

Odporność humoralna u cieląt szczepionych eksperymentalnie przeciwko zakażeniom *Mycoplasma bovis**)

KATARZYNA DUDEK, DARIUSZ BEDNAREK

Zakład Chorób Bydła i Owiec, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,
al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 01.12.2016

Zaakceptowano 28.03.2017

Dudek K., Bednarek D.

Humoral immunity in the calves experimentally vaccinated against *Mycoplasma bovis* infections

Summary

The object of the study was to evaluate the effect of an experimental vaccine against *Mycoplasma bovis* infections on selected humoral immune parameters in the calves. The study was carried out on twelve calves divided into two equal groups: experimental and control. The experimental calves were subcutaneously injected with experimental vaccine composed of suspension of the *M. bovis* field strain of with saponin and lysozyme. The control group was administered with PBS by the same route. Blood samples for laboratory analyses were collected from all the animals directly prior to the proper experiment (zero test), then at daily intervals up to the 7th day of observation and next at weekly ones up to the 12th week after the vaccination. Serum samples were examined for total bovine immunoglobulins (Ig) and their individual classes (IgG, A i M) using suitable ELISA kits.

In response to the vaccine the total serum concentration of Ig was at first lower than in the control animals up to the 56th day of observation, then it increased up to the end of the study. A distinct stimulation of the IgG synthesis was observed in the experimental animals throughout the study with the exception of the 42nd and 77th days when it was slightly decreased. On the other hand the IgA concentration was considerably lower in the experimental calves when compared to the control up to the 7th day of observation, whereas it was visibly increased at day 63rd and 70th after the vaccination. In response to the vaccination the IgM concentration had comparable values to the control throughout the study with the exception of the 4th and 56th days when they were considerably higher, whereas the IgM decrease was observed only at the 21st day after the vaccination. The experimental vaccine composed of the field strain of *M. bovis* with saponin and lysozyme caused significant activation of selected indices of humoral immunity in the affected animals.

Keywords: calves, *Mycoplasma bovis*, saponin, lysozyme, humoral immunity

Mycoplasma bovis uważana jest za czynnik etiologiczny wielu ważnych chorób bydła. Dotychczas wykazano, że zakażenia z udziałem tego zarazka wywoływać mogą zapalenie: płuc i oskrzeli (enzootyczna bronchopneumonia cieląt, syndrom oddechowy bydła, BRD), stawów, ucha środkowego, rogówki i spojówki, a także gruczołu mlekowego (6, 8, 11, 14). Zakażenia *M. bovis* stanowią znaczący problem w odchowcie bydła także z ekonomicznego punktu widzenia. Straty z tytułu BRD w samej tylko Europie sięgają 600 mln euro rocznie. Z kolei w USA przy 75% wskaźniku zachorowań na BRD upadki zwierząt notuje się na poziomie 50-70%, co daje w skali roku 900 mln \$

strat (2, 10). Analiza własna przypadków BRD w krajowej populacji bydła wykazała, że odsetek dodatnich seroreagentów w kierunku *M. bovis* wynosi ponad 60% (5). Ostatnie badania autorów w tym zakresie również dowiodły utrzymywania się nadal wysokiego odsetka cieląt i krów zakażonych *M. bovis* w przebiegu klinicznych przypadków zapalenia płuc, stawów oraz mastitis. W przypadku cieląt 56% omawianej populacji wykazywało obecność specyficznego DNA *M. bovis* (16). Skuteczną kontrolę zakażeń *M. bovis* u bydła ogranicza istotnie, zwłaszcza w ostatnim okresie, narastająca szybko oporność terenowych szczepów tej mykoplazmy na chemioterapeutyki stosowane rutynowo w leczeniu weterynaryjnym. Ponadto, działania te utrudnia brak możliwości prowadzenia swoistej profilaktyki, bowiem niedostępne są na razie

*) Praca wyróżniona nagrodą za najlepszą prezentację przedstawioną przez młodego pracownika nauki w Sekcji Chorób Zwierząt Gospodarskich podczas XV Kongresu PTNW w Lublinie 22-24.09.2016 r.

Tab. 1. Ocena obecności przeciwciał anti-*M. bovis* w surowicy krwi cieląt (z określeniem średniego stopnia pozytywności) w odpowiedzi na iniekcję eksperymentalnej szczepionki

Grupa cieląt	Liczba dni od iniekcji																		
	0	1	2	3	4	5	6	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
K (n = 6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S + L (n = 6)	-	-	-	-	-	-	-	-	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	2+

Objaśnienia: K – grupa kontrolna; S + L – grupa szczepiona; + obecność przeciwciał anti-*M. bovis* (1+ - 4+ stopień pozytywności od + do ++++); – brak obecności przeciwciał anti-*M. bovis*; interpretacja: – przy $Val \leq 37\%$; 1+ przy $37\% < Val \leq 60\%$; 2+ $60\% < Val \leq 83\%$; 3+ $83\% < Val \leq 106\%$; 4+ $106\% < Val \leq 129\%$ gdzie Val (Val(ue)) oznacza: delta OD surowicy/delta OD kontroli dodatniej $\times 100$ (w %)

na rynku krajowym komercyjne szczepionki przeciwko zakażeniom *M. bovis* (1, 18). Jedyne szczepionki tego typu wprowadzono tylko w USA, ich skuteczność jednak pozostawia wiele do życzenia i budzi uzasadnione kontrowersje (12, 15). Dotychczas wysoką skuteczność potwierdzono jedynie w UK po zastosowaniu u cieląt eksperymentalnej szczepionki przygotowanej z udziałem terenowego szczepu *M. bovis* i saponiny, jako adiuwantu i inaktywatora mykoplazm (13). Z kolei w naszym kraju podjęto też skuteczną próbę opracowania oraz oceny właściwości protekcyjnych własnej eksperymentalnej szczepionki przeciwko zakażeniom *M. bovis* u cieląt złożonej z krajowego szczepu *M. bovis* oraz saponiny i Emulsigenu® jako adiuwantów (6).

Celem niniejszych badań była ocena odpowiedzi humoralnej u cieląt po zastosowaniu nowej kombinacji szczepionki przeznaczonej do immunoprofilaktyki zakażeń *M. bovis* złożonej tym razem z terenowego szczepu *M. bovis* oraz dwóch adiuwantów, tj. saponiny i lizozymu.

Materiał i metody

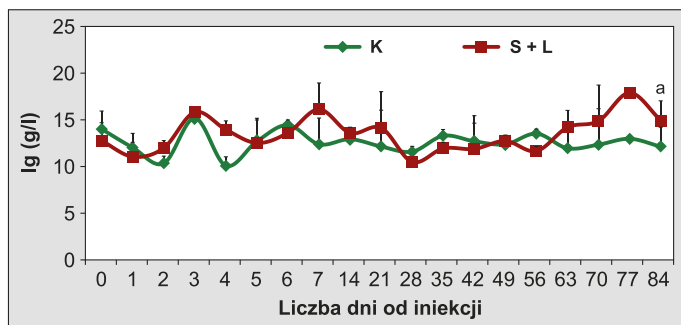
Na przeprowadzenie badań uzyskano stosowną zgodę II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Badania wykonano na 12 klinicznie zdrowych cielętach, rasy cb, w wieku około 5 tygodni życia, pochodzących z krajowych ferm bydła. Cielęta przed właściwym badaniem poddano dwutygodniowemu okresowi adaptacyjnemu. Po tym czasie podzielono je losowo na dwie równe grupy: doświadczalną (S + L) i kontrolną (K). W zerowym dniu („0”) doświadczalnym cielętom grupy S+L podano w iniekcji podskórnej w okolicę szyi własną szczepionką, którą opracowano na bazie terenowego szczepu *M. bovis* (BankIt1801634 Mbovis KP795974) wyizolowanego w kraju z przypadku *mastitis* u bydła z dwoma adiuwantami, tj. saponiną (Sigma, Poole) i lizozymem (Lydium-KLP™, Nika, Health Products). Saponina służyła również jako inaktywator mykoplazm. We wcześniejszym opracowaniu autorskim (6) opisano szczegółowo procedurę hodowli *M. bovis* i przygotowania zawiesiny bakteryjnej z saponiną. Następnie do tej zawiesiny dodawano lizozym (2 ml) i dopełniono PBS (1 ml). Ostateczna objętość szczepionki przeznaczona do podania *s.c.* cielętom wynosiła 8 ml/zw. Zwierzęta kontrolne otrzymały natomiast w tej samej ilości i tą samą drogą PBS. Krew do badań laboratoryjnych pobierano od cieląt bezpośrednio przed właściwym doświadczeniem (próba zerowa; dzień 0), a następnie

w 24-godzinnych odstępach do 7. dnia obserwacji i kolejne, w odstępach tygodniowych, do 12. tygodnia po szczepieniu. W surowicy krwi cieląt oznaczano obecność specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* z określeniem średniego stopnia pozytywności (tab. 1) oraz całkowite stężenie immunoglobulin bydlęcych (Ig) i poszczególnych ich klas (IgG, A i M) w oparciu o metodę immunoenzymatyczną (ELISA) z wykorzystaniem oddzielnych komercyjnych zestawów, tj. odpowiednio: *Mycoplasma bovis* ELISA kit (Bio-X Diagnostics, Belgium), ELISA kit for the quantitative determination of Bovine immunoglobulin (Bio-X Diagnostics, Belgium) oraz Bovine IgG ELISA Kit, Bovine IgA ELISA Kit i Bovine IgM ELISA Kit firmy Bethyl Laboratories, Inc. Pomiar i odczyt wartości gęstości optycznej w dołkach mikroplątek ELISA przeprowadzono na automatycznym czytniku mikroplątek (Elx800 Microplate Reader, BioTek Instruments, Inc., USA) przy długości fali 450 nm. Z kolei kalkulacja wyników otrzymanych metodą ELISA została wykonana przy użyciu programu KC Junior programme (BioTek Instruments, Inc., USA) skonfigurowanego z czytnikiem mikroplątek.

Otrzymane wyniki zostały przedstawione w postaci średnich arytmetycznych \pm SD. Różnice między wartościami średnich uzyskanych w obydwu grupach w tym samym czasie poddano analizie statystycznej w oparciu o test t-Studenta dla prób niezależnych przy $p \leq 0,05$.

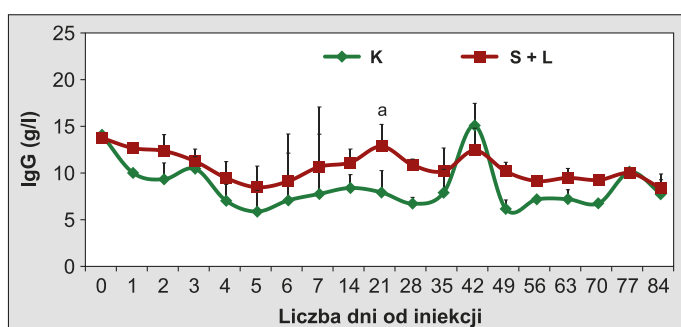
Wyniki i omówienie

W badaniach wykonanych u cieląt bezpośrednio przed rozpoczęciem doświadczenia nie stwierdzono obecności specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis*. Stan ten utrzymywał się przez cały okres doświadczenia u zwierząt grupy kontrolnej, natomiast u cieląt doświadczalnych uległ on zmianie w 14. dniu po szczepieniu, w surowicy krwi tych ostatnich wykazano bowiem wzrost miana specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* obejmujący różne stopnie pozytywności, zależne od kolejnych analizowanych dni po szczepieniu (tab. 1). W przypadku natomiast oceny ogólnej puli immunoglobulin bydlęcych u cieląt doświadczalnych stwierdzono wyraźny spadek wartości tego parametru, utrzymujący się do 56. dnia po szczepieniu. Po tym czasie uległ on widocznemu podwyższeniu i jego wartości były wyraźnie wyższe u cieląt doświadczalnych niż u kontrolnych (ryc. 1). Z kolei koncentracja cząstkowych immunoglobulin klasy IgG utrzymywała



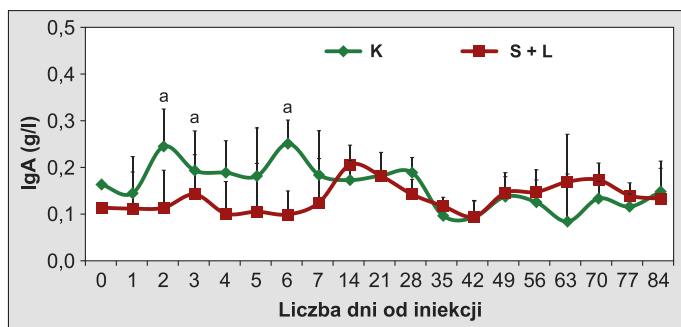
Ryc. 1. Średnie stężenie całkowitej puli bydlęcych Ig w surowicy krwi cieląt w odpowiedzi na iniekcję eksperymentalnej szczepionki

Objaśnienia: K – grupa kontrolna; S + L – grupa szczepiona; a – różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ między grupami K i S + L



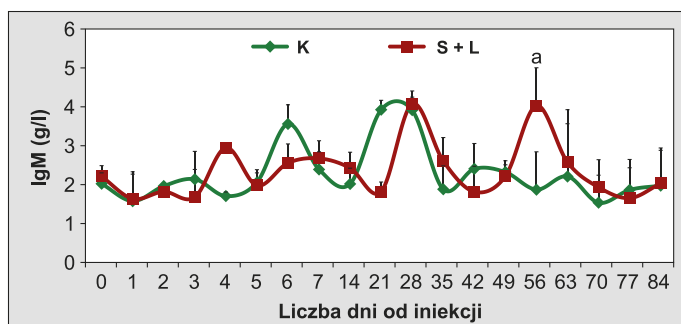
Ryc. 2. Średnie stężenie IgG w surowicy krwi cieląt w odpowiedzi na iniekcję eksperymentalnej szczepionki

Objaśnienia: jak na ryc. 1



Ryc. 3. Średnie stężenie IgA w surowicy krwi cieląt w odpowiedzi na iniekcję eksperymentalnej szczepionki

Objaśnienia: jak na ryc. 1



Ryc. 4. Średnie stężenie IgM w surowicy krwi cieląt w odpowiedzi na iniekcję eksperymentalnej szczepionki

Objaśnienia: jak na ryc. 1

się u cieląt szczepionych w porównaniu z kontrolą na podwyższonym poziomie niemalże przez cały okres doświadczenia, z wyjątkiem 42., 77. i 84. dnia obserwacji, gdzie notowano nieco niższe lub zbliżone do zwierząt kontrolnych wartości tego parametru (ryc. 2). W odpowiedzi na szczepienie stężenie IgA utrzymywało się na generalnie niższym niż kontrola poziomie przez większość obserwacji. Dopiero między 63. a 70. dniem po szczepieniu obserwowano wyraźny wzrost wartości tego parametru u cieląt doświadczalnych (ryc. 3). Z kolei stężenie IgM u cieląt szczepionych osiągało generalnie zbliżone do kontroli wartości, z wyjątkiem 21. dnia obserwacji, gdzie notowano wyraźny spadek wartości tego parametru, a także 4. i 56. dnia po szczepieniu, gdzie wartość ta była wyraźnie wyższa od kontroli (ryc. 4).

Wcześniejsze badania własne (7) wykazały wyraźne podwyższenie koncentracji gammaglobulin bydlęcych w surowicy cieląt i dorosłego bydła ocenianych jako serododatnie w kierunku zakażeń *M. bovis* w porównaniu do zwierząt serologicznie ujemnych. Poprzednia formuła szczepionki własnej oparta na tym samym szczepie *M. bovis*, jednak o odmiennym składzie adiuwantowym, powodowała wyraźne podwyższenie miana specyficznych przeciwciał anti-*M. bovis* u szczepionych cieląt widoczne już od 14. dnia po szczepieniu (6), co było zgodne z obecnymi wynikami. Nieco inaczej kształtowały się jednak zmiany stężenia całkowitej puli immunoglobulin bydlęcych dla obydwu ocenianych szczepionek. Szczepionka opisana w tym opracowaniu stymulowała efektywnie produkcję całkowitej puli Ig dopiero po 56. dniu od iniekcji, natomiast złożona z saponiny i Emulsigenu® już od 14. dnia po immunizacji. Stan ten utrzymywał się nieprzerwanie do 21. dnia po szczepieniu, w którym inokulowano cielęta szczepem homologicznym *M. bovis* (6). Obydwie formy szczepionki stymulowały natomiast podobnie syntezę immunoglobulin klasy IgG, co miało miejsce między 7. a 21. dniem po szczepieniu. W przypadku immunoglobulin klasy IgA dla ocenianej w pracy szczepionki obserwowano wyraźnie przesuniętą w czasie stymulację tego parametru w porównaniu do wcześniejszej badanej szczepionki, zawierającej inny skład adiuwancyjny, która powodowała istotny wzrost wartości IgA widoczny już w 7. dniu obserwacji. Szczyt wzrostu przeciwciał IgA notowano dla porównywanej szczepionki dopiero w 14. dniu po immunizacji (6). Stymulacja syntezy IgA może pośrednio świadczyć o aktywacji lokalnej odpowiedzi immunologicznej w obrębie tkanki limficznej związanej z błonami śluzowymi, tzw. mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). Przypisuje się jej przede wszystkim udział w ograniczaniu kolonizacji dolnych dróg oddechowych przez patogeny bakteryjne i wirusowe, co sprzyja efektywnej ich eliminacji z płuc gospodarza (17). Podobne zależności dla obydwu omawianych rodzajów szczepionek własnych stwierdzono

w zakresie koncentracji immunoglobulin klasy IgM, gdzie wykazano stymulujący ich wpływ na wartości tego parametru w początkowym okresie po podaniu szczepionki (6), tj. kiedy zwykle dochodzi do rozwoju swoistej odpowiedzi humoralnej. W wyniku immunizacji cieląt szczepionką z dodatkiem Emulsigenu® koncentracja IgM utrzymywała się na podwyższonym poziomie jeszcze w 14. dniu po szczepieniu (6), z kolei w przypadku obecnie prezentowanych badań ich wyraźny wzrost obserwowano w 4. dniu po szczepieniu. Następnie drastyczny ich spadek widoczny był po 14. dniu po szczepieniu, co było zbliżone z zapoczątkowaniem procesu wzrostu stężenia specyficznych przeciwciał anty-*M. bovis*.

Porównując wyniki własnych badań z danymi piśmiennictwa należy podkreślić, że jedna z dostępnych na rynku inaktywowanych szczepionek przeciwko zakażeniom *M. bovis* stosowana w USA nie powodowała istotnych zmian w koncentracji immunoglobulin klasy IgG2, IgA i IgM mimo trzykrotnej immunizacji cieląt. Po podaniu tej szczepionki obserwowano natomiast wyraźną stymulację IgG1, która notowana była w różnym okresie po szczepieniu, w zależności od rodzaju badanego stada (12). W odróżnieniu od IgG2, podklasa IgG1 wydaje się odgrywać mniejszą rolę w eliminacji *M. bovis* z ustroju gospodarza poprzez jej opsonizację (9). Brak wyraźnej stymulacji większości parametrów odpowiedzi humoralnej w następstwie stosowania tej komercyjnej szczepionki pokrywał się w praktyce z jej niską skutecznością w profilaktyce zakażeń *M. bovis* w badanej grupie cieląt (12). Inne tego typu badania z udziałem dwóch komercyjnych inaktywowanych szczepionek dostępnych w USA wykazały brak istotnej stymulacji IgG2 nawet w następstwie kilkukrotnej immunizacji (dwu- lub trzykrotnej, w zależności od rodzaju szczepionki). Pewną stymulację obserwowano tylko dla podklasy IgG1, jednak różnica między grupami szczepionymi a kontrolą nie była istotna statystycznie. Obydwie te szczepionki nie chroniły również przed kolonizacją górnych dróg oddechowych przez *M. bovis*, a także przed rozwojem specyficznych zmian patologicznych w obrębie płuc immunizowanych cieląt (15).

W odpowiedzi na szczepienie cieląt własną eksperymentalną szczepionką zawierającą terenowy szczep *M. bovis* wyizolowany w kraju z przypadku *mastitis* u bydła w połączeniu z saponiną i lizozymem wykazano istotną aktywację wybranych wskaźników odporności humoralnej u badanych zwierząt. Ochronny potencjał prezentowanej szczepionki wykazano również w innych badaniach immunologicznych (3, 4), które wymagają jednak dalszego pogłębienia i poszerzenia nie tylko w warunkach eksperymentalnych, ale i terenowych, co może umożliwić właściwą ocenę jej efektywności i przydatności tej szczepionki w profilaktyce zakażeń *M. bovis* u bydła.

Piśmiennictwo

1. *Ayling R. D., Rosales R. S., Barden G., Gosney F. L.*: Changes in antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from Great Britain. *Vet. Rec.* 2014, 175, 486.
2. *Barret D. C.*: Cost-effective antimicrobial drug selection for the management and control of respiratory disease in European cattle. *Vet. Rec.* 2000, 146, 545-550.
3. *Bednarek D., Dudek K.*: Acute phase proteins in the calves administered with experimental *M. bovis* vaccine. *World Buiatrics Congress, Dublin 2016*, P02-002-144, 423.
4. *Bednarek D., Dudek K.*: Flow cytometry analysis in the calves experimentally vaccinated against *Mycoplasma bovis* infection. *European Buiatrics Forum, Rome 2015*, 133.
5. *Dudek K., Bednarek D.*: Last survey of *Mycoplasma bovis* prevalence in Polish cattle affected with respiratory syndrome. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2012, 56, 447-451.
6. *Dudek K., Bednarek D., Ayling R. D., Kycko A., Szacawa E., Karpińska T. A.*: An experimental vaccine composed of two adjuvants gives protection against *Mycoplasma bovis* in calves. *Vaccine* 2016, 34, 3051-3058.
7. *Dudek K., Bednarek D., Szacawa E.*: Evaluation of immune response in seropositive cattle for *Mycoplasma bovis*. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2011, 55, 631-634.
8. *Houlihan M. G., Veenstra B., Christian M. K., Nicholas R., Ayling R.*: Mastitis and arthritis in two dairy herds caused by *Mycoplasma bovis*. *Vet. Rec.* 2007, 160, 126-127.
9. *Howard C. J., Taylor G., Collins J., Gourlay R. N.*: Interaction of *Mycoplasma dispar* and *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* with bovine alveolar macrophages and bovine lacteal polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 1976, 14, 11-17.
10. *Idoate I., Vander Ley B., Schultz L., Heller M.*: Acute phase proteins in naturally occurring respiratory disease of feedlot cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2015, 163, 221-226.
11. *Maeda T., Shibahara T., Kimura K., Wada Y., Sato K., Imada Y., Ishikawa Y., Kadota K.*: *Mycoplasma bovis*-associated suppurative otitis media and pneumonia in bull calves. *J. Comp. Pathol.* 2003, 129, 100-110.
12. *Maunsell F. P., Donovan G. A., Risco C., Brown M. B.*: Field evaluation of a *Mycoplasma bovis* bacterin in young dairy calves. *Vaccine* 2009, 27, 2781-2788.
13. *Nicholas R. A., Ayling R. D., Stipkovits L. P.*: An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: clinical, cultural, serological and pathological findings. *Vaccine* 2002, 20, 3569-3575.
14. *Nicholas R. A. J., Ayling R. D.*: *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis and control. *Res. Vet. Sci.* 2003, 74, 105-112.
15. *Soehnlén M. K., Aydin A., Lengerich E. J., Houser B. A., Fenton G. D., Lysczek H. R., Burns C. M., Byler L. I., Hattel A. L., Wolfgang D. R., Jayarao B. M.*: Blinded, controlled field trial of two commercially available *Mycoplasma bovis* bacterin vaccines in veal calves. *Vaccine* 2011, 29, 5347-5354.
16. *Szacawa E., Niemczuk K., Dudek K., Bednarek D., Rosales R., Ayling R.*: *Mycoplasma bovis* infections and co-infections with other *Mycoplasma* spp. with different clinical manifestations in affected cattle herds in eastern region of Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2015, 59, 331-337.
17. *Underdown B. J., Schiff J. M.*: Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu. Rev. Immunol.* 1986, 4, 389-417.
18. *Welsh R. D., Dye L. B., Payton M. E., Confer A. W.*: Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994-2002. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2004, 16, 426-431.

Adres autora: dr Katarzyna Dudek, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: katarzyna.dudek@pivwet.pulawy.pl