

Skuteczność natywnej i inaktywowanej leukotoksyny *Mannheimia haemolytica* w immunoprofilaktyce swoistej syndromu oddechowego owiec^{*)}

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

Zakład Prewencji Weterynaryjnej Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

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

Using native and inactivated leukotoxin *Mannheimia haemolytica* in specific immunoprophylaxis of sheep's respiratory syndrome

Summary

The purpose of this study was to compare the immunostimulating properties and prophylactic effects of native *M. haemolytica* leukotoxin (Lkt) which was inactivated by formaldehyde and glutaraldehyde. The study also estimated the neutralizing properties of antibodies induced by different forms of Lkt and their protective effects on experimental challenge in sheep. The results of the study suggest that the inactivation procedure has an important effect on immunogenic obtained toxins. Vaccines used in the immunized animals demonstrated an immunogenic presence which was observed in an increase of the specific antibody titers in sera following immunization. An increase in the neutralizing properties of antibodies contained in the sera of animals immunized by Lkt was also observed. The obtained results indicate the possibility of a more effective use of *M. haemolytica* Lkt isolated from bovine respiratory syndrome as a subunit of the vaccines already used in immunoprophylaxis of this disease in sheep.

Keywords: sheep, *Mannheimia haemolytica*, respiratory syndrome

Syndrom oddechowy przeżuwaczy stanowi bardzo istotny problem zdrowotny w stadach bydła opasowego i owiec. Czynniki zakaźnymi powszechnie izolowanymi z płuc tych zwierząt są różne serotypy *Mannheimia haemolytica*. W większości przypadków chorób płuc bydła opasowego w kraju dominuje serotyp 1 tego drobnoustroju (15). U owiec, bez względu na region geograficzny, stwierdza się serotyp 2 oraz 1, 5, 6 i 8 (8, 9).

W stosowanych metodach immunoprofilaktyki swoistej u bydła wykorzystywane są szczepionki oparte na różnych czynnikach wirulencji *M. haemolytica*, wśród których największe znaczenie przypisuje się leukotoksynie (Lkt). Zdolność szczepów do produkcji tej toksyny uznawana jest za jedną z głównych cech patogenności *M. haemolytica* i dotyczy wszystkich szczepów uczestniczących w etiopatogenezie syndromu (3). Dostępne na rynku preparaty komercyjne opracowane zostały w celu zastosowania ich w profilaktyce syndromu oddechowego u bydła. Brak w aktualnej ofercie szczepionek przeznaczonych do zapobiegania chorobom układu oddechowego owiec spowodował,

że w immunoprofilaktyce syndromu, w którym uczestniczy *M. haemolytica*, wykorzystywane są preparaty przeznaczone dla bydła, chociaż ich skuteczność u owiec nie została dotychczas potwierdzona doświadczalnie.

W dostępnych aktualnie szczepionkach wykorzystuje się najczęściej toksoidy inaktywowane aldehydami. W efekcie ich działania następuje zmiana konformacji białek, która pociąga za sobą utratę aktywności biologicznej z możliwą, równoczesną utratą immunogenności. Odmienne oddziaływanie aldehydów na poziomie cząsteczkowym na inaktywowaną toksynę wymaga poszukiwań preparatu, który, znosząc działanie biologiczne, w minimalnym stopniu naruszy struktury immunogenne białka. W grupie aldehydów stosowanych do produkcji toksoidów, poza formaldehydem, zachęcające właściwości posiada aldehyd glutarowy – dialdehyd działający za pomocą niezwykle trwałych wiązań krzyżowych z grupami sulfhydrylowymi, karboksylowymi i aminowymi białek.

Ze względu na udokumentowane właściwości immunogenne natywnej Lkt i potwierdzone możliwości jej wykorzystania w immunoprofilaktyce syndromu oddechowego, a także fragmentaryczne dane dotyczą-

^{*)} Badania finansowane w ramach projektu KBN nr 3P06K01624.

ce właściwości immunogennych, w tym indukcji ochronnego poziomu przeciwciał swoistych oraz możliwości wykorzystania inaktywowanych aldehydami form Lkt u owiec, za cel badań przyjęto: porównanie właściwości immunostymulacyjnych oraz ocenę efektywności profilaktycznej w warunkach terenowych Lkt inaktywowanej aldehydem formylowym lub aldehydem glutarowym, Lkt natywnej i komercyjnej szczepionki Mabovac (Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH, Niemcy); ocenę neutralizujących właściwości przeciwciał skierowanych przeciwko Lkt; ocenę efektu ochronnego przeciwciał indukowanych Lkt w zależności od metod jej inaktywacji przy zakażeniach eksperymentalnych *M. haemolytica* u jagniąt.

Materiał i metody

Leukotoksynę uzyskano zmodyfikowaną metodą Clinckenbeard i wsp. (5). Inaktywację przeprowadzono przy użyciu formaliny i aldehydu glutarowego wg Le Buanec i Bizzini (10). Materiał do immunizacji jagniąt przygotowano wg Confer i wsp. (6). Jedna dawka szczepionki o objętości 2 ml zawierała 1 ml zawiesiny Lkt (natywna, inaktywowana formaldehydem, inaktywowana aldehydem glutarowym), o koncentracji $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ oraz 1 ml wodorotlenku glinu. Zwierzęta szczepiono dwukrotnie w odstępie dwóch tygodni, w iniekcjach s.c. wykonanych w fałd szyjny. Badania wykonano na 25 jagniętach rasy polskiej niziny, w wieku około 3 miesięcy, podzielonych na 5 grup doświadczalnych. Jagnięta gupy I otrzymały natywną Lkt, grupy II – Lkt inaktywowaną formaldehydem, grupy III – Lkt inaktywowaną glutaraldehydem, grupy IV – szczepionkę Mabovac, natomiast jagniętom grupy V – kontrolnej, podano rozcieńczony dwukrotnie adiuwant.

Krew do badań pobierano z żyły szyjnej zewnętrznej w dniach podania szczepionki, a następnie: 7, 14, 21, 28, 35 i 42 dni po pierwszej iniekcji. Uzyskane według standardowych metod surowice przechowywano w temp. -80°C .

Szczepione jagnięta poddano próbie challenge w celu określenia efektu ochronnego w warunkach *in vivo*. Zwierzęta zakażono dotchawczo, cztery tygodnie po drugim szczepieniu (42. dzień doświadczenia). Jako inokulum wykorzystano terenowy szczep *M. haemolytica* serotyp 2 (kolekcja własna) o koncentracji 1×10^8 jtk ml^{-1} PBS w ilości 5 ml na zwierzę (12). Eutanazję jagniąt wykonano w 50. dniu doświadczenia, tj. 8 dni po zakażeniu poprzez dożylną iniekcję pentobarbitalu w dawce 20 mg/kg m.c.

Podstawą do określenia efektu ochronnego przeprowadzonych szczepień była zarówno ocena przyżyciowa, jak też anatomopatologiczne badanie jagniąt poddanych zakażeniu. W ocenie przyżyciowej analizowano objawy kliniczne wg 5-punktowej skali Conlon i wsp. (7) (tab. 1). W ocenie *post mortem* wykorzysta-

tano 5-stopniową (0-4) skalę Blanchard-Channell i wsp. (1) (tab. 2). Dodatkowo z wycinków płuc sekcjonowanych zwierząt wykonano i oceniano preparaty histopatologiczne.

Ocenę koncentracji przeciwciał swoistych wykonano testem ELISA wg Bowersock i wsp. (2), na podstawie analizy absorbancji surowic uzyskanych od zwierząt immunizowanych różnymi formami Lkt. Ocenę właściwości ochronnych przeciwciał surowicznych uzyskanych od szczepionych zwierząt wykonano testem MTT wg Vega i wsp. (14). W teście zastosowano leukocyty bydłce zdrowych zwierząt (4).

Obliczenia statystyczne wykonano przy wykorzystaniu programu Statistica 6.0. W porównaniu zmian pomiędzy grupami zastosowano jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA), z klasycznym testem Fishera. W przypadku odrzucenia hipotezy orzekającej brak różnic między średnimi w grupach, zastosowano test istotności Tukeya. Do oceny zmian w grupach zastosowano test t-Studenta dla zmiennych zależnych.

Wyniki i omówienie

Stan kliniczny jagniąt nieszczepionych, poddanych eksperymentalnemu zakażeniu oceniono na 3 punkty wg skali Conlon i wsp. (7). U wszystkich zwierząt tej grupy obserwowano kaszel, wypływ z nosa, duszność i ogólne osłabienie. W grupach zwierząt szczepionych, odchylenia od prawidłowego stanu klinicznego dotyczyły jedynie obecności słabo nasilonego wypływu z nosa, który oceniono na 0,5 punktu. W trakcie trwania doświadczenia nie zaobserwowano miejscowych oraz ogólnych skutków ubocznych wynikających z zastosowania preparatów szczepionkowych.

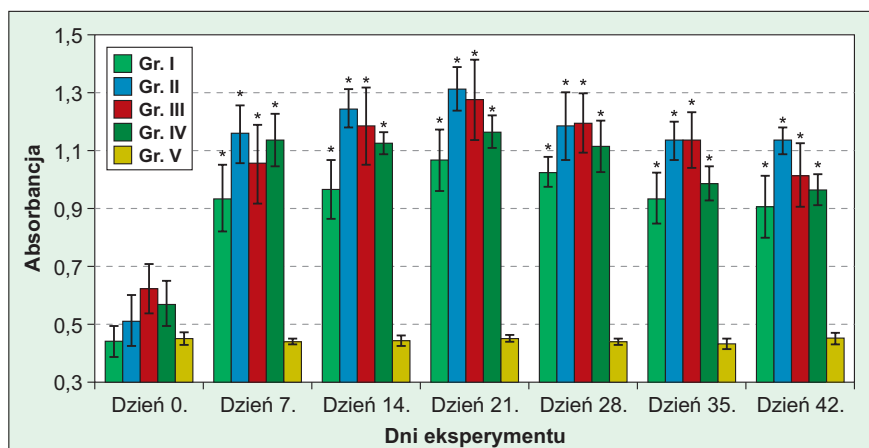
W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że zastosowane preparaty we wszystkich użytych formach miały zachowaną immunogenność, o czym świadczą wysokie miana swoistych przeciwciał powstałych po immunizacji jagniąt. W efekcie szczepienia obserwowano wzrost absorbancji przeciwciał do 14. dnia po pierwszym podaniu antygenów (ryc. 1). Reguła ta nie dotyczyła zwierząt szczepionych szczepionką Mabovac (gr. IV), która indukowała wzrost absorbancji w 7. dniu eksperymentu, utrzymujący się na stałym poziomie w kolejnym pobraniu krwi. Powtórna dawka szczepionki podanych 14. dnia eksperymentu powodowała wzrost absorbancji, która osiągała najwyższe

Tab. 1. Punktowa ocena stanu klinicznego wg Conlon i wsp. (1991)

Punkty	Objawy
0,5	Kaszel
0,5	Wypływ z nosa
1,0	Duszność
0,5	Brak apetytu
0,5	– niechęć spożywania paszy objętościowej – niechęć spożywania paszy treściwej
1,0	Osłabienie, senność
1,0	Brak reakcji na bodźce

Tab. 2. Punktowa ocena zmian anatomopatologicznych widocznych w badaniu *post mortem* wg Blanchard-Channell i wsp. (1987)

Punkty	Odsetkowy udział zmian w płucach
0	Brak zmian
1	< 25% zmian w jednym płacie
2	25%-75% zmian w jednym płacie lub < 25% zmian w co najmniej dwóch płatach
3	> 75% zmian w jednym płacie lub 25%-75% zmian w co najmniej dwóch płatach
4	> 75% zmian w co najmniej dwóch płatach

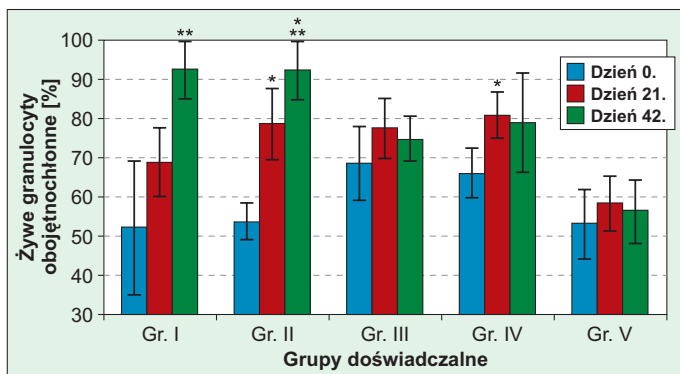


Ryc. 1. Wartości absorbancji surowic szczepionych jagniąt ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Objaśnienia: *statystycznie istotna różnica ($p < 0,05$) w porównaniu do dnia 0. eksperymentu, w poszczególnych grupach doświadczalnych

wartości w 21. dniu doświadczenia. W późniejszym okresie, tj. od 28. dnia wykazano spadek absorbancji, utrzymujący się do 42. dnia po pierwszym podaniu antygenów. Wartości absorbancji w poszczególnych grupach szczepionych zwierząt miały zbliżony charakter. Zaobserwowano istotnie wyższe wartości absorbancji we wszystkich grupach doświadczalnych w porównaniu do kontroli od 7. dnia do końca eksperymentu. Wartości absorbancji we wszystkich dniach doświadczenia uzyskane dla każdej szczepionej grupy zwierząt były istotnie wyższe od wartości oznaczonej w dniu pierwszego podania antygenów ($p < 0,05$).

Uzyskane wyniki nie wykazały istotnych różnic w zależności od rodzaju zastosowanej szczepionki. W odniesieniu do natywnej i inaktywowanej formaldehydem Lkt potwierdzono rezultaty wcześniejszych badań (5). Brak natomiast w dostępnym piśmiennictwie informacji na temat efektywności immunogennej toksoidów Lkt po inaktywacji aldehydem glutarowym. Wyniki zaprezentowanych badań wskazują, że niezależnie od zastosowanych czynników inaktyw-



Ryc. 2. Neutralizujące właściwości przeciwciał surowicznych jagniąt w stosunku do Lkt (test MTT) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Objaśnienia: *statystycznie istotna różnica ($p < 0,05$) w porównaniu do dnia 0. eksperymentu w poszczególnych grupach doświadczalnych; **statystycznie istotna różnica ($p < 0,05$) w porównaniu do grupy kontrolnej (gr. V) w kolejnych dniach eksperymentu

jących (formaldehid i aldehyd glutarowy), oba toksoidy zachowują porównywalne właściwości immunogenne.

Wykorzystanie Lkt w immunizacji z oczywistych względów nie zapobiega zakażeniom wywołanym przez serotypy *M. haemolytica* uczestniczące w patologii chorób płuc przeżuwaczy. Neutralizujące właściwości przeciwciał skierowanych przeciwko Lkt zapewniają na ogół zahamowanie biologicznego oddziaływania toksyny, a tym samym rozwój klinicznego procesu chorobowego (11). W wykonanym teście MTT potwierdzono istotnie podwyższone zdolności neutralizujące przeciwciał zawartych w surowicy szczepionych zwierząt doświadczalnych w stosunku do Lkt,

zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej, jak i do wartości przed szczepieniem. Najwyższym efektem ochronnym charakteryzowały się surowice zwierząt szczepionych Lkt inaktywowaną formaldehydem (gr. II). Nieco niższe wartości uzyskano w surowicach zwierząt szczepionych Lkt natywną (gr. I). Niższe wartości uzyskano w odniesieniu do surowic zwierząt immunizowanych preparatem Mabovac (63,45%) oraz Lkt inaktywowaną aldehydem glutarowym (gr. III – 58,75%). Średni odsetek komórek chronionych neutralizującym działaniem przeciwciał uzyskanych w grupach szczepionych Lkt natywną oraz inaktywowaną formaldehydem był istotnie wyższy od wartości uzyskanych dla surowic uzyskanych od zwierząt szczepionych Lkt inaktywowaną glutaraldehydem, co ilustruje ryc. 2. Działanie przeciwciał neutralizacyjnych, blokujące cytotoksyczny efekt natywnej formy Lkt w stosunku do granulocytów obojętnochłonnych *in vitro* oraz ich wysoki poziom, nie są równoznaczne z uzyskaniem protekcji u szczepionych zwierząt. Dlatego też skuteczność przygotowanych we własnym zakresie antygenów szczepionkowych została oceniona w próbie challenge, szczepionych wcześniej zwierząt.

Wykonana *post mortem* analiza makroskopowa płuc, pochodzących od zwierząt szczepionych oraz jagniąt grupy kontrolnej wykazała w zastosowanej punktowej ocenie zmian anatomopatologicznych istotne różnice. Płuca zwierząt nieszczepionych, poddanych zakażeniu wykazywały zmiany patologiczne obejmujące > 75% tkanki płucnej, co najmniej dwóch płatów, co odpowiadało wartości 4 w 5-punktowej skali. U zwierząt szczepionych obserwowane zmiany obejmowały < 25% tkanki jednego płata, co odpowiadało 1 punktowi skali.

W preparatach histopatologicznych płuc, pochodzących od zwierząt szczepionych i zakażonych eksperymentalnie, zmiany dotyczyły oskrzeli, oskrzelików oraz przestrzeni okołoskrzelowej. Całość obserwowanych zmian miała charakter ostrego zapalenia oskrzeli z tendencją do zajęcia procesem przyległej

tkanki okołoskrzelowej (*peribronchitis*). Analiza porównawcza zmian tkanki płucnej uzyskiwanej od zwierząt, które szczepiono różnymi preparatami nie wykazała różnic ani w charakterze, ani w stopniu zaawansowania. Najwyższy stopień nasilenia zmian obserwowano w grupie zwierząt nieszczepionych. Analizowany obraz mikroskopowy wskazywał na ostre, odoskrzelowe, nieżytowe zapalenie płuc (*bronchopneumonia catarrhalis acuta*). Uwzględnienie zmian makro- i mikroskopowych u jagniąt grup badanych potwierdziło istotny udział przeciwciał neutralizujących w ograniczeniu patologii powodowanej przez Lkt. Uzyskane wyniki stanowią potwierdzenie obserwacji dotyczących rozwoju zakażeń zarówno po szczepieniach pełną, żywą komórką *M. haemolytica*, jak i immunogennymi preparatami podjednostkowymi wykorzystującymi, między innymi, Lkt (7, 13).

Uzyskane wyniki wskazują, że anatoksyna Lkt ze szczepów *M. haemolytica* izolowanych od bydła, indukuje skuteczną odpowiedź immunologiczną u jagniąt, co sugeruje możliwość jej zastosowania jako antygeny szczepionkowego u tego gatunku przeżuwa-
czy.

Piśmiennictwo

1. Blanchard-Channell M. T., Ashfaq M. K., Kadel W. L.: Efficacy of a streptomycin – dependent, live *Pasteurella haemolytica* vaccine against challenge exposure to *Pasteurella haemolytica* in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1987, 48, 637-642.
2. Bowersock T. L., Waleed W. S., Shalaby L. M., Levy M., Samules M. L., Lallone R., White M. R., Borie D. L., Lehmeier J., Park K.: Evaluation of an administered vaccine using hydrogels containing bacterial exotoxins of *Pasteurella haemolytica*, in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1994, 55, 500-509.
3. Burrows L. L., Olah-Winfield E., Lo R. Y. C.: Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *P. haemolytica* serotypes 1 to 16. *Infect. Immun.* 1993, 61, 5001-5007.
4. Clinkenbeard K. D., Upton M. L.: Lysis of bovine platelets by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Am. J. Vet. Res.* 1991, 52, 453-457.
5. Clinkenbeard K. D., Clinkenbeard C. R., Waurzyniak B. J.: Chaotropic agents cause disaggregation and enhanced activity of *P. haemolytica* leukotoxin. *Vet. Microbiol.* 1995, 45, 201-209.
6. Confer A. W., Clinkenbeard K. D., Gatewood D. M., Driskel B. A., Montelongo M.: Serum antibody responses of cattle vaccinated with partially purified native *P. haemolytica* leukotoxin. *Vaccine* 1997, 15, 1423-1429.
7. Conlon J. A., Shewen P. E., Lo R. Y. C.: Efficacy of recombinant leukotoxin in protection against pneumonic challenge with live *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect. Immunol.* 1991, 59, 587-591.
8. Davies R. L., Whittam T. S., Selander R. K.: Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (lktA) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*. *J. Bacteriol.* 2001, 183, 1394-1404.
9. Fodor L., Varga J., Hajtos I., Molnar T.: Serotypes of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* isolated from farm animal in Hungary. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 1999, 46, 241-247.
10. Le Buanec H., Bizzini B.: Procedures for preparing biologically inactive, but immunogenic HIV-1 Tat protein (Tat Toxoid) for human use. *Biomed. Pharmacother.* 2000, 54, 41-44.
11. Purdy C. W., Straus D. C.: Efficacy of a capsule preparation and ultraviolet-killed *Pasteurella haemolytica* A1 vaccine in goats. *Small Rumin. Res.* 1995, 15, 177-186.
12. Ramirez-Romero R., Brodgen K. A., Gallup J. M., Sonea I. M., Ackermann M. R.: Mast cell density and substance P-like immunoreactivity during the initiation and progression of lung lesions in ovine *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* pneumonia. *Microb. Pathog.* 2001, 30, 325-335.
13. Srinand S., Ames T. R., Maheswaran S. K., King V. L.: Efficacy of various vaccines against pneumonic pasteurellosis in cattle: a meta-analysis. *Prev. Vet. Med.* 1995, 25, 7-17.
14. Vega M. V., Maheswaran S. K., Leininger J. R., Ames T. R.: Adaptation of colorimetric microtitration assay for quantifying *Pasteurella haemolytica* A1 leukotoxin and antileukotoxin. *Am. J. Vet. Res.* 1987, 48, 1559-1564.
15. Wernicki A., Puchalski A., Urban-Chmiel R.: Antybiotykowrażliwość oraz profil plazmidowy szczepów *Pasteurella haemolytica*. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 623-626.

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