

**lek. wet. Krzysztof Blicharski**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Pasywna immunoterapia  
i immunoprofilaktyka innowacyjną  
surowicą skierowaną przeciwko rHsp60  
i rOMP40 oraz koniugatom tych białek  
z oligosacharydem LPS**

Promotor: prof. dr hab. Tadeusz Stefaniak

Promotor pomocniczy: dr hab. Paulina Jawor, prof. UPWr

Zakład Immunologii i Prewencji Weterynaryjnej  
Katedra Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu  
Przyrodniczego we Wrocławiu

Wrocław 2023

Praca powstała w ramach grantu NCBR: PBS3/A8/33/2015 „Opracowanie szczepionek podjednostkowych dla bydła i świń opartych na rekombinowanych antygenach Hsp60, OMP 40 oraz części rdzeniowej LPS bakterii Gram-ujemnych”

## 9. STRESZCZENIE

Zastosowanie surowic odpornościowych nowej generacji w profilaktyce i wspomaganiu leczenia chorób narządu oddechowego kryje w sobie ogromny potencjał. W celu przeprowadzenia doświadczenia eksperymentalną surowicę odpornościową pozyskano z krwi zdrowych krów-dawców po sześciokrotnej podskórnej hiperimmunizacji szczepionką podjednostkową, zawierającą rekombinowane białka - Hsp60 *Histophilus somni* oraz OMP40 *Histophilus somni*. W szczepionce zawarto również koniugaty badanych białek (rHsp60 *Histophilus somni* oraz rOMP40 *Histophilus somni*) z częścią rdzeniową LPS *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Szczepienie zwierząt wywołało intensywną odpowiedź immunologiczną wobec tych antygenów. Najwyższą reaktywność przeciwciał zaobserwowano w podklasie IgG<sub>1</sub>, a także w mniejszym stopniu w IgG<sub>2</sub>. Istotny wzrost aktywności przeciwciał w podklasie IgG<sub>1</sub>, w stosunku do próbki wyjściowej, odnotowano po 2. szczepieniu ( $p \leq 0,01$ ), zaś ta różnica utrzymywała się do końca badania. Podobnie zachowywały się przeciwciała z podklasy IgG<sub>2</sub>, z tą różnicą, że istotny wzrost aktywności przeciwciał nastąpił już po 1. szczepieniu. Zastosowana szczepionka prowadziła do umiarkowanego wzrostu reaktywności przeciwciał klasy IgM i IgA. Wchodzące w skład szczepionki koniugaty rHsp60 *Histophilus somni* oraz rOMP40 *Histophilus somni* z oligosacharydem LPS nie wywoływały istotnego wzrostu reaktywności przeciwciał wobec LPS w otrzymanej eksperymentalnej surowicy odpornościowej. Przygotowaną eksperymentalną surowicę odpornościową zastosowano profilaktycznie oraz jako środek wspomagający leczenie chorób narządu oddechowego u cieląt. Cielęta rodziły się w trzech oddalonych od siebie fermach, zaś cielętnik zbiorczy znajdował się na jednej z tych ferm.

W celu oceny profilaktycznego działania u cieląt, surowicę podawano w okresie letnim oraz zimowym bezpośrednio po urodzeniu oraz w dniu przerzutu zwierząt do cielętnika zbiorczego. Do porównania utworzono grupę kontrolną oraz grupę cieląt otrzymujących surowicę normalną. W każdej grupie znajdowało się po 20 zwierząt. Cielęta badano co miesiąc od urodzenia do ukończenia 6. miesiąca życia. Oceniano przyrosty masy ciała, przeprowadzano badania kliniczne, odnotowywano przypadki zachorowań ze strony narządu oddechowego oraz pobierano próbki krwi do badań laboratoryjnych oraz wymazy z jamy nosowej. W próbkach krwi oznaczano białka ostrej fazy (Fb, Hp, SAA), poziomy immunoglobulin w klasach G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> oraz M oraz przeciwciała na obecność BHV-1, BRSV, BVDV, PI-3 oraz *M. bovis*. Podanie cielętom surowicy eksperymentalnej w okresach zwiększonego ryzyka wzmocniło odporność, ponieważ zachorowalność w grupie

eksperymentalnej była istotnie niższa w porównaniu z pozostałymi grupami ( $p < 0,05$ ), jednak nie wpłynęła na polepszenie przyrostów masy ciała.

Oceniono również skuteczność zastosowania surowicy w leczeniu cieląt z objawami BRD o niskim i znacznym stopniu nasilenia. Każdą z tych grup porównywano z grupą kontrolną leczoną bez wykorzystania surowicy. Próbki krwi do badań laboratoryjnych pobierano w 0., 7., 14. dniu leczenia oraz w 6. miesiącu życia. W pobranych próbach krwi oceniano te same parametry jak w doświadczeniu z profilaktycznym użyciem surowicy. Podskórne podanie surowicy, jako uzupełnienie leczenia antybiotykami i NLPZ infekcji dróg oddechowych, skróciło występowanie objawów klinicznych w porównaniu z cielętami kontrolnymi, wpłynęło korzystnie na zdrowie cieląt w późniejszych okresach, jednak nie wpłynęło na polepszenie przyrostów masy ciała.

## 10. ABSTRACT

The use of novel antisera in the prevention and support of treatment of respiratory diseases holds great potential. For the study, experimental antiserum was obtained from the blood of healthy donor cows after six-fold subcutaneous hyperimmunization with a subunit vaccine containing the recombinant proteins - Hsp60 and OMP40 from *Histophilus somni*. Vaccination of the animals induced an intense immune response against these antigens. The highest antibody reactivity was observed in the IgG<sub>1</sub> subclass, and to a lesser extent in IgG<sub>2</sub>. A significant increase in the level of antibodies in the IgG<sub>1</sub> subclass, compared to the baseline sample, was recorded after the 2nd vaccination ( $p \leq 0.01$ ), and this difference persisted until the end of the study. The behavior of IgG<sub>2</sub> subclass antibodies was similar, with the difference that a significant increase in antibody levels appeared after the 1st vaccination. The used vaccine led to a moderate increase in IgM and IgA class antibody reactivity. The vaccine also contained conjugates of the test proteins (rHsp60 *Histophilus somni* and rOMP40 *Histophilus somni*) with the core oligosaccharide of the LPS *Actinobacillus pleuropneumoniae*, but there was no significant increase in antibody reactivity in the obtained antiserum. The prepared experimental antiserum was used prophylactically and as an adjunct to the treatment of respiratory diseases in calves. Calves were born on three farms located in different places and transported to the calfbarn which located on one of these farms.

In order to evaluate the prophylactic effect in calves, the serum was administered during the summer and winter immediately after birth and on the day the animals were transported to the calfbarn. A control group and a group of calves receiving normal serum were formed for comparison. There were 20 animals in each group. Calves were examined monthly from birth until they were six months old. Weight gain was evaluated, clinical examinations were carried out, respiratory morbidity was recorded and blood samples were taken for laboratory tests and nasal swabs were taken. Blood samples were used to determine acute phase proteins (Fb, Hp, SAA), immunoglobulin levels in classes G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> and M, and antibodies to BHV-1, BRSV, BVDV, PI-3 and *M. bovis*. The administration of experimental serum to calves during periods of increased risk enhanced immunity, as morbidity in the experimental group was significantly lower compared to the other groups ( $p < 0.05$ ), but did not improve weight gain.

Additionally in this study the effectiveness of serum use in treating calves with low- and severe BRD symptoms was evaluated. Each experimental group was compared with a control group treated without the serum. Blood samples for laboratory tests were collected at

0, 7, 14 days of treatment and at 6 months of age. In the blood samples collected, the same parameters were assessed, as in the experiment with the prophylactic use of serum. The subcutaneous administration of serum, as an adjunct to treatment with antibiotics and NSAIDs for respiratory tract infections, reduced the incidence of clinical signs compared to control calves, had a positive effect on the health of the calves at later stages, but did not improve weight gain.