczepienną odpowiedź immunologiczną i poziom przeciwciał neutralizujących, co pozwala na ochronę szczepionych koni przed grypą (4, 7). Mogą jednak wystąpić indywidualne różnice w humoralnej odpowiedzi immunologicznej po szczepieniu, które zależą od wielu czynników, w tym między innymi od: odporności wrodzonej, wieku, stresu treningu, zmiany diety, transportu i innych, które odnotowano w praktyce (8). Epidemiologicznie przyjmuje się, że dana populacja koni jest chroniona przed szerzeniem się zakażenia, jeśli przynajmniej 75% zwierząt w populacji w danym stadzie zostało zaszczone przeciwko grypie i ciężcowi (7, 9). Potwierdzają to badania przeprowadzone w Wielkiej Brytanii, z których wynikało, że jeśli tylko 45% danej populacji koni zostało zaszczone, nie hamowało to transmisji wirusa. Hodowcy często, chcąc uniknąć szczepienia, zapewniają, że ich konie nie mają kontaktu z innymi końmi. Należy jednak pamiętać, że grypa koni należy do najszybciej szerzących się chorób zakaźnych, a wirus grypy rozprzestrzenia się zarówno drogą bezpośrednią, jak i pośrednią. Wykazano, że wirus w aerozolu przy pomocy wiatru może być przeniesiony na odległość 1–2 km, a w przypadku szczególnych nawet do kilku kilometrów. Zdarzają się też przypadki przełamania odporności poszczepiennej i wymagają one dalszych badań (9)

Piśmiennictwo

1. Elton D. and Cullinane: Equine influenza: Antigenic drift and implication for vaccines. *Equine Vet. J.* 2013, **45**, 768–769.
2. Burrows R., Goodridge D., Denyer M., Hutchings G. and Frank C.J. Equine influenza infections in Great Britain. *Vet. Rec.* 1979, **110**, 494–497.
3. Bryant N.A., Rash A.S., Woodward A.L., Medcalf E., Helweggen M., Wohlender F., Cruz F., Hermann C., Borchers K., Tiwart A., Chambers T.M., Newton J.B., Mumford J.A., and Elton D.M.: Isolation and characterization of equine influenza viruses (H3N8) from Europe and North America from 2008 to 2009. *Vet. Microbiol.* 2011, **147**, 19–27.
4. Gildes S., Arkins S., and Cullinane A.: Management and environmental factors involved in equine influenza outbreaks in Ireland 2007–2010. *Equine Vet. J.* 2011, **43**, 608–617.
5. Legrand I.J., Pitel P.H.Y., Marcillaud – Pitel C.J., Cilliane A.A., Caurouze A.M., Fortier G.D., Freymuth F.I., and Pronost S.I.: Surveillance of equine influenza viruses through the RESPE network in France from November 2005 to October 2010. *Equine Vet. J.* 2013, **45**, 776–783.
6. Rożek W., Purzycka M., Polak M.P., Grądzki Z., Zmudzinski J.E.: Genetic typing of equine virus isolated in Poland in 2005 and 2006. *Virus Res.* 2009, **145**, 121–126.
7. Heiders J. G. M., Pouwels H. G. W., Derks C. G. G., Van de Zaride S.M. A. a Hoelijmakers M.J.H. Duration of immunity induced by an equine influenza and tetanus combination vaccine formulation adjuvanted with ISCOM E matrix. *Vaccine* 2010, **28**, 6989–6996.
8. Gildea S., Arkins S., Walsh C., Cullinane A. A comparison of antibody responses to commercial equine influenza vaccines following primary vaccination of Thoroughbred weanlings – a randomized blind study. *Vaccine* 2011, **29**, 9214–9223.
9. Horspool L.J.I. and King A.: Equine influenza vaccines in Europe: A view from the animal health industry. *Equine Vet. J.* 2013, **45**, 774–775.

Prof. dr hab. Jerzy Kita, e-mail: jerzy_kita@sggw.pl