

# Wpływ immunostymulatorów na serokonwersję po szczepieniu przeciwko chorobie Derzsyego u gęsi

ELŻBIETA SAMOREK-SALAMONOWICZ, HANNA CZEKAJ,  
WOJCIECH KOZDRUŃ, MARIA WILCZYŃSKA-KOWAL\*

Zakład Anatomii Patologicznej Państwowej Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57- 24-100 Puławy,  
\*Lecznica dla Zwierząt, ul. Głowackiego 16, 28-300 Jędrzejów

Samorek-Salamonowicz E., Czekaj H., Kozdruń W., Wilczyńska-Kowal M.

## The influence of immuno-stimulators on sero-conversion after vaccination against Derzsy's disease in geese

### Summary

Studies were carried out on three flocks of laying geese marked A, B and C. All the geese were vaccinated against Derzsy's disease with Dervac before the laying period. The vaccine was administered twice at 4-week intervals in a dose of  $10^{4.3}$  TCID<sub>50</sub>. Additionally, birds in flock A received Lydium KLP (0.02 mg/kg, i.m.). In the case of flock B, Levamisol was given in drinking water (2.5 mg/kg) on the day of vaccination and the following day. Control flock C received no immuno-stimulators. All birds were observed during the entire laying season. Twenty blood samples and 15 eggs from each flock were collected to determine the antibody level in serum and egg yolks. The samples were taken on the day of vaccination, at the beginning, middle and end of the laying season. Antibody titres were examined by ELISA and sero-neutralisation (SN) tests. The antibody titres taken at the beginning of the laying season were high both in serum and antibodies in yolk samples. Following this the antibody titres decreased – however in birds which received immuno-stimulators the decrease was less evident. The administration of immuno-stimulators increases antibody production, improves and prolongs humoral response in adult birds as well as guaranteeing the transmission of maternal antibodies to egg yolk, thus protecting progeny against Derzsy's disease.

**Keywords:** vaccination against Derzsy's disease, Lydium KLP, Levamisol, sero-neutralisation test, ELISA.

Intensywna i wielkotowarowa hodowla wyselekcjonowanych, wysokoprodukcyjnych linii ptaków, prowadzi często do upośledzenia czynności ich układu odpornościowego. Skupienie dużej liczby ptaków na małej powierzchni, liczne czynniki stresogenne oraz różne czynniki środowiskowe mogą oddziaływać immunosupresyjnie (19, 20). Wykazano bowiem, że w intensywnej hodowli drobiu nawet krótkotrwałe pozbawienie ptaków dostępu do wody (7), krótkotrwały głód (4), nagminne stosowanie antybiotyków powodują zaburzenia w odpowiedzi immunologicznej. Panigraphy i wsp. (12) wykazali, że gentamycyna i oksytetracyklina są przyczyną obniżenia w surowicy ptaków poziomu immunoglobulin IgA, IgM i IgG.

Zaburzenia immunohomeostazy mogą powodować z jednej strony wzrost podatności na infekcje, z drugiej zaś słabszą odpowiedź poszczepienną. Dlatego też zostały podjęte próby sterowania endogennymi mechanizmami odpornościowymi przy pomocy farmakologicznych immunomodulatorów (14, 19). Zastosowanie naturalnych lub syntetycznych preparatów immunosty-

mulujących powoduje modulację odpowiedzi immunologicznej organizmu, polegającą na skróceniu czasu powstawania, podniesieniu poziomu lub przedłużeniu czasu trwania odpowiedzi immunologicznej.

W hodowli drobiu praktyczne znaczenie znalazł levamisol (3), preparat przeciw pasożytniczy, który w zależności od dawki wykazuje określone działania immunomodulacyjne (11): w dawkach wyższych działa immunosupresyjnie, zaś w dawkach niższych immunostymulująco. Wykazano, że u kurcząt działa adiuwancyjnie (3, 8) zwiększając efektywność szczepień przeciwko rzekomemu pomorowi drobiu (ND) oraz kokcydiozie poprzez wzmocnienie odpowiedzi humoralnej jak i komórkowej (3). Dimer lizozymu występujący pod nazwą handlową Lydium KLP (NIKA) (5) znalazł zastosowanie jako preparat poprawiający efekty produkcyjne w odchowie kurcząt (15) oraz wspomagający w leczeniu pasterelozy indyków (9) i podwyższający wskaźniki immunologiczne u kurcząt po szczepieniu przeciwko ND (21). Adiuwancyjne właściwości immunostymulatorów dotychczas nie były badane u gęsi.

Choroba Derzsyego, której czynnikiem etiologicznym jest parwovirus zwany wirusem choroby Derzsyego powoduje znaczne straty w hodowli gęsi (6). Jedynym skutecznym sposobem jej zapobiegania są szczepienia profilaktyczne, którym poddaje się stada rodzicielskie (16, 18). Uodpornione nioski przekazują na potomstwo przeciwciała chroniące gąsięta przed chorobą. Jednakże mimo stosowania szczepień, u gąsiąt leżonych pod koniec sezonu lęgowego, ze względu na niski poziom przeciwciał matczynych, notuje się przypadki choroby Derzsyego (16).

Celem badań było określenie odpowiedzi humoralnej u gęsi po szczepieniu przeciwko chorobie Derzsyego stymulowanej preparatami immunomodulującymi Lydium KLP i Levamisol.

### Material i metody

Immunomodulatory – Lydium – KLP (Nika Health Products Ltd.), którego substancję czynną stanowi dimer lizozymu; preparat stosowano w dawce po 0,02 mg/kg m.c. domięśniowo, zgodnie ze wskazaniami producenta.

Levamisol (Biowet Gorzów) – substancję czynną stanowi lewoskrętna postać tetramisolu. Podawano go w wodzie do picia po 2,5 mg/kg m.c.

Szczepionka przeciwko chorobie Derzsyego. Stosowano szczepionkę Dervac produkcji własnej. Jest to żywa, liofilizowana szczepionka zawierająca atenuowany szczep parwovirusa namnożony w hodowli fibroblastów zarodka gęsięgo (GEF). Szczepionkę podawano domięśniowo, jedna dawka zawierała  $10^{4,3}$  TCID<sub>50</sub> wirusa w 0,5 ml.

Gęsi. Doświadczenia wykonywano w znajdujących się w różnych fermach 3 stadach reprodukcyjnych, liczących po około 400 gęsi w trzecim roku nieśności. W tych stadach nie notowano problemów zdrowotnych i nie wykonywano zabiegów leczniczych, a jedynie podawano preparaty mineralno-witaminowe. Gęsi szczepiono dwukrotnie, 6 tygodni przed okresem nieśności, stosując 4 tygodniową przerwę między szczepieniami. Szczepionkę podawano domięśniowo w dawce 0,5 ml zawierającej  $10^{4,3}$  TCID<sub>50</sub> wirusa. Równocześnie ze szczepionką gęsiom w stadzie A podawano preparat Lydium KLP domięśniowo w dawce 0,02 mg/kg m.c. (osobna iniekcja). Gęsiom w stadzie B podano dwukrotnie w dniu szczepienia i następnego dnia w wodzie do picia Levamisol w dawce 2,5 mg/kg m.c. Gęsiom w stadzie C, stanowiącym kontrolę nie podano preparatu immunostymulującego. Układ doświadczenia przedstawiono w tab. 1.

Surowice gęsi. Do badań użyto 180 surowic pochodzących od gęsi z tych stad. Surowice przed wykonaniem badań inaktywowano w łaźni wodnej w temp. 56°C przez 30 min.

Przygotowanie żółtek jaj gęsi do oznaczania obecności przeciwciał matczynych. Użyto 120 jaj wylęgowych,

Tab. 1. Układ doświadczenia

Ferma	Wiek ptaków (lata)	Liczba ptaków	Szczepienie przeciwko DDV	Immunomodulator	
				nazwa	dawki i drogi podania
A	3	380	6 tyg. i 2 tyg. przed nieśnością	Lydium KLP	0,02 mg/kg m.c. domięśniowo
B	3	420	6 tyg. i 2 tyg. przed nieśnością	Levamisol	2,5 mg/kg m.c. w wodzie do picia
C	3	390	6 tyg. i 2 tyg. przed nieśnością	-	-

1 ml żółtka mieszano z 1 ml płynu PBS. Zawiesinę łączono w równych objętościach (v/v) z chloroformem i pozostawiano w temp. pokojowej przez 1 h. Po tym czasie wirovano przez 20 min. przy  $190 \times g$ . Supernatant inaktywowano w temp. 56°C przez 30 min.

Hodowle fibroblastów zarodka gęsięgo (GEF). Przygotowywano je z 14-dniowych zarodków gęsi wg ogólnie przyjętych zasad. Podłoże wzrostowe stanowił płyn Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy cielęcej i antybiotyków. Podłoże utrzymujące składało się z płynu Eagle'a z antybiotykami.

Antygeny. Do odczynu seroneutralizacji (SN) używano szczepu B-38 namnożonego w hodowli GEF. Jego miano wynosiło  $10^{6,4}$  TCID<sub>50</sub>. Szczep ten przechowywano w stanie zliofilizowanym. Do odczynu ELISA antygen sporządzano ze szczepu B-38 namnożonego w komórkach GEF, a następnie oczyszczonego i zagęszczonego przez ultrawirowanie.

Odczyn seroneutralizacji (SN). Wykonywano metodą  $\beta$  w 96 basenikowych płytkach w hodowli komórek fibroblastów zarodka gęsięgo (GEF) wg ogólnie przyjętych zasad. Stosowano stałą dawkę wirusa 100 TCID<sub>50</sub>, surowice lub wyciąg z żółtka rozcieńczano w odstępach dwukrotnych od 1/10 do 1/10 240. Płytki inkubowano w temp. 37°C z dodatkiem 5% CO<sub>2</sub>, przy wilgotności 85%. Po 5-7 dniach inkubacji oceniano występowanie efektu cytopatycznego w mikroskopie świetlnym (pow.  $10 \times 10$ ) i określano rozcieńczenie surowicy powodujące neutralizację wirusa. Miano SND<sub>50</sub>, czyli najwyższe rozcieńczenie surowicy powodujące neutralizację 50% wirusa wyliczono wg Reeda i Muencha (13). Za wynik dodatni uznawano miano SND<sub>50</sub> > 20 (log SND<sub>50</sub> 1,3).

Test ELISA. Wykonywano w płytkach firmy Nunclon. Na powierzchni baseników opłaszczonych antygenem produkcji własnej. Surowice badane oraz kontrolne rozcieńczano 1/100, natomiast próby z żółtek rozcieńczano 1/10. Stosowano koniugat produkcji własnej, który stanowiła immunoglobulina królika przeciwko IgG gęsi znakowana peroksydazą chrzanową, substrat stanowił ABTS (Sigma). Wyniki reakcji barwnej odczytywano w spektrofotometrze przy długości fali 405 nm. Próby uznawano za dodatnie o wartości gęstości optycznej OD wyższej od 0,200, za wątpliwe o wartości  $-0,200 > OD > 0,150$ , natomiast w próbach ujemnych OD wynosiło poniżej 0,150 (17).

Tab. 2. Wpływ immunomodulatorów na serokonwersję po szczepieniu przeciwko chorobie Derzsyego u gęsi

Stado	Miana przeciwciał							
	przed nieśnością		początek nieśności		środek nieśności		koniec nieśności	
	log SND <sub>50</sub>	OD	log SND <sub>50</sub>	OD	log SND <sub>50</sub>	OD	log SND <sub>50</sub>	OD
A	1,66	0,218	2,92	0,443	2,27	0,427	2,55	0,376
B	1,62	0,186	2,84	0,475	2,66	0,430	2,24	0,310
C	1,57	0,236	2,86	0,398	2,71	0,410	1,85	0,264

Tab. 3. Wpływ immunomodulatorów na poziom przeciwciał matczyńskich w żółtkach jaj gęsi w różnych okresach nieśności

Stado	Miana przeciwciał					
	początek nieśności		środek nieśności		koniec nieśności	
	log SND <sub>50</sub>	OD	log SND <sub>50</sub>	OD	log SND <sub>50</sub>	OD
A	2,73	0,461	2,58	0,483	2,36	0,352
B	2,56	0,397	2,45	0,465	2,20	0,353
C	2,48	0,428	2,25	0,411	1,76	0,248

### Wyniki i omówienie

Gęsi obserwowano przez cały okres sezonu lęgowego. Podanie preparatów immunostymulujących Lydium KLP czy Levamisolu nie spowodowało u nich objawów chorobowych ani padnięć. Sezon nieśny rozpoczęły one w pierwszej połowie lutego, w tym samym terminie co gęsi w stadzie kontrolnym. Liczba znoszonych jaj jak i procent wylęgowości były w tych stadach wyższe o około 4%. Badania Borzemskiej i wsp. (1) wykazały, że podanie zarodkom kurzym Lydium KLP w dawce 100× wyższej od leczniczej nie podwyższało wskaźników wylęgu, jedynie nieistotnie zmniejszało brakowanie piskląt i nieznacznie przedłużało czas przeżycia zarodków zamaryłych.

Poziom przeciwciał w surowicach gęsi niosek, jak i poziom przeciwciał matczyńskich w żółtkach jaj, określano w odczynie seroneutralizacji i ELISA. Wyniki przedstawiono w tab. 2 i 3. U gęsi wszystkich stad przed sezonem lęgowym stwierdzano niewielkie ilości przeciwciał. Miano ich było niskie, log SND<sub>50</sub> wynosił od 1,57 (stado C) do 1,66 (stado A). Wartości OD uzyskane w teście ELISA również były niskie i kształtowały się w granicach dolnych wartości wyników dodatnich. Stada zostały poddane szczepieniu i dwa tygodnie później przeprowadzono badanie poziomu przeciwciał. Log SND<sub>50</sub> i wartości OD były wysokie i miały zbliżoną wartość w badanych fermach, wynoszącą od 2,92 do 2,86 (log SND<sub>50</sub>) lub od 0,443 do 0,398 (OD). W ciągu 2 miesięcy poziom przeciwciał wykazywał nieznaczny spadek. Badanie wykonane w środku sezonu lęgowego wykazało spadek wartości log SND<sub>50</sub> od 0,15 (stado C) do 0,17

(stado A) oraz wartości OD od 0,012 (stado C) do 0,045 (stado B). Następne badanie wykonane pod koniec sezonu lęgowego (czerwiec) wykazało dalszy spadek poziomu przeciwciał, lecz był on znacznie mniejszy w fermach, w których stosowano immunomodulatory. W fermie A spadek ten wyrażony w postaci log SND<sub>50</sub> wynosił 0,37, w fermie B – 0,6, natomiast u gęsi, którym nie podano preparatu immunomodulującego wynosił on 1,01, czyli miano przeciwciał było ponad dziesięciokrotnie niższe niż początkowe.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że oba stymulatory przedłużały czas trwania odpowiedzi humoralnej i powodowały utrzymywanie się przeciwciał w surowicach ptaków na poziomie pozwalającym na zabezpieczenie potomstwa przed chorobą.

Równoległe z określaniem występowania przeciwciał w surowicy gęsi niosek, określano ich transmisję do żółtek jaj wylęgowych. Wyniki przedstawiono w tab. 3. Przez cały okres doświadczenia miana przeciwciał matczyńskich w żółtkach jaj były na poziomie zbliżonym do poziomu występującego w surowicach gęsi. Na początku sezonu lęgowego, na wszystkich fermach, stwierdzano wysoki poziom przeciwciał matczyńskich przekazywanych poprzez jaja. Log SND<sub>50</sub> wynosił 2,73 (ferma A) – 2,48 (ferma C). Odczyn seroneutralizacji wykonany z wyciągami żółtkowymi pochodzącymi z jaj złożonych w środku sezonu lęgowego wykazał nieznaczny spadek poziomu przeciwciał matczyńskich, który wyrażony w log SND<sub>50</sub> wynosił 0,15 dla fermy A, 0,11 dla fermy B i 0,23 dla fermy C. Jednakże miana przeciwciał matczyńskich były na poziomie uznawanym za wystarczający i zabezpieczający potomstwo przed zakażeniem wirusem terenowym. Przyjmuje się bowiem powszechnie, że miano swoistych przeciwciał matczyńskich wyrażone log SND<sub>50</sub> i wynoszące co najmniej 1,6 zabezpiecza gąsięta, w przypadku ich zetknięcia się z wirusem terenowym, przed rozwojem tego wirusa w organizmie (2, 10). Pod koniec okresu nieśności poziom przeciwciał matczyńskich w żółtkach jaj pochodzących z fermy A i B pomimo nieznacznego spadku nadal utrzymywał się na poziomie zabez-

pieczającym gąsięta przed chorobą. Natomiast w tym czasie w żółtkach jaj pochodzących od gęsi ze stada C, które nie otrzymywało immunostymulatorów, stwierdzano znaczny spadek poziomu przeciwciał neutralizujących, wynosił on 0,72 log SND<sub>50</sub>. Miana przeciwciał wynosiły 1,76 log SND<sub>50</sub>, czyli były w dolnych granicach dodatnich. W jajach pochodzących z tej fermi przez cały okres doświadczenia stwierdzano niższy poziom przeciwciał niż w pozostałych 2 fermach.

Porównanie wyników dwóch odczynów seroneutralizacji i ELISA wykazało, że przy określaniu poziomu przeciwciał w surowicy jak i przeciwciał matczynych w żółtku mogą być stosowane obydwie odczyny. Odczyn seroneutralizacji dotychczas był powszechnie stosowany, jednakże jest pracochłonny i czasochłonny, a do wykonania wymaga zarodków gęsi, które są dostępne jedynie w okresie sezonu lęgowego. Test ELISA jest łatwy, szybki i przydatny do diagnostyki rutynowej. Może być wykonywany przez cały rok zarówno w celach diagnostycznych jak i do określania stopnia uodpornienia gęsi, a także do określenia poziomu przeciwciał matczynych w jajach. U gęsi niosek, którym podano immunomodulatory: Lydium KLP lub Levamisol równolegle ze szczepieniem przeciwko chorobie Derzsyego, przez cały okres sezonu lęgowego, stwierdzano wyższy poziom i dłużej utrzymujące się swoiste przeciwciała w surowicy niż u gęsi nie otrzymujących immunostymulatorów. Przez cały okres sezonu lęgowego poziom przeciwciał matczynych w żółtkach jaj gęsi, którym podczas szczepienia podano immunostymulatory był na poziomie wystarczającym do zabezpieczenia wylężonych gąsiąt przed chorobą Derzsyego.

## Piśmiennictwo

1. Borzemska W., Karpińska E., Świerczewska E., Kosowska G., Szeleszczuk P., Malec H., Malicka E., Binek M., Niedziółka J.: *Medycyna Wet.* 53, 606, 1997.
2. Bouquet J. F., Rousselat-Palley D., Tixier G., Moreau J.: *Proc. Symposium Palmipedes*, Weybridge, 27/08/81, 1982, s. 11.
3. Cho Y., Musa Kwalli.: *Poult. Sci.* 63, 79, 1984.
4. Jakubowski K., Zieliński H., Jedlińska-Krakowska M.: *Acta Acad. Agric. Tech. Ols. Vet.* 24, 186, 1996.
5. Kiczka W.: *Życie wet.* 4A, 131, 1994.
6. Kisary J.: *Derzsy's Disease of geese*. w: *Virus Infection of Birds*. t. 4, wyd. J. B. McFerran i M. S. McNulty. Elsevier Science Publishers, Amsterdam-London-New York-Tokyo, 1993, s. 157.
7. Konodo Y., Taniguchi J., Sakoe A. A.: *Jap. Poult. Sci.* 30, 372, 1988.
8. Krzyżanowski J., Siwicki A. K., Tomczyk G.: *Annls Univ. Marie Curie-Skłodowska*, Lublin, 20, 203, 1995.
9. Mamczur J., Mazurkiewicz M.: *Mat. X Kongresu PTNW*, Wrocław, t. II, 1996, s. 350.
10. Marious V., Bonnound P., Guillet M., Trap D., Benezan G.: *Avian Pathol.* 12, 419, 1983.
11. Obmińska-Domaradzka B.: *Mat. VII Symp. Drobiarskie*, Polanica Zdrój 1993, s. 160.
12. Panigraphy B., Grumbles L. C., Millar D., Naqui S., Hall C. F.: *Avian Dis.* 23, 401, 1979.
13. Reed A., Muench H.: *Am. J. Hyg.*, 27, 493, 1938.
14. Rutherford M.: *Rekonstrukcyjny wpływ Mycobacterium chelonae na odpowiad immunologiczną drobiu będącego w stanie immunosupresji*. Praca dokt. ART Olsztyn, 1999.
15. Rutkowski A., Kiczka W., Janicki Cz.: *Pol. Drobiarstwo* 7, 16, 1995.
16. Samorek-Salamonowicz E., Czekaj H., Tomczyk G., Musialik M.: *Medycyna Wet.* 45, 336, 1989.
17. Samorek-Salamonowicz E., Czekaj H., Kozdrui W.: *Urząd Patentowy RP*, wniosek nr P 317361, 1996.
18. Samorek-Salamonowicz E., Czekaj H., Kozdrui W.: *Medycyna Wet.* 54, 305, 1998.
19. Szeleszczuk P.: *Mat. Konf. Naukowej Aktualne problemy w patologii drobiu*, Wrocław 1991, s. 34.
20. Szeleszczuk P. i wsp.: *Mat. Konf. Naukowej Aktualne problemy w patologii drobiu*, Wrocław 1991, s. 36.
21. Świącicka-Grabowska G., Wiśniewski J., Rotkiewicz Z.: *Mat. X Kongresu PTNW*, Wrocław, t. II, 1996, s. 436.

Adres autora: prof. dr hab. Elżbieta Samorek-Salamonowicz, ul. Leśna 9/48, 24-100 Puławy; E-mail: [elsam@piwet.pulawy.pl](mailto:elsam@piwet.pulawy.pl)

## Zakład Chorób Zwierząt Mięsożernych i Futerkowych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego

informuje, że w dniach 27-28 maja 2000 roku w Puławach odbędzie się Konferencja dla lekarzy praktyków zajmujących się chorobami małych zwierząt, z udziałem wykładowców zagranicznych i krajowych, na temat:

### „Choroby zakaźne psów i kotów”

Osoby zainteresowane udziałem w Konferencji proszone są o kontakt telefoniczny lub listowny:

lek. Wet. Artur Rzeżutka  
Zakład Chorób Mięsożernych i Futerkowych  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy  
Tel. 081 886-30-51 w. 209  
e-mail: [arzez@piwet.pulawy.pl](mailto:arzez@piwet.pulawy.pl)