

# Ocena humoralnej odpowiedzi immunologicznej cieląt na antygeny białek błony zewnętrznej (OMPs) *Mannheimia haemolytica* serotyp 1

ANDRZEJ WERNICKI, ANDRZEJ PUCHALSKI, RENATA URBAN-CHMIEL, PATRYK MIKUCKI

Zakład Prewencji Weterynaryjnej Katedry Profilaktyki Ogólnej i Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Wernicki A., Puchalski A., Urban-Chmiel R., Mikucki P.

## Estimation of humoral immunological response in calves to antigens of *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane proteins (OMPs)

### Summary

The purpose of the present study was to estimate the humoral immunological response in calves to *M. haemolytica* serotype 1 outer membrane proteins (OMPs). The OMPs complex was used as vaccinal antigen in two different vaccines with aluminum hydroxide or with Montanide IMS as adjuvant. After two immunizations of the calves, an induction of high specific antibody levels was observed. In comparison to the control group, in all experimental animals immunized with OMPs a significant increase of absorbance was observed at all dates of serum obtained from the 7th day of experiment on. The analysis of the absorbance in calves vaccinated with OMPs showed higher values in the group of calves immunized with aluminum hydroxide adjuvant. Significant differences ( $P \leq 0.05$ ) were observed on the 7th, 28th, 35th and 42nd days of the experiment. A comparison of the results demonstrates that at a similar dynamic of increase of antibodies there is a more advantageous immunostimulating effect of the antigen with aluminium hydroxide as adjuvant.

**Keywords:** *Mannheimia haemolytica* serotype 1, outer membrane proteins, adjuvants, specific antibodies

Wśród czynników bakteryjnych współuczestniczących w etiopatogenezie syndromu oddechowego bydła opasowego, najbardziej istotne znaczenie odgrywiają szczepy *Mannheimia haemolytica* serotyp 1 (7, 8).

W stosowanych programach profilaktyki syndromu, poza maksymalnym ograniczeniem czynników stresowych, zasadniczą rolę odgrywiają metody immunologiczne. Przeważa pogląd, że czynna, swoista immunostymulacja jest najbardziej efektywnym sposobem zabezpieczania cieląt przed infekcją i rozwojem klinicznego obrazu choroby (14, 18, 19).

Jednym z kierunków badawczych w problematyce dotyczącej immunoprofilaktyki syndromu oddechowego jest ocena możliwości wykorzystania powierzchniowych struktur białkowych *M. haemolytica*. Decydujące znaczenie w tym względzie posiadają informacje o znacznym udziale białek błony zewnętrznej w patogenezie choroby oraz ich immunogenności, o czym świadczą wysokie miana swoistych przeciwciał występujące u zwierząt chorych oraz po przebytej chorobie. W efekcie immunizacji cieląt żywymi komórkami *M. haemolytica*, określanej jako najbardziej efektywnej metody immunoprofilaktyki syndromu, udział białkowych struktur powierzchniowych tego drobnoustroju w indukcji humoralnej odpowiedzi immunologicznej ocenia się jako bardzo istotny (4, 9, 12). Na podstawie analizy statystycznej, w której Srinand i wsp. (15) oceniali efektywność 27 szczepionek eksperymentalnych i komercyjnych stosowanych w profilaktyce zakażeń *M. haemolytica*, wykazano dla preparatów zawierają-

cych białka błony zewnętrznej (outer membrane proteins – OMPs), wysoki, wynoszący 0,5 indeks protekcji. W dalszych badaniach oceniających eksperymentalne szczepionki podjednostkowe, przeprowadzonych przez Srinand i wsp. (17) oraz Brennan i wsp. (2), wykazano istotną korelację ( $r = -0,8$ ;  $P \leq 0,0001$ ) poziomu przeciwciał surowicznych anti-OMPs a wartością tych przeciwciał w płynie oskrzelowo-płucnym i stopniem uszkodzenia tkanki płucnej, powstałym w efekcie zakażenia.

Z uwagi na brak w warunkach krajowych badań dotyczących oceny możliwości wykorzystania OMPs w konstruowaniu szczepionek, celem badań było przygotowanie szczepionki podjednostkowej zawierającej białka błony zewnętrznej *M. haemolytica* serotyp 1 oraz ocena odpowiedzi immunologicznej na zastosowane antygeny. Ze względu na zadowalające wyniki stymulacji odporności komórkowej oraz odpowiedzi humoralnej, obserwowane po zastosowaniu w szczepionkach nowej generacji adiuwantów olejowych, porównano także humoralną odpowiedź immunologiczną uzyskaną po zastosowaniu wodorotlenku glinu oraz adiuwantu przygotowanego na bazie oleju mineralnego z surfaktantem.

### Materiał i metody

Białka błony zewnętrznej otrzymywano według procedury opracowanej przez Morton i wsp. (11). Dla uzyskania odpowiedniej masy bakteryjnej terenowy szczep *M. haemolytica* serotyp 1 (kolekcja własna) był przesiewany na agar BHI, wzbogacony 5% dodatkiem krwi baraniej. Inkubację prowadzono przez 14-16 godz., w temp. 37°C, w atmosferze z 5% CO<sub>2</sub>. Wyrosłe komórki bakteryjne były zbierane i zawieszane

ne w 20 ml sterylnego PBS. Po odwirowaniu ( $13\ 000 \times g$ , 20 min., w  $4^{\circ}\text{C}$ ) i ponownym zawieszeniu w PBS, komórki bakteryjne zamrażano w  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu dalszego wykorzystania. Przepłukaną masę pełnych komórek bakteryjnych wirowano w  $20\ 000 \times g$  przez 20 min., w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ , a otrzymany osad ważono i zawieszano w 25 ml 0,01 M buforu HEPENS (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, Sigma), o pH 7,4 z dodatkiem 20% sacharozy. Do tak przygotowanej zawiesiny dodawano 0,1 mg/ml lizozymu (Sigma) oraz po 1 mg DNase (type I, Sigma) i RNase (type I-A, Sigma) na 4,2 g osadu bakteryjnego, który następnie inkubowano w temp. pokojowej przez 30 min. Schłodzone w łaźni lodowej komórki bakteryjne rozbijano ultradźwiękami (Dezintegrator typ UD-20, Techpan) w pięciu 30 sek. cyklach, przy maksymalnej mocy urządzenia. Nie rozbite komórki bakteryjne usuwano poprzez wirowanie ( $5000 \times g$ , 20 min.,  $4^{\circ}\text{C}$ ), a powstały supernatant wirowano ponownie przy  $50\ 000 \times g$  przez 4 godz., w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ . W dalszej procedurze pozyskiwania OMPs, osad zawieszano w 1% roztworze Sarkosylu (sól sodowa N-Laurylo-Sarcosine, Sigma) i ostrożnie mieszano przez 30 min., w temp. pokojowej. Nierozpuszczone (zewnętrzne) membrany były zbierane przez wirowanie ( $50\ 000 \times g$  przez 12 godz., w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ ). Uzyskany osad przepłukiwano w sterylnej wodzie dejonizowanej i zawieszano w 1 ml takiej wody.

Zawartość białka określono metodą Bradforda (1), wykorzystując odczynnik wskaźnikowy Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad). Pomiar wykonano przy użyciu czytnika Multiskan Plus (Labsystem), stosując filtr o długości fali 595 nm.

Materiał do immunizacji cieląt przygotowano wg Morton i wsp. (10). Jedna dawka szczepionki o objętości 2 ml zawierała 1 ml zawiesiny białek błony zewnętrznej oraz 1 ml odpowiedniego adiuwantu. Zwierzęta szczepiono dwukrotnie w odstępie dwóch tygodni, w iniekcjach podskórnych wykonanych w fałd szyjny.

Badania wykonano na 20 cielętach rasy mieszanej, o masie ok. 100 kg, przebywających w tradycyjnym cieletniku ściółowym. Zwierzęta podzielono na 4 grupy:

- grupa I – (6 cieląt) otrzymała OMPs w ilości 2 mg/ml z wodorotlenkiem glinu,
- grupa II – (6 zwierząt) otrzymała OMPs w ilości 2 mg/ml z adiuwantem olejowym Montanide IMS (Seppic, Francja),
- grupa III, kontrola – (4 sztuki) otrzymała rozcieńczony dwukrotnie wodorotlenek glinu,
- grupa IV, kontrola – (4 cielęta) otrzymała rozcieńczony dwukrotnie Montanide IMS.

Krew do badań pobierano z żyły szyjnej zewnętrznej w dniu pierwszego podania szczepionki, a następnie: 7, 14, 21, 28, 35, 42 dnia po pierwszej iniekcji antygeny. Surowicę uzyskiwano wg standardowych technik laboratoryjnych i przechowywano do chwili wykonania oznaczeń w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Ocenę przeciwciał swoistych w surowicach cieląt szczepionych OMPs wykonano testem ELISA na podstawie analizy absorbancji wg Brennan i wsp. (2). Jako fazę stałą zastosowano płaskodenne płytki z polichloroku winylu (Nunc-Immuno plates, F96, Maxisorp), opłaszczone OMPs w ilości 5  $\mu\text{g/ml}$  buforu węglanowego o pH 9,6. Przed wprowadzeniem antygenów płytki przygotowano nanosząc do poszczególnych dołków roztwór poly-L-lizyny (Sigma), o koncentracji 5  $\mu\text{g/ml}$  w 100  $\mu\text{l}$  buforu węglanowego, o pH 9,6. Po jednogodzinnej inkubacji w temp. pokojowej usuwano roztwór poly-L-lizyny przepłukując następnie trzykrotnie studzienki 0,05% zawiesiną Tween 20 w PBS. Po całonocnej inkubacji w temp.

$4^{\circ}\text{C}$ , studzienki z naniesionym materiałem przepłukiwano trzykrotnie roztworem PBS-T. W etapie pierwszych przeciwciał do poszczególnych dołków wprowadzano po 100  $\mu\text{l}$  badanych surowic, rozcieńczonych w stosunku 1:200 w buforze PBS-T. Po inkubacji (ok. 18 godz., w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ ) i trzykrotnym przepłukaniu buforem PBS-T, do baseników wprowadzano skoniugowane z peroksydazą chrzanową przeciwciała królicze, skierowane przeciwko bydlęcym IgG (Bio-Kom), rozcieńczone 1:5000. Po 3 godzinnej inkubacji płytki przepłukiwano trzykrotnie w buforze PBS-T. W celu wywołania reakcji barwnej poszczególne dołki wypełniano chromogenem (TMB Peroxidase EIA Substrate Kit, Bio-Rad) w ilości po 100  $\mu\text{l}$  i inkubowano przez 20 min., w temp. pokojowej. Absorbancję dla każdej próbki odczytywano bezpośrednio po wykonaniu testu oraz po 20 min. i 1 godz. Pomiar wykonywano przy użyciu czytnika Multiskan Plus (Labsystem), stosując filtr o długości fali 650 nm. Jako kontrolę ujemną zastosowano surowicę pochodzącą od cieląt noworodków, uzyskaną przed podaniem siary. Kontrolę dodatnią stanowiły surowice uzyskane od dwóch cieląt chorych, z klinicznymi objawami pasterelezy płucnej, które padły. Ze zmienionej chorobowo tkanki płucnej tych zwierząt wyizolowano *M. haemolytica* serotyp 1.

Uzyskane wyniki zostały opracowane statystycznie testem t-Studenta z wykorzystaniem programu komputerowego – Statistica 6.0.

## Wyniki i omówienie

Wyniki uzyskane w teście ELISA świadczą o wysokiej immunogenności wykorzystanych w szczepionkach antygenów białek błony zewnętrznej szczepu *M. haemolytica* serotyp 1. Potwierdzeniem właściwości immunogennych tych białek były wykonane wcześniej reakcje immunoblotingu z surowicami immunizowanych cieląt (13). Analiza obrazów uzyskanych na błonach nitrocelulozowych wykazała obecność swoistych reakcji dla antygenów OMPs o masach 16, 18, 23, 26, 31, 33, 37, 44, 51, 72, 90 i 100 kDa. W doświadczeniach innych autorów (2, 5, 10), przeciwciała swoiste uzyskane w stosunku do wielu antygenów o masach porównywalnych z białkami uzyskanymi w badaniach własnych, wykazywały wysoką korelację z odpornością zwierząt na infekcje naturalne i zakażenia eksperymentalne.

W efekcie szczepienia cieląt, bez względu na zastosowany adiuwant obserwowano indukcję wysokiego poziomu przeciwciał swoistych anty-OMPów. W porównaniu z grupami kontrolnymi w surowicach pochodzących od cieląt szczepionych białkami błony zewnętrznej (grupa I i II), uzyskano statystycznie istotnie wyższą absorbancję we wszystkich terminach pobrania krwi, począwszy od 7 dnia po pierwszym szczepieniu (tab. 1). Dynamikę narastania przeciwciał charakteryzował typowy przebieg. Była ona porównywalna, także w zakresie uzyskiwanych wartości, z danymi przedstawionymi przez Confer i wsp. (5) oraz Brennan i wsp. (2).

Wartości absorbancji surowic uzyskanych we wszystkich terminach pobrania krwi pochodzącej od cieląt z grup kontrolnych, które immunizowano rozcieńczonymi adiuwantami, nie różniły się istotnie statystycznie i utrzymywały się przez cały okres doświadczenia na stosunkowo stałym poziomie.

Tab. 1. Absorbancja ( $\bar{x} \pm s$ ) surowic pochodzących od cieląt immunizowanych OMPs *M. haemolytica* A1.

Grupy cieląt	Dni doświadczenia						
	0	7	14	21	28	35	42
I	0,233 <sup>a</sup> ± 0,035	0,485 <sup>b</sup> ± 0,081	0,662 <sup>c,A</sup> ± 0,070	0,873 <sup>d,A</sup> ± 0,130	1,177 <sup>e</sup> ± 0,137	1,156 <sup>e</sup> ± 0,128	1,079 <sup>f</sup> ± 0,096
II	0,187 <sup>a</sup> ± 0,051	0,338 <sup>*b</sup> ± 0,063	0,659 <sup>c</sup> ± 0,047	0,822 <sup>d,A</sup> ± 0,066	0,930 <sup>*e</sup> ± 0,089	0,959 <sup>*e,A</sup> ± 0,147	0,906 <sup>*f</sup> ± 0,142
III	0,224 ± 0,035	0,226 <sup>*</sup> ± 0,022	0,225 <sup>*</sup> ± 0,024	0,226 <sup>*</sup> ± 0,024	0,226 <sup>*</sup> ± 0,018	0,226 <sup>*</sup> ± 0,018	0,215 <sup>*</sup> ± 0,017
IV	0,191 ± 0,039	0,194 <sup>**</sup> ± 0,037	0,198 <sup>**</sup> ± 0,037	0,199 <sup>**</sup> ± 0,037	0,197 <sup>**</sup> ± 0,037	0,189 <sup>**</sup> ± 0,029	0,189 <sup>**</sup> ± 0,030

Objaśnienia: a–f – różnice statystycznie istotne w poszczególnych dniach doświadczenia przy  $P \leq 0,01$ ; A – różnice statystycznie istotne w poszczególnych dniach doświadczenia przy  $P \leq 0,05$ ; \* – różnice statystycznie istotne między grupą I a grupą II i III przy  $P \leq 0,05$ ; \*\* – różnice statystycznie istotne między grupą II a grupą IV przy  $P \leq 0,05$ .

W surowicach cieląt szczepionych OMPs z wodorotlenkiem glinu zaobserwowano istotny statystycznie wzrost ( $P \leq 0,01$ ) absorbancji od 7 do 28 dnia doświadczenia. W 35 dniu po pierwszej dawce szczepionki uzyskano niewielki, nieistotny spadek absorbancji, pogłębiający się w 42 dniu eksperymentu.

Podobną dynamikę narastania absorbancji obserwowano w surowicach cieląt szczepionych OMPs w połączeniu z adiuwantem Montanide IMS (grupa II). W porównaniu do cieląt szczepionych białkami błony zewnętrznej z wodorotlenkiem glinu (grupa I), uzyskano niższe wartości absorbancji we wszystkich terminach pobrania krwi. Różnice istotnie statystycznie ( $P \leq 0,05$ ) wykazano w 7, 28, 35 i 42 dniu doświadczenia, co świadczy o korzystniejszym efekcie immunostymulującym antygenów wspomaganym wodorotlenkiem glinu. Zróznicowane efekty immunostymulacji przy zastosowaniu różnych adiuwantów szczepionkowych były tematem licznych badań (3, 5, 6, 16). W dostępnym piśmiennictwie nie odnotowano natomiast danych odnośnie wykorzystania adiuwantu olejowego Montanide IMS w immunoprofilaktyce chorób zakaźnych cieląt. Można przyjąć, że zastosowana formuła składników tego adiuwantu jest nieodpowiednia dla bydła opasowego. Potwierdzeniem tej sugestii mogą być wyniki doświadczeń Cameron i Bester (3), wykazujące różnice międzygatunkowe w odpowiedzi immunologicznej przeżuwaczy po zastosowaniu adiuwantów wodno-olejowych oraz wodorotlenku glinu. Autorzy ci wykazali, że w efekcie szczepienia owiec zróżnicowanymi antygenami *M. haemolytica*, uzyskiwana jest wyższa odpowiedź humoralna po zastosowaniu adiuwantu olejowego. W cytowanej pracy, nie wykazano natomiast istotnych różnic w wartościach przeciwciał surowicznych uzyskiwanych od cieląt immunizowanych szczepionkami, w których skład wchodziły omawiane adiuwanty. Brak zróżnicowania w odpowiedzi immunologicznej w stosunku do pojedynczych białek o masie 71, 77 oraz 100 kDa obserwował Confer i wsp. (5), oceniając wyniki analizy densytometrycznej surowic uzyskanych po szczepieniu cieląt antygenem podawanym z wodorotlenkiem glinu oraz niekompletnym adiuwantem Freund. Należy sądzić, że dążenie do eliminacji miejscowego podrażnienia tkanek w przypadku Montanide IMS może ograniczać u cieląt immunomodelującą właściwość tego adiuwantu.

Reasumując uzyskane dotychczas wyniki badań odnośnie możliwości immunostymulującego wykorzystania białek błony zewnętrznej *M. haemolytica* serotyp I, należy podkreślić szeroką użyteczność OMPs, jako immunogenów stosowanych w indukowaniu mian przeciwciał ochronnych u szczepionych cieląt. W opinii wielu autorów, wykorzystanie OMPs w immunoprofilaktyce syndromu oddechowego cieląt, w istotny sposób może poprawić efektywność profilaktyczną stosowanych dotychczas preparatów.

## Piśmiennictwo

- Bradford M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.
- Brennan R. E., Corstvet R. E., Paulson D. B.: Antibody responses to *Pasteurella haemolytica* 1: A and three of its outer membrane proteins in serum, nasal secretions, and bronchoalveolar lavage fluid from calves. *Am. J. Vet. Res.* 1998, 59, 727-732.
- Cameron C. M., Bester F. J.: Response of sheep and cattle to combined polyvalent *Pasteurella haemolytica* vaccines. *Onderstep. J. Vet. Res.* 1986, 53, 1-7.
- Confer A. W.: Immunogenes of *Pasteurella*. *Vet. Microbiol.* 1993, 37, 353-368.
- Confer A. W., McCraw R. D., Durham J. A., Morton R. J., Panciera R. J.: Serum antibody responses of cattle to iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* A1. *Vet. Immunol. Immunopath.* 1995, 47, 101-110.
- Confer A. W., Panciera R. J., Gentry M. J., Fulton R. W.: Immunologic response to *Pasteurella haemolytica* and resistance against experimental bovine pneumonic pasteurellosis, induced by bacterins in oil adjuvants. *Am. J. Vet. Res.* 1987, 48, 163-168.
- Donachie W.: Bacteriology of bovine respiratory disease. *Cattle Practice* 2000, 8, 5-7.
- Frank G. H., Briggs R. E., Loan R. W., Purdy C. W., Zehr E. S.: Respiratory tract disease and mucosal colonization by *Pasteurella haemolytica* in transported cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1996, 57, 1317-1320.
- Mahasreshi P. J., Murphy G. L., Wyckoff III J. H., Farmer S., Hancock R. E. W., Confer A. W.: Purification and partial characterization of the OmpA family of proteins of *Pasteurella haemolytica*. *Infect. Immun.* 1997, 65, 211-218.
- Morton R. J., Panciera R. J., Fulton R. W., Frank G. H., Ewing S. A., Homer J. T., Confer A. W.: Vaccination of cattle with outer membrane protein-enriched fractions of *Pasteurella haemolytica* and resistance against experimental challenge exposure. *Am. J. Vet. Res.* 1995, 56, 875-879.
- Morton R. J., Simons K. R., Confer A. W.: Major outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serovars 1-15: comparison of separation techniques and surface-exposed proteins on selected serovars. *Vet. Microbiol.* 1996, 51, 319-330.
- Mosier D. A., Simons K. R., Confer A. W., Panciera R. J., Chlinkenbeard K.: *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. *Infect. Immun.* 1989, 57, 711-716.
- Puchalski A., Wernicki A., Mikucki P., Urban-Chmiel R.: Profile białek błony zewnętrznej szczepów Mannheimia (*Pasteurella*) haemolytica, M. glucosida, P. trehalosi oraz szczepów nietypowych. *Medycyna Wet.* 2002, 6, 439-443.
- Radostits O. M.: The control of infectious diseases of the respiratory and digestive tracts of cattle. *Can. Vet. J.* 1991, 32, 85-89.
- Srinand S., Ames T. R., Maheswaran S. K., King V. L.: Efficacy of various vaccines against pneumonic pasteurellosis in cattle: meta-analysis. *Prev. Vet. Med.* 1995, 25, 7-17.
- Srinand S., Ames T. R., Werdin R. E., Yoo S. H., Maheswaran S. K.: Evaluation of three experimental subunit vaccines against pneumonic pasteurellosis in cattle. *Vaccine* 1996, 14, 147-154.
- Srinand S., Maheswaran S. K., Ames T. R., Werdin R. E., Hsuan S. L.: Evaluation of efficacy of three commercial vaccines against experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet. Microbiol.* 1996, 52, 81-89.
- Van Donkersgoed J., Guenther Ch., Erans B. N., Potter A. A., Harland R. J.: Effects of various vaccination protocols on passive and active immunity to *Pasteurella haemolytica* and *Haemophilus somnus* in beef calves. *Can. Vet. J.* 1995, 36, 424-429.
- Wernicki A., Żurek A.: Immunoprofilaktyka bakteryjnych stanów zapalnych układu oddechowego cieląt. *Annales UMCS, Sectio DD*, 1999, 14, 155-163.

Adres autora: dr hab. Andrzej Wernicki prof. AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: Wernic@agros.ar.lublin.pl