

Mielcarska M.B.¹, Puchalska M.D.², Toka F.N.¹,
Department of Preclinical Sciences¹, Department
of Food Hygiene and Public Health Protection²
Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University
of Life Sciences – SGGW

The aim of this paper was to present new strategies in foot-and-mouth disease (FMD) control programs. FMD is one of the most contagious, acute animal diseases of all cloven-footed animal species and still remains the main scourge of livestock. Spread is very rapid and the virus is very resistant. FMD virus (FMDV), a picornavirus, has evolved many strategies to bypass host immune response. This paper presents an overview of the new pathways in preventing and combating the disease. There are also updated information on the animal hosts response to FMDV infection. The possibility to induce protective immune response to a selected virus strain and to use appropriate markers for distinguishing vaccinated from infected animals (DIVA), are benefits of the new FMD vaccines. The design of new vaccines is crucial for protection improvement of the animal sector in agriculture.

Keywords: FMD, FMDV, recombinant vaccines.

Celem tego artykułu jest przedstawienie najnowszych danych na temat wirusa pryszczycy, odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zakażenia, a także przegląd prac dotyczących szczepień przeciw tej chorobie.

Natura czynnika zakaźnego

Pryszczycza jest chorobą wywołaną przez wirus pryszczycy (rodzaj *Aphthovirus*), należący do rodziny *Picornaviridae*. Jest on pierwszym zwierzęcym wirusem

Pryszczycza – nowe metody zapobiegania i zwalczania

Matylda B. Mielcarska¹, Martyna D. Puchalska², Felix N. Toka¹

z Katedry Nauk Przedklinicznych¹ oraz Katedry Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego² Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

zidentyfikowanym jako czynnik etiologiczny choroby opisanej już w XVI w. (1). Pojedynczy wirion ma postać kulistą o średnicy około 25 nm i składa się z materiału genetycznego stanowiącego jednoniciowy RNA o dodatniej polarności zbudowany z około 8500 zasad, otoczonego 60 kopiami czterech białek strukturalnych – VP1 (Viral Protein 1) (1D), VP2 (Viral Protein 2) (1B), VP3 (1C) (Viral Protein 3) i VP4 (Viral Protein 4) (1A) – tworzących dwudziestościenny kapsyd (1). Obecnie znanych jest 7 serotypów wirusa, A, O, C, Asia 1, SAT 1, SAT 2 i SAT 3, w obrębie których zidentyfikowano wiele podtypów. Występowanie poszczególnych serotypów jest zróżnicowane. W Europie i Ameryce Południowej zidentyfikowano serotypy O, A i C, podczas gdy w Azji potwierdzono występowanie serotypów O, A i Asia 1. Występowanie serotypów SAT (South African territories) jest charakterystyczne dla terenów Afryki, przy czym serotypy SAT 1 i SAT 2 stwierdzane są na terenie całego kontynentu, a występowanie serotypu SAT 3 jest ograniczone jedynie do terenów Afryki Południowej (2). **Rycina 1** przedstawia występowanie poszczególnych serotypów wirusa pryszczycy na świecie.

Materiał genetyczny wirusa jest wysoce podatny na mutacje, a przyczyną powstawania nowych wariantów wirusa jest jego ciągła cyrkulacja w środowisku. Ze względu na brak mechanizmów

naprawy błędów powstałych podczas replikacji RNA, w trakcie tego procesu u wirusów RNA, a w szczególności u wirusa pryszczycy, mutacji może ulec jedna na 10³ do 10⁵ par zasad (19). Oznacza to, że genom wirusa potomnego może różnić się od rodzicielskiego w granicach od 0,1 do 10 par zasad (20). Należy zatem przyjąć, że w każdej populacji wirusa wszystkie sekwencje genomu nie są identyczne.

W przypadku wirusa pryszczycy nie istnieje „typ dziki”, lecz tak zwany „typ pośredni”, który jest przystosowany do replikacji z najlepszą wydajnością w danym środowisku. Środowiskiem tym może być zarówno hodowla komórkowa, jak i organizm zwierzęcia wrażliwego na zakażenie. W każdej sytuacji na powstanie nowego typu wirusa mogą mieć wpływ warunki, takie jak temperatura, pH, czy presja immunologiczna. Zmienność antygenowa wirusa w środowisku wzrasta wraz z upływem czasu, co najprawdopodobniej wynika z presji immunologicznej wywieranej na wirus przez organizm gospodarza – zarówno zwierząt zakażonych, jak i szczepionych (21). Należy więc na uwagę, że nawet najlepsza szczepionka może wywołać presję immunologiczną w obrębie populacji, co może prowadzić do powstania nowego wariantu wirusa. Zmienność wirusa pryszczycy objawia się, gdy mutacje prowadzą do zmian kodonów odpowiadających za

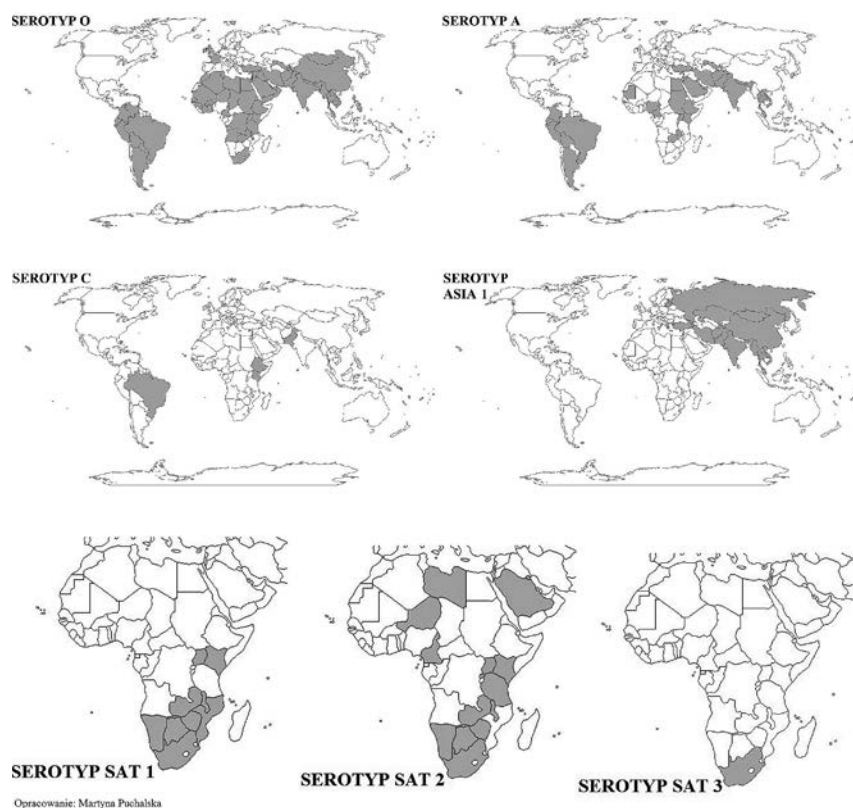
fenotyp wirusowy, a większość tych zmian następuje w regionie zawierającym geny kapsydu (region P1). Mutacje występują również w regionach genomu kodujących białka NS (non structural), jednak, ponieważ regiony te są istotne w replikacji wirusa, zmiany w nich są często przyczyną powstawania niereplikujących się wirusów. Poza zmiennością wirusa spowodowaną mutacjami, udowodniono również, że RNA wirusa pryszczycy może ulegać rekombinacji w hodowlach komórkowych (22). Obserwacja ta ma odzwierciedlenie w produkcji szczepionek, po pewnej liczbie pasażów zakażonych komórek z dużym prawdopodobieństwem powstanie nowy wariant wirusa, co może skutkować tym, że wirus zastosowany do produkcji danej szczepionki nie zapewni odpowiedniej ochrony antygenowej (1).

Analiza sekwencji genomu wirusa i jego zmienności antygenowej, która ma znaczenie w poszukiwaniu źródła choroby, są nie do przecenienia podczas badań epidemiologicznych prowadzonych w miejscach, gdzie nastąpił wybuch choroby, w krajach, w których choroba występuje enzootycznie, jak również w przypadkach podejrzenia celowego wprowadzenia wirusa do środowiska (23). Należy podkreślić, że choć wirus pryszczycy wykazuje dużą zmienność antygenową, zmiany są ograniczone do ściśle określonych obszarów powierzchni wirusa, ponieważ obecne w innych regionach kapsydu zagrażałyby integralności struktury wirusowej (21).

Przebieg zakażenia u różnych gatunków zwierząt

Na zakażenia wirusem pryszczycy wrażliwe są liczne gatunki zwierząt parzystonopnych, zarówno gospodarskich, jak i dzikich (1, 3), przy czym mechanizm powstawania choroby został najlepiej poznany u bydła i trzody chlewnej.

U bydła do zakażeń dochodzi głównie drogą oddechową. Możliwe są również zakażenia w wyniku przeniknięcia wirusa do organizmu przez uszkodzoną skórę lub przez błony śluzowe, ale w tych przypadkach dawka wirusa musi być około 10 tys. razy większa (1). Możliwe jest również zakażenie przez kontakt bezpośredni oraz w wyniku mechanicznego przeniesienia wirusa za pośrednictwem człowieka i zwierząt, na przykład ptaków (3). Zakażone zwierzęta wydają duże ilości wirusa licznymi drogami, m.in. z mlekiem, moczem, kałem i wydychanym powietrzem, co sprzyja łatwemu przeniesieniu się zakażenia na inne zwierzęta w stadzie, w tym na cielęta, a także na inne gatunki wrażliwe (1, 4). Liczne badania wskazują, że w wyniku zakażenia drogą oddechową pierwotnym miejscem namnażania się



Opracowanie: Martyna Puchalska

Ryc. 1. Występowanie poszczególnych serotypów wirusa pryszczycy na świecie wg World Reference Laboratory for FMD (http://www.wrlfmd.org/maps/fmd_maps.htm)

wirusa w organizmie zakażonego bydła jest nabłonek okolicy gardła (5, 6, 7) lub płuc, skąd wirus szybko rozprzestrzenia się na nabłonki jamy ustnej (język, podniebienie miękkie, migdałki) i kończyn (szpary międzyrurkowe, koronki rąbic; 6, 8). U zakażonego bydła, po upływie okresu inkubacji trwającego od 2 do 14 dni, występują pierwsze objawy kliniczne w postaci gorączki i pęcherzy lokalizujących się w charakterystycznych okolicach, takich jak język, koronki rąbic i szpary międzyrurkowe, nierzadko dochodzi również do rozwoju wiremii. Ponadto w wyniku uszkodzeń pęcherzy występujących w miejscach predysponowanych do urazów mechanicznych, na przykład w okolicach kończyn, może dochodzić do wtórnych zakażeń bakteryjnych i powstania owrzodzeń (1).

Do zakażeń świń zwykle dochodzi za pośrednictwem spożywania paszy zanieczyszczonej wirusem, przez kontakt bezpośredni z zakażonymi zwierzętami lub w wyniku umieszczenia niezakażonych zwierząt w obiektach, w których wcześniej przebywały zwierzęta zakażone. Na uwagę zasługuje fakt, że mimo mniejszej wrażliwości na zakażenie drogą oddechową niż u bydła, owiec i kóz (1, 11, 12), świnię mogą wydalac od tych gatunków znacznie większe ilości wirusa w wydychanym powietrzu (1, 12, 13). Okres inkubacji choroby u trzody chlewnej wynosi od

2 do 14 dni, przy czym zwykle nie przekracza on 11 dni. U chorych zwierząt pojawia się wiremia, gorączka, która zwykle nie przekracza 39–40°C, oraz kulawizna. Zwierzęta są ospałe i tracą apetyt. Charakterystyczne dla pryszczycy pęcherze występują głównie na kończynach (koronka rąbic, piętka), rzadziej na języku i w okolicy języka (1, 14), przy czym pęcherze w okolicy języka są zwykle małe i mniej widoczne niż u bydła (14). U prosiąt może dochodzić do padnięć w wyniku rozwoju zapalenia mięśnia sercowego związanego z zakażeniem (1).

Owce i kozy, podobnie jak bydło, wykazują dużą wrażliwość na zakażenia drogą oddechową, a także przez kontakt z zakażonymi zwierzętami (1, 9). Mimo to objawy choroby, takie jak gorączka, pęcherze lokalizujące się w okolicy jamy ustnej, kończyn i wymienia oraz wiremia, są u tych gatunków bardzo słabo wyrażone i mogą zostać niezauważone, a pierwszym widocznym objawem choroby często jest kulawizna. Według danych literaturowych (1, 10) nawet u 25% zakażonych owiec może nie dochodzić do rozwoju charakterystycznych zmian, a u kolejnych 20% mogą pojawić się jedynie pojedyncze pęcherze. W związku z tym oraz z wydalaniem przez ten gatunek dużej ilości wirusa w wydychanym powietrzu owce stanowią ważne źródło zakażeń wirusem pryszczycy dla innych

wrażliwych gatunków i mogą odgrywać ważną rolę podczas epidemii (1). Z kolei u jagniąt może dochodzić do nagłych padnięć w wyniku niewydolności serca rozwijającej się w związku z zakażeniem wirusem pryszczycy (9).

Na zakażenie wirusem pryszczycy wrażliwe są również liczne gatunki zwierząt nieudomowionych, chociaż ich rola w epidemiologii pryszczycy nie jest do końca poznana. Źródłem większości informacji są badania opierające się na zakażeniach eksperymentalnych różnych gatunków zwierząt, często pomijających kwestie związane z możliwością utrzymywania się zakażenia na poziomie populacji, które mogłoby skutkować przeniesieniem zakażenia na inne wrażliwe gatunki. Ponadto mimo że możliwe jest eksperymentalne zakażenie wielu gatunków zwierząt nieudomowionych, nie oznacza to, że wszystkie te gatunki ulegają zakażeniu w warunkach naturalnych. Na przykład, dzięki często stosowanej metodzie eksperymentalnego zakażenia zwierząt przez śródskórne podanie wirusa, możliwe jest zakażenie licznych gatunków ptaków i ryb, ale jednocześnie nie ma dowodów, że gatunki te mogą ulec zakażeniu w wyniku kontaktu z zakaźnym aerozolem (15).

Od zwierząt nieudomowionych izolowano wszystkie siedem serotypów wirusa pryszczycy. Z wyjątkiem serotypów SAT izolowanych od bawołów afrykańskich, wszystkie serotypy wirusa występują endemicznie u zwierząt gospodarskich i nie ma dowodów na to, że wśród zwierząt nieudomowionych istnieją ich rezerwuary (15). Zakażone zwierzęta wykazują podobne objawy do tych występujących u zwierząt gospodarskich, a ich nasilenie zależy od wrażliwości danego gatunku na zakażenie, serotypu wirusa, a także od dawki wirusa i odporności osobniczej (15, 16).

Rozwój odporności przeciwzakaźnej

Wirus w organizmie gospodarza wywołuje odpowiedź humoralną, podczas której produkowane są swoiste przeciwciała. Chronią one jedynie przed zakażeniem danym serotypem wirusa (24). Odpowiedź gospodarza skierowana jest przeciw epitopom białek strukturalnych kapsydu wirusa. Przeciwciała przeciw wirusowi pryszczycy pojawiają się też w wydzielinach górnych dróg oddechowych już we wczesnym stadium zakażenia (25), a makrofagi biorą udział w usuwaniu opsonizowanego wirusa (26).

W przypadku zakażenia komórek jednoniciowy RNA służy jako matryca do translacji białek. Dowiedziono, że część białek wirusa zakłóca odpowiedź

immunologiczną gospodarza (27). Proteaza L^{pro} dokonuje cięcia czynnika inicjacji translacji białek gospodarza eIF4G, jak również sprzyja degradacji NF-κB, czynnika transkrypcyjnego dla syntezy interferonu beta (IFN-β; 28). Powoduje to w rezultacie spadek poziomu IFN-α i -β, na działanie których wirus jest wrażliwy (29). Ponieważ wirus osłabia produkcję interferonów typu I, hamowana jest odpowiedź wielu populacji komórek dendrytycznych (30). Dowiedziono również, że proteaza wirusowa 3C^{pro} może dokonywać cięcia histonu H3, co również obniża poziom transkrypcji i translacji w komórce (31). W pobliżu 5' końca genomu wirusa znajduje się sekwencja nukleotydowa IRES (internal ribosome entry site), która oddziałując z eukariotycznym rybosomem uruchamia syntezę białek wirusowych, podczas gdy hamowana jest translacja białek gospodarza (32). Dojrzałe białka wirusowe 2B i 2C zakłócają także zdolność wydzielniczą komórki (33). Wszystkie powyższe procesy mogą tłumaczyć, dlaczego w komórkach zakażonych wirusem pryszczycy hamowana jest translacja i ekspresja na ich powierzchni głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I (MHC I; 34). W kompleksie tym prezentowane są na powierzchni zakażonych komórek obce antygeny – 8–12-aminokwasowe peptydy przetworzone w proteasomach, a następnie siateczce śródplazmatycznej. Aktywują one limfocyty T cytotosyczne (CD8⁺), które dzięki oddziaływaniu ligandów Fas-Fas, a także wydzielaniu perforyn i granzymów doprowadzają do śmierci zakażonych komórek. Dogłębne poznanie sposobu prezentacji antygeny cytotosycznym limfocytom jest istotnym krokiem podczas projektowania szczepionek przeciw wirusowych (35). W przeciwieństwie do przeciwciał, które rozpoznają złożone antygeny, limfocyty CD8⁺ mają zdolność do rozpoznawania także innych epitopów, co czyni je istotnymi komórkami w trakcie tworzenia odporności przeciw wirusowi pryszczycy (36). Podczas zakażenia obserwuje się przewlekłą limfopenię (37). U świń przez pierwsze 2 dni zakażenia limfopenia dotyczy limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ oraz CD4⁺/CD8⁺. Aktywność limfocytów T, mierzona odpowiedzią tych komórek na mitogeny, jest znacznie obniżona bądź zanika, aby powrócić do pierwotnego poziomu ok. 4 dni od momentu zakażenia (1).

Limfopenia, a także zdolność wirusa do obniżania ekspresji MHC I w trakcie zakażenia nasuwają podejrzenie, że jest to przyczyną powstawania niedostatecznej ilości specyficznych względem wirusa limfocytów T (38), co sugeruje, że w procesie zwalczania wirusa istotną rolę pełni odpowiedź komórkowa (39, 40).

W trakcie ostrej fazy choroby upośledzone zostaje również funkcjonowanie komórek NK, które zdolne są do lizy komórek zwierzęcych zakażonych wirusem (41). Ponadto u szczepionych, a także szczepionych i zakażonych świń obserwowano podwyższony poziom interleukiny-6 (IL-6), IL-8 i IL-12 w osoczu (1). Świadczy to o znaczeniu wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w obronie przeciw wirusowej.

Szczepienia, postępowanie podczas wybuchu choroby

Pryszczycyca jest chorobą, która w Polsce podlega obowiązkowi urzędowego zwalczania na mocy ustawy z 11 marca 2004 o ochronie zdrowia zwierząt i zwalczaniu chorób zakaźnych. Na terenie Unii Europejskiej obowiązuje zakaz szczepień przeciwko tej chorobie, ponieważ niemożliwe jest rozróżnianie zwierząt szczepionych od nosicieli wirusa, a także zwierząt w okresie inkubacji choroby.

W ściśle określonych sytuacjach dozwolone są szczepienia interwencyjne. W Europie, jak również w świecie znajdują się banki szczepionek, w których są one magazynowane i aktualizowane. Import zwierząt ograniczany jest wyłącznie do krajów uznanych za wolne od choroby, a także w których nie wykonywano szczepień, przynajmniej od 12 miesięcy. Dla sprawnego walki z pryszczycą konieczna jest pełna mobilizacja sił i środków, aby zgłaszać powiatowemu lekarzowi weterynarii każdy przypadek zachorowania lub wystąpienia objawów wzbudzających podejrzenia o chorobę. W celu potwierdzenia zakażenia wirusem materiały do badania pobrane od zwierzęcia wysyła się do wyznaczonego laboratorium, gdzie wykrywane są antygeny wirusa. Wykonuje się to za pomocą testów ELISA, odczynu wiązania dopełniacza (OWD), a także za pomocą reakcji PCR z użyciem starterów specyficznych dla poszczególnych serotypów wirusa. W przypadku wyznaczenia ogniska pryszczycy określa się obszar zapowietrzony oraz obszar zagrożony.

Od początku XX w. podejmowane są próby stworzenia szczepionki przeciw pryszczycy, jednak przeszkodę stanowią liczne serotypy wirusa, a także nieprzewidywalność jego zjadliwości. Skuteczna odpowiedź immunologiczna przeciw danemu serotypowi wirusa powstaje w czasie 7–14 dni, zarówno u zwierząt chorych, jak i zaszczepionych. W związku z tym między momentem szczepienia a wytworzeniem odporności istnieje okno czasowe, w trakcie którego zwierzę może ulec zakażeniu. Możliwość odróżnienia zwierząt szczepionych od zakażonych powinna być istotną cechą dobrej szczepionki,

jednak szczególnie u uprzednio szczepionego bydła może dochodzić do przetrwania i bezobjawowego zakażenia (16, 17). Z zakażeniem wirusem pryszczycy związane jest zjawisko nosicielstwa, do rozwoju którego może dochodzić po przebyciu przez zwierzę ostrej fazy zakażenia lub w wyniku ekspozycji szczepionych zwierząt na zjadliwego wirusa (1). Warto w tym miejscu przypomnieć, że mianem nosiciela nazywamy bezobjawowo zakażone zwierzę, od którego możliwe jest wyizolowanie żywego wirusa z materiału pobranego z gardła co najmniej 28 dni po zakażeniu (1, 15). Według Alexandersena i wsp. (13) istnieją dwa mechanizmy powstawania nosicielstwa. Pierwszy z nich zakłada, że wirus pryszczycy może zakażać komórki układu odpornościowego, dzięki czemu możliwe jest uniknięcie odpowiedzi immunologicznej. Z kolei drugi mechanizm opiera się na wykorzystaniu odpowiedzi immunologicznej gospodarza do zapewnienia sobie korzystnych warunków do długotrwałego utrzymywania się wirusa w organizmie zakażonego zwierzęcia, prawdopodobnie za pośrednictwem działania cytokin (13). Liczne badania wskazują na możliwość rozwoju nosicielstwa u wielu gatunków zwierząt gospodarskich, z wyjątkiem świni domowej, jak i nieudomowionych (1, 13). Mimo potwierzonego występowania nosicielstwa u wielu gatunków zwierząt jego rola w epidemiologii pryszczycy jest kontrowersyjna. Zwykle źródłem nowych zakażeń są zwierzęta w ostrej fazie zakażenia, a jedyny potwierdzony i opisany przypadek przeniesienia zakażenia od nosiciela na zwierzę niezakażone dotyczy transmisji między bawołami afrykańskimi (15) oraz od bawołów afrykańskich na bydło, co dodatkowo zostało potwierdzone w warunkach eksperymentalnych (1, 15). Wirus jest również obecny w nasieniu zwierząt będących nosicielami, dlatego możliwość przeniesienia zakażenia drogą płciową nie powinna być pomijana (1, 15, 18).

Pierwszą szczepionką przeciw pryszczycy była opracowana przez Waldmana i wsp. w 1937 r. (42) z inaktywowanym wirusem. Wtedy to badacze pobierali płyn z pęcherzy występujących w okolicy języka celowo zakażonego bydła, a następnie inaktywowali wirus formaldehydem. Obecnie w krajach, gdzie choroba występuje enzootycznie, również stosowane są domięśniowo szczepionki z inaktywowanym wirusem. Ich wprowadzenie okazało się bardzo skuteczne w zmniejszeniu liczby ognisk choroby. Należy jednak podkreślić, że zapewniają one ochronę przeciwdanemu serotypowi i podtypowi wirusa, ale nie indukują długotrwałej odporności ochronnej. Dostępne szczepionki,

składające się z inaktywowanego wirusa oraz adjuwantów, choć skutecznie zapewniają ochronę przed zakażeniem, nie pozwalają na odróżnienie zwierząt zakażonych od szczepionych (43). Dlatego wprowadzane są testy diagnostyczne oparte na białkach NS wirusa, które nie są obecne w szczepionkach lub stanowią jedynie ich niewielkie zanieczyszczenie (1). Podstawowymi wadami tego typu szczepionek są duży koszt ich produkcji oraz, ze względów bezpieczeństwa, konieczność zapewnienia zamkniętego systemu produkcji.

Szczepionki z atenuowanym wirusem produkuje się za pomocą wielokrotnych pasażów zakażonych komórek w hodowlach komórkowych lub u zwierząt naturalnie niewrażliwych na wirus, takich jak myszy, króliki czy ptaki (ich embriony), do czasu gdy wirulencja wobec bydła lub świń zostanie znacząco osłabiona. Badania z takimi wirusami były przeprowadzane w Afryce, Ameryce Południowej i na Bliskim Wschodzie. W niektórych przypadkach szczepionki z atenuowanym wirusem indukowały ochronę immunologiczną, zdarzało się jednak, że szczepiony wirus atenuowane dla wybranego gospodarza wciąż były zjadliwe wobec innych gatunków zwierząt wrażliwych. Trudnością w produkcji takich szczepionek jest otrzymywanie wirusów atenuowanych i jednocześnie w pełni immunogennych, jednak największy niepokój budzi możliwość powrotu cech zjadliwości atenuowanego wirusa.

W latach 70. ubiegłego wieku odkryto, że białko kapsydu wirusa VP1 ulega znacznej ekspozycji na jego powierzchni (44). Wyizolowane i podawane drogą inokulacji chroniło zarówno świnię, jak i bydło przed zakażeniem (45). Dzięki tej informacji postanowiono opracować szczepionki białkowe jako alternatywę dla szczepionek z inaktywowanym wirusem. Badania nad białkiem ujawniły, że niektóre regiony białka VP1 wykazują zmienność wśród szczepów wirusa. Należące do nich pętla G-H, znajdująca się na powierzchni kapsydu, oraz C-terminalny koniec białka VP1 odpowiadają swojej strukturą epitopom odpowiedzialnym za aktywację limfocytów B. Peptydy zawierające te regiony indukowały powstawanie znacznych ilości przeciwciał neutralizujących u świń, bydła oraz świńek morskich (46). W późniejszym czasie do peptydów zaczęto dołączać inne, rozpoznawane przez limfocyty T. Szybko jednak okazało się, że tworzenie rekombinowanego materiału genetycznego wirusa, który jest wysoce zmienny i podatny na mutacje, chroni stada zwierząt w najlepszym razie w 40%, zaś nowe mutanty wirusa zawierają nowe, inne aminokwas-y w głównych miejscach antygenowych,

reprezentowanych w szczepionkach peptydowych. Wyniki badań wskazują, że szczepionki peptydowe zawierają tylko ograniczoną liczbę miejsc antygenowych i wybrane epitopy wirusa nie są w stanie indukować skutecznej ochrony (1).

Postęp w opracowaniu nowoczesnych szczepionek

Obecnie strategia tworzenia szczepionek skierowana jest wciąż na indukcję odpowiedzi immunologicznej w postaci produkcji przeciwciał neutralizujących (47). Alternatywnym rozwiązaniem dla szczepionek białkowych lub peptydowych jest podawanie pustych kapsydów wirusowych zawierających cały szereg immunogennych cząsteczek. Produkcja pustych kapsydów wirusowych jest jednym z etapów zakażenia komórek i dowiedziono, że są one tak samo immunogenne jak dojrzałe wiriony. Do pozyskiwania pustych kapsydów u ssaków wykorzystywano różne systemy ekspresji, m.in. zrekombinowane bakulowirusy, pokswirusy, a także inne wektory. Jednym z najskuteczniejszych systemów i szczepionką nowej generacji okazał się niezdolny do replikacji ludzki adenowirus typu 5 (Ad5), będący wektorem białek wirusa pryszczycy: prekursora kapsydu P1 oraz proteazy 3C^{pro}, która umożliwia powstanie pustego kapsydu z wyjściowego peptydu powstałego na matrycy wirusowej RNA. Wektor ten zakaża wiele gatunków zwierząt, wśród nich bydło oraz trzodę chlewną i może pomieścić 5–8 tys. par zasad obcego DNA. Szczepionka oparta na Ad5 powstała po potwierdzeniu hipotezy, że przetwarzanie w komórce uszkodzonych lub niekompletnych białek kapsydu sprzyja ukierunkowaniu tych białek do degradacji, co skutecznie zwiększa ilość oraz stężenie antygenów wirusowych prezentowanych w kontekście MHC I (47). Stymuluje to odpowiedź limfocytów CD8⁺ gospodarza. W szczepionce tej, aby zmaksymalizować odpowiedź limfocytów CD8⁺, zastosowano zmutowaną proteazę 3C^{pro}, co hamuje jej zdolność przetwarzania białek regionu P1 wirusa do dojrzałych kapsydów. W wyniku zmniejszonego przetwarzania pierwotnego prekursora polipeptydu wirusowego zwiększana jest ilość peptydów prezentowanych w MHC I, pochodzących z puli białek wirusa (47). Przyczynia się to do zwiększenia stymulacji limfocytów oddziałujących z peptydami wirusa pryszczycy. Szczepionka jest skuteczna u bydła i trzody chlewnej, umożliwia odróżnienie zwierząt szczepionych od zakażonych, a także jest wysoce kompatybilna z testami diagnostycznymi.

Obecnie techniki badawcze i produkcyjne pozwalają na pokonanie

wielu istniejących dotychczas ograniczeń w tworzeniu szczepionek. Na początku XXI w. powstał protokół służący do produkcji szczepionki przeciw pryszczycy z inaktywowanym wirusem. Umożliwia on stosowanie testów serologicznych, które pozwalają na różnicowanie zwierząt szczepionych od zakażonych, a formuła szczepionki zawiera kilka serotypów i podtypów wirusa oraz liczne adiuwanty (43). Z uwagi na kwestie bezpieczeństwa biologicznego kraje takie jak Stany Zjednoczone zakazały produkcji szczepionki na swoim terenie.

Podsumowanie

Badania podstawowe, dobrze poznane zwierzęce modele choroby, narzędzia związane z genetyką oraz biologią obliczeniową pozwalają na racjonalne projektowanie bezpiecznych i coraz skuteczniejszych szczepionek przeciw pryszczycy. Szczepionki wciąż uważa się za przyszłość w walce z pryszczycą, a także główną broń w ograniczaniu choroby w miejscach jej występowania.

Piśmiennictwo

- Grubman M.J., Baxt B.: Foot-and-Mouth Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004, **17**, 465–493.
- Alexandersen S., Brotherhood I., Donaldson A. I.: Natural aerosol transmission of foot-and-mouth disease virus to pigs: minimal infectious dose for strain O1 Lausanne. *Epidemiol. Infect.* 2002, **128**, 301–312.
- Sellers P., Gloster J.: Foot-and-mouth disease: A review of intranasal infection of cattle, sheep and pigs. *Vet. J.* 2008, **177**, 159–168.
- Sorensen, J.H., Mackay D.K., Jensen C.O., Donaldson A.I.: An integrated model to predict the atmospheric spread of foot-and-mouth disease virus. *Epidemiol. Infect.* 2000, **124**, 577–590.
- Alexandersen S., Zhang Z., Donaldson A.I., Garland A.J.: The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.* 2003, **129**, 1–36.
- Brown C.C., Meyer R.F., Olander H.J., House C., Mebus C.A.: A pathogenesis study of foot-and-mouth disease in cattle, using in situ hybridization. *Can. J. Vet. Res.* 1992, **56**, 189–193.
- Zhang, Z.D., Kitching R.P.: The localization of persistent foot and mouth disease virus in the epithelial cells of the soft palate and pharynx. *J. Comp. Pathol.* 2001, **124**, 89–94.
- Brown C.C., Piccone M.E., Mason P.W., McKenna T.S., Grubman M.J.: Pathogenesis of wild-type and leaderless foot-and-mouth disease virus in cattle. *J. Virol.* 1996, **70**, 5638–5641.
- Kitching, P., Hughes G.H.: Clinical variation in foot-and-mouth disease: sheep and goats. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 2002, **21**, 505–512.
- Hughes, G.J., Mioulet V., Kitching R.P., Woolhouse M.E., Alexandersen S., Donaldson A. I.: Foot-and-mouth disease virus infection of sheep: implications for diagnosis and control. *Vet. Rec.* 2002, **150**, 724–727.
- Alexandersen S., Zhang Z., Donaldson A. I., Garland A. J.: The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.* 2003, **129**, 1–3.
- Alexandersen S., Donaldson A.I.: Further studies to quantify the dose of natural aerosols of foot-and-mouth disease virus for pigs. *Epidemiol. Infect.* 2002, **128**, 313–323.
- Alexandersen S., Zhang Z., Donaldson A.I.: Aspects of the persistence of foot-and-mouth disease virus in animals – the carrier problem. *Microbes Infect.* 2002, **4**, 1099–1110.
- Kitching, P., Alexandersen S.: Clinical variation in foot-and-mouth disease: pigs. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 2002, **21**, 513–518.
- Weaver G.V., Domenech J., Thiermann A.R., Karesh W.B.: Foot and mouth disease: a look from the wild side. *J. Wildl. Dis.* 2013, **49**, 759–785.
- Doel T.R., Williams L., Barnett P.V.: Emergency vaccination against foot-and-mouth disease: rate of development of immunity and its implications for the carrier state. *Vaccine* 1994, **12**, 592–600.
- Golde W.T., Pacheco J.M., Duque H., Doel T., Penfold B., Ferman G.S., Gregg D.R., Rodriguez L.L.: Vaccination against foot-and-mouth disease virus confers complete clinical protection in 7 days and partial protection in 4 days: use in emergency outbreak response. *Vaccine* 2005, **23**, 5775–5782.
- Bastos A.D., Bertschinger H.J., Cordel C., Van Vuuren C.D., Keet D., Bengis R.G., Grobler D.G., Thomson G.R.: Possibility of sexual transmission of foot-and-mouth disease from African buffalo to cattle. *Vet. Rec.* 1999, **145**, 77–79.
- Domingo E., Holland J.J.: High error rates, population equilibrium and evolution of RNA replication systems. *RNA Genetics* 1998, **3**, 3–36.
- Haydon D.T., Samuel A.R., Knowles N.J.: The generation and persistence of genetic variation in foot-and-mouth disease virus. *Prev. Vet. Med.* 2001, **51**, 111–124.
- Domingo E., Escarmis C., Baranowski E., Ruiz-Jarabo C.M., Carrillo E., Nunez J.L., Sobrino F.: Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* 2003, **91**, 47–63.
- King A.M., McCahon D., Saunders K., Newman J.W., Slade W.R.: Multiple sites of recombination within the RNA genome of foot-and mouth disease virus. *Virus Res.* 1985, **3**, 373–384.
- Araujo J.P.Jr., Montassier H.J., Pinto A.A.: Extensive antigenic and genetic variation among foot-and-mouth disease type A viruses isolated from the 1994 and 1995 foci in Sao Paulo, Brazil. *Vet. Microbiol.* 2002, **84**, 15–27.
- McCullough K.C., Bruckner L., Schaffner R., Raelfel W., Müller H.K., Kihm U.: Relationship between the anti-FMD virus antibody reaction as measured by different assays, and protection in vivo against challenge infection. *Vet. Microbiol.* 1992, **30**, 99–112.
- Salt J.S.: The carrier state in foot and mouth disease – an immunological review. *Br. Vet. J.* 1993, **149**, 207–223.
- McCullough K.C., De Simone E., Brocchi E., Capucci L., Crowther J.R., Kihm U.: Protective immune response against foot-and-mouth disease. *J. Virol.* 1992, **66**, 1835–1840.
- Grubman M.J., Moraes M.P., Diaz-San Segundo F., Pena L., De los Santos T.: Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008, **53**, 8–17.
- De Los Santos T., Diaz-San Segundo F., Grubman M.J.: Degradation of nuclear factor kappa B during foot-and-mouth disease virus infection. *J. Virol.* 2007, **81**, 12803–12815.
- Chinsangaram J., Koster M., Grubman M.J.: Inhibition of L-deleted foot-and-mouth disease virus replication by alpha/beta interferon involves double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Virol.* 2001, **75**, 5498–5503.
- Nfon C.K., Toka F.N., Kenney M., Pacheco J.M., Golde W.T.: Loss of plasmacytoid dendritic cell function coincides with lymphopenia and viremia during foot-and-mouth disease virus infection. *Viral Immunol.* 2010, **23**, 29–41.
- Falk M.M., Grigera P.R., Bergmann I.E., Zibert A., Muthaup G., Beck E.: Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *J. Virol.* 1990, **64**, 748–756.
- Kühn R., Luz N., Beck E.: Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 1990, **64**, 4625–4631.
- Moffat K., Howell G., Knox C., Belsham G.J., Monaghan P., Ryan M.D., Wileman T.: Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *J. Virol.* 2005, **79**, 4382–4395.
- Sanz-Parra A., Sobrino F., Ley V.J.: Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. *Gen. Virol.* 1998, **79**, 433–436.
- Yewdell J.W., Haeryfar S.M.: Understanding presentation of viral antigens to CD8+ T cells in vivo: the key to rational vaccine design. *Annu Rev Immunol.* 2005, **23**, 651–682.
- Patch J.R., Pedersen L.E., Toka F.N., Moraes M., Grubman M.J., Nielsen M., Jungersen G., Buus S., Golde W.T.: Induction of Foot-and-Mouth Disease Virus-Specific Cytotoxic T Cell Killing by Vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011, **18**, 280–288.
- Diaz-San Segundo F., Salguero F.J., De Avila A., De Marco M.M., Sánchez-Martín M.A., Sevilla N.: Selective lymphocyte depletion during the early stage of the immune response to foot-and-mouth disease virus infection in swine. *J. Virol.* 2006, **80**, 2369–2379.
- Sanz-Parra A., Sobrino F., Ley V.J.: Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. *Gen. Virol.* 1998, **79**, 433–436.
- Saiz J.C., Rodriguez A., Gonzalez M., Alonso F., Sobrino F.: Heterotypic lymphoproliferative response in pigs vaccinated with foot-and-mouth disease virus. Involvement of isolated capsid proteins. *J. Gen. Virol.* 1992, **73**, 2601–2607.
- García-Valcarcel M., Doel T., Collen T., Ryan M., Parkhouse R.M.: Recognition of foot-and-mouth disease virus and its capsid protein VP1 by bovine peripheral T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 1996, **77**, 727–735.
- Toka F.N., Nfon C., Dawson H., Golde W.T.: Natural killer cell dysfunction during acute infection with foot-and-mouth disease virus. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009, **16**, 1738–1749.
- Waldmann O., Zimmermann T.: Preparation of foot and mouth disease vaccine according to Waldmann and Kobe using calves as the antigen source. *Medizinisch-hygiene Bakteriologie, Virusforschung und Parasitologie* 1955, **163**, 239–244.
- Rodriguez L.L., Grubman M.J.: Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine* 2009, **27**, 90–94.
- Rowlands D.J., Sangar D.V., Brown F.: Relationship of the antigenic structure of foot-and-mouth disease virus to the process of infection. *J. General Virol.* 1971, **13**, 85–93.
- Bachrach H.L., Moore D.M., McKercher P.D., Polatnick J.: Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus. *J. Immunol.* 1975, **115**, 1636–1641.
- Bittle J.L., Houghton R.A., Alexander H., Shinnick T.M., Sutcliffe J.G., Lerner R.A., Rowlands D.J., Brown F.: Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 1982, **298**, 30–33.
- Patch J.R., Pedersen L.E., Toka F.N., Moraes M., Grubman M.J., Nielsen M., Jungersen G., Buus S., Golde W.T.: Induction of foot-and-mouth disease virus-specific cytotoxic T cell killing by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011, **18**, 280–288.

Dr hab. Felix Toka,
e-mail: felix_toka@sggw.pl