

# Parametry odporności swoistej u indyków szczepionych wirusem NDV po podaniu lewamizolu lub izoprynozyny

ROMAN WÓJCIK, GRAŻYNA ŚWIĘCICKA-GRABOWSKA

Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM,  
ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn

Wójcik R., Święcicka-Grabowska G.

## Specific immunity parameters in turkeys vaccinated with NDV virus after the administration of levamisole and isoprinozine

### Summary

The aim of the research was to evaluate the stimulating effect of levamisole and isoprinozine on some parameters of specific cellular and humoral immunity in turkeys vaccinated with virus antigen. Levamisole was the referred preparation used to compare the effect of isoprinozine.

The research was carried out on 30 turkeys (3 groups, 10 birds in each), which at the age of 29 days were given one of the two immunity stimulators under study: levamisole or isoprinozine. The birds that did not receive any of the stimulators were the control group. After 7 days, and again after 100 days, all the birds received an active mesogenic Roakin strain of ND virus. Cellular immunity in the blastic transformation test and humoral immunity in the reaction of hemagglutination inhibition were determined in the blood collected from the wing vein of the birds.

The obtained results demonstrate that both levamisole and isoprinozine stimulated specific immunity quite well, although with much better humoral immunity than cellular immunity. Following the first administration of the antigen a better effect was noted from the application of isoprinozine, whereas after revaccination in the case of levamisole. In both cases the level of antibodies was higher than in the control group. Isoprinozine had a more significant effect on cellular immunity than levamisole in the course of the entire experiment.

**Keywords:** turkeys, isoprinozine, levamisole, specific immunity parameters.

Prezentowane wyniki są kontynuacją badań poprzednich, w których wykazano pozytywny wpływ izoprynozyny i lewamizolu na odporność nieswoistą u indyków. Efektywna stymulacja odporności komórkowej, a także niektórych wskaźników biochemicznych stanowiła zachętę do oceny oddziaływania tych preparatów (szczególnie nie stosowanej do tej pory u indyków izoprynozyny) na kształtowanie się swoistej odporności humoralnej i komórkowej po podaniu wirusowego bódźca antygenowego.

Jak wiadomo, najważniejszą rolę w zakażeniach różnymi drobnoustrojami, szczególnie zaś w zakażeniach bakteryjnych i wirusowych odgrywa odporność swoista, z tym jednak, że przy tych ostatnich zarazkach, ścisłych pasożytach wewnątrzkomórkowych, odporność humoralna ma znaczenie przede wszystkim we wczesnej fazie zakażenia. Wówczas to głównie białka kapsydu wirusa najwcześniej pobudzają układ immunologiczny do powstawania jako pierwszych przeciwciał IgM, które działają neutralizująco, unieczyniając wirusy, następnie rolę tę przejmują przeciwciała klasy IgG, zaś na śluzówkach sekrecyjne IgA. Przeciwciała krążące (IgM i IgG) zobojętniają wirus wówczas, kiedy znajduje się on we krwi czasowo lub stale, np. w przypadku wiremii. Nie neutralizują one natomiast wirusów, które wniknęły do komórki i znajdują się w jej wnętrzu,

a zwłaszcza przenoszących się bezpośrednio z komórki do komórki.

Na tym etapie zakażenia decydujące znaczenie odgrywa prawidłowo działający mechanizm obronny związany z odpornością komórkową. W tego typu odpowiedzi komórkowej główne znaczenie mają przede wszystkim limfocyty T zarówno produkujące limfokiny, jak i cytotoksyczne, rozpoznające i niszczące zakażone i zmienione przez wirus komórki organizmu.

W hodowlach fermowych indyki znacznie bardziej niż inne zwierzęta podlegają działaniu niekorzystnych czynników środowiskowych, co w efekcie prowadzi do immunosupresji (11, 21), a tym samym do gorszej kondycji zdrowotnej. Regenerację układu odpornościowego umożliwia stosowanie immunostymulatorów (2-6, 22), które u indyków stosowane są bardzo rzadko (23). Ze względu jednak na to, że przy dużej liczebności tych ptaków w stadach każde zagrożenie zdrowotności prowadzi do poważnych strat ekonomicznych, wzrasta zainteresowanie hodowców stymulatorami odporności. Z wielu istniejących na rynku tego typu preparatów należy dokonać wyboru najbardziej pożądanego – nie tylko o dużej skuteczności, lecz także z możliwością stosowania go w dużych stadach w formach minimalizujących zarówno stres ptaków, jak i pracochłonność zabiegu.

Celem przeprowadzonych badań było określenie najbardziej skutecznego stymulatora dla indyków. Ze względu na to, że układ immunologiczny ptaków wykazuje w porównaniu ze ssakami pewne różnice w mechanizmach działania, nawet przy znanych stymulatorach odporności można uzyskać inny efekt ich działania.

### Material i metody

Badania przeprowadzono na indykach obu płci, rasy mięsnej, typu ciężkiego Big 6. Dwudniowe indyczęta odchowano w pomieszczeniach klinicznych sposobem tradycyjnym na ściółce. Ptaki miały stały dostęp do wody oraz paszy przez cały okres doświadczenia. Karmiono je pełnoporcjowymi mieszankami paszowymi – R210, R211, R212, zgodnie z przyjętymi normami.

**Układ doświadczenia.** Badania przeprowadzono na 3 grupach liczących po 10 indyków – łącznie 30 ptaków, którym w 29. dniu życia podano jednorazowo jeden z dwóch badanych stymulatorów odporności. Grupa I (L) otrzymała lewamizol, II (I) – izoprynozynę, natomiast w grupie III (kontrolnej – K) nie podano żadnego ze stymulatorów odporności.

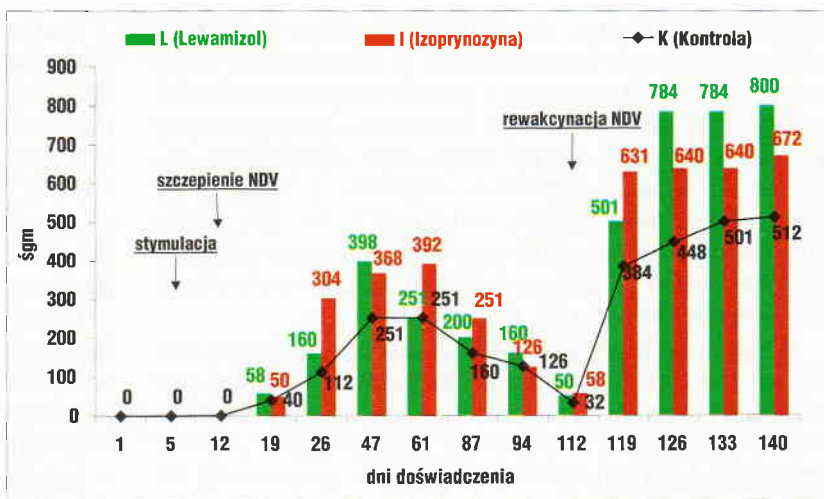
Wszystkim ptakom po 7 dniach od podania stymulatorów odporności zaaplikowano żywy, atenuowany szczep Roakin „R” wirusa choroby Newcastle, a następnie zabieg ten powtórzono w 100. dniu po pierwszym podaniu. W dniu aplikacji wirusa oraz począwszy od 7. aż do 140. dnia p. i. NDV od 5 indyków z każdej grupy z żyły skrzydłowej pobierano krew do badań w celu oznaczenia i porównania kształtowania się wskaźników odporności swoistej.

**Immunostymulatory syntetyczne.** Izoprynozyne – substancja czynna w stężeniu 10%, produkowana przez Grodzkie Zakłady Farmaceutyczne, podawana domięśniowo w dawce 50 mg/kg masy ciała. Lewamizol – preparat handlowy firmy Sigma-Aldrich aplikowany domięśniowo w dawce 0,25 mg/kg masy ciała.

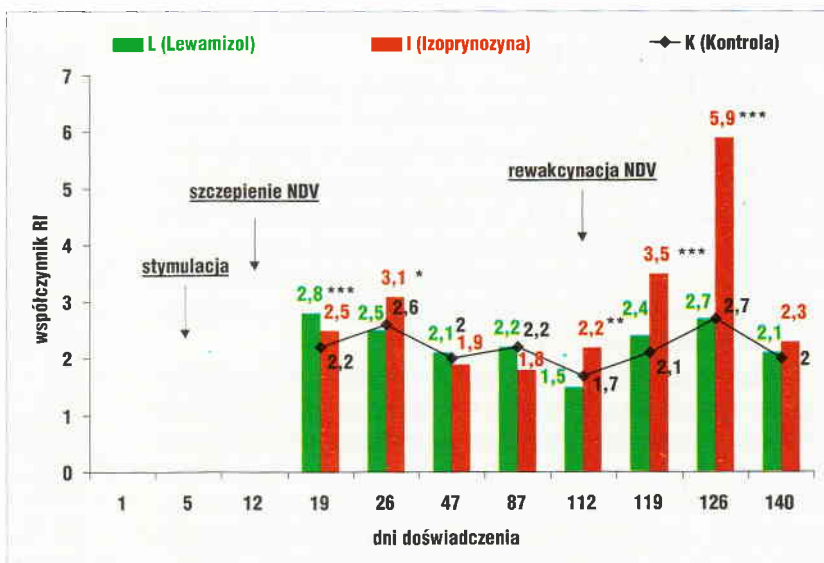
**Wirus rzekomego pomoru drobiu (NDV).** Do badań użyto mezogenicznego szczepu Roakin „R” wirusa rzekomego pomoru drobiu (NDV – Newcastle Diseases Virus). Jego miano zakaźne dla zarodków kurzych wynosiło  $EID_{50} = 10^{9,6}/ml$ , dla hodowli komórek zarodka kurzego  $10^{8,6}/ml$   $TCID_{50}$ . Szczep ten używany był do szczepienia indyków przez domięśniową iniekcję w dawce  $10^{5,6}/ml$   $EID_{50}$ .

**Badania odporności swoistej humoralnej.** Poziom przeciwciał HI oznaczono w odczynie hamowania hemaglutynacji (HI) mikrometodą wg Beacha (1) w stosunku do 4 jednostek hemaglutynacyjnych wirusa ND. Wyniki obliczano metodą Reeda i Muencha (19) i przedstawiono w postaci średnich mian geometrycznych.

**Badanie odporności swoistej komórkowej.** Zdolność do proliferowania limfocytów wobec wirusa ND oznaczono w teście transformacji blastycznej (TB) metodą Gocha i wsp. (7), a wyniki przedstawiono w postaci indeksu reaktywności (RI).



Ryc. 1. Średnie geometryczne mian (śgm) przeciwciał HI dla wirusa ND w surowicy krwi indyków



Ryc. 2. Współczynnik reaktywności RI (Reactivity Index) limfocytów stymulowanych wirusem ND oznaczony w teście transformacji blastycznej u indyków

Objaśnienia: \* statystycznie istotne różnice  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie metodą jednoczynnikowej analizy wariancji (One-way ANOVA) testem Bonferroni z wykorzystaniem programu komputerowego GraphPad Prism.

### Wyniki i omówienie

W badaniach porównano i oceniono efekt stymulacyjnego działania dwóch wybranych syntetycznych immunostymulatorów: lewamizolu i izoprynozyny na wybrane wskaźniki swoistej odporności humoralnej i komórkowej u indyków. Podobnie jak w poprzednich badaniach własnych, również i w tych lewamizol stanowił preparat referencyjny, do którego odnoszono efekt uzyskany przy stosowaniu izoprynozyny.

Trudność stanowiło porównanie uzyskanych wyników własnych z danymi innych autorów, gdyż w dostępnym piśmiennictwie nie natrafiono na prace dotyczące oddziaływania izoprynozyny u indyków w przebiegu naturalnych lub doświadczalnych zakażeń wiruso-

wych. Są natomiast, choć nieliczne, dane dotyczące efektu podawania izoprynozyiny w zakażeniach wirusowych u innych zwierząt, a przede wszystkim u ludzi. Dobry rezultat uzyskano po stosowaniu izoprynozyiny u ludzi w leczeniu grypy, odry, ospy, opryszczki, różyczki, półpaśca, zapalenia wątroby, a także przy stwardniającym zapaleniu mózgu (13, 16, 18). Natomiast w weterynarii skuteczne działanie izoprynozyiny stwierdzono w przebiegu zakażeń wirusowych u bydła, świń oraz kurcząt (3, 6, 10, 17).

W badaniach własnych wykazano, że zarówno izoprynozyina, jak i lewamizol zdecydowanie lepiej stymulowały swoistą odporność humoralną niż komórkową. W przypadku odporności humoralnej u ptaków otrzymujących izoprynozyinę poziom przeciwciał HI kształtował się na wyższym poziomie po pierwszym szczepieniu niż w grupie indyków traktowanej lewamizolem oraz kontrolnej (ryc. 1), zaś po rewakcytacji nieco wyższe miana przeciwciał stwierdzono w grupie ptaków otrzymującej lewamizol.

Wyniki badań własnych stanowią potwierdzenie wcześniejszych spostrzeżeń niektórych autorów, stosujących izoprynozyinę u innych zwierząt, u których również obserwowano zwiększoną syntezę swoistych immunoglobulin (4, 9, 12). W doświadczeniach *in vitro* okazało się, że izoprynozyina ma zdolność stymulowania dojrzewania limfocytów B oraz różnicowania komórek null w komórki immunokompetentne o właściwościach limfocytów B (13).

Badane preparaty, zwłaszcza lewamizol, znacznie słabiej wpływały na odporność komórkową (ryc. 2) niż na swoistą odporność humoralną, co znalazło wyraz w wartościach współczynnika RI określanego w teście transformacji blastycznej limfocytów wobec antygeny wirusowego. Dopiero po rewakcytacji najwyższe wartości współczynnika RI stwierdzono w grupie ptaków otrzymujących izoprynozyinę (2,3-5,9), podczas gdy w grupach stymulowanych lewamizolem (2,1-2,7) odnośne wskaźniki kształtowały się na tych samych poziomach, co w grupie kontrolnej (2-2,7). Ten słaby efekt uzyskany w odniesieniu do odporności komórkowej u ptaków otrzymujących lewamizol jest dość zaskakujący, gdyż, jak podano w systematyce immunofarmakologicznej, lewamizol należy według Haddena (20) do grupy tzw. tymomimetyków klasy I, tj. substancji syntetycznych modulujących dojrzewanie protymocytów oraz funkcje efektorowe dojrzałych limfocytów T, podobnie jak czynią to hormony grasicy.

Na podstawie zaprezentowanych wyników można stwierdzić, że to izoprynozyina, zarówno w przypadku wcześniej badanych parametrów biochemicznych i odporności nieswoistej, jak również ocenianej w tych badaniach odporności swoistej, wykazywała znacznie silniejsze właściwości stymulujące u indyków niż lewamizol, szczególnie w odniesieniu do odporności komórkowej. Efekt skutecznej stymulacji przez izoprynozyinę, obok odporności humoralnej, również odporności komórkowej swoistej i nieswoistej, wydaje się mieć duże znaczenie w obronności organizmu przed zakażeniami drobnoustrojami wewnątrzkomórkowymi (8).

Podkreślić należy fakt, że to pozytywne działanie izoprynozyiny na oba typy odporności swoistej i nieswoistej obserwowano u indyków z prawidłowo działającym układem immunologicznym. Podobne zjawisko stwierdzili również inni autorzy u świń i koni (12, 14, 15). Mechanizm działania izoprynozyiny prowadzący do uzyskania tego efektu nie jest znany, przypuszcza się, że może on być uwarunkowany działaniem adjuwancyjnym preparatu.

Dane te stanowią zachętę do dalszych badań nad celowością stosowania izoprynozyiny w terenie, tym bardziej, że wykazuje ona znacznie niższą toksyczność dla organizmu niż inne tego typu preparaty. Przed wprowadzeniem izoprynozyiny jako stymulatora odporności u indyków na fermach hodowlanych konieczne jest skontrolowanie jego działania u tych ptaków poddanych immunosupresji.

## Piśmiennictwo

1. Beach J. R.: The application of HI test in diagnosis of avian pneumoencephalitis. J. Am. Vet. Med. Ass. 1948, 112, 88.
2. Binderup L.: Effects of isoprinosine in animal models of depressed T-cell function. Int. J. Immunopharmacol. 1985, 7, 93-101.
3. Blecha F., Anderson G. A., Osorio F., Chapes S. K., Baker P. E.: Influence of isoprinosine on bovine herpesvirus type-1 infection in cattle. Vet. Immunol. Immunopath. 1987, 15, 253-265.
4. Brajczewska W., Zabuska K., Sokolnicka L., Lipińska R., Wesołowska M., Roszkowski W.: Immunopotencjalizujące działanie izoprynozyiny w nawracających infekcjach dróg oddechowych z obniżoną odpornością typu komórkowego. Polish J. Immunol. 1992, 17, 175.
5. Brunner C. J., Muscoplat C. C.: Immunomodulatory effects of levamisole. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1980, 176, 1159-1162.
6. Flaming K. P., Blecha F., Fedorka-Cray P. J., Anderson G. A.: Influence of isoprinosine on lymphocyte function in virus-infected feeder pigs. Am. J. Vet. Res. 1989, 50, 1653-1657.
7. Goch J. H., Tchórzewski H., Niedworak J., Tkaczewski W., Ofierska H., Soszyńska W.: Test transformacji blastycznej limfocytów i zahamowania migracji leukocytów w przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia mięśnia sercowego u ludzi. Immunol. Pol. 1981, 6, 239-248.
8. Hadden J. W., Hadden E. M., Coffey R. G.: Isoprinosine augmentation of phytohemagglutinin-induced lymphocyte proliferation. Infect. Immun. 1976, 13, 382-387.
9. Hadden J. W., Lopez C., O'Riilly R. J., Hadden E. M.: Levamisole and inosinplex: antiviral agents with immunopotentiating action. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1977, 284, 139-152.
10. Jordanidis P., Artopiou M., Papadopoulos A., Artopios E.: Effect of isoprinosine on the immunity of broilers vaccinated against Newcastle disease. Hellenic Vet. Med. Sci. 1988, 39, 199-202.
11. Koncicki A., Krasnodębska-Depta A., Zduniuk E., Felska M.: Wpływ warunków środowiskowych i żywienia na zdrowotność i produktywność młodych indyków rzeźnych. Medycyna Wet. 1991, 47, 81-84.
12. Kowalski J.: Wpływ izoprynozyiny na wybrane wskaźniki odporności humoralnej i komórkowej u zwierząt doświadczalnych. Praca dokt. WAM, Łódź 1985.
13. Kowalski J.: Izoprynozyina – lek przeciwwirusowy o właściwościach immunostymulujących. Pol. Tyg. Lek. 1989, 44, 795-797.
14. Krakowski L., Krzyżanowski J., Siwicki A. K., Wrona Z.: Immunostimulation of pregnant sows with isoprinosine or levamisole and parameters of unspecific cellular and humoral immunity in piglets during first weeks of their life. Pol. J. Vet. Sci. 1999, 2, 27-30.
15. Krzyżanowski J., Krakowski L., Siwicki A. K.: Wpływ podawania izoprynozyiny i *Mycobacterium chelonae* na wybrane wskaźniki nieswoistej odporności komórkowej i humoralnej u koni. Medycyna Wet. 1997, 52, 261-269.
16. Minarro A.: Isoprinosine – results obtained in the use of isoprinosine in various viral infections in children. Semana Medica 1973, 12, 143.
17. Mulcahy G., Quinn P. J., Hannan J.: The effect of isoprinosine and levamisole on factors relevant to protection of calves against respiratory disease. J. Vet. Pharmacol. Ther. 1991, 14, 156-169.
18. Polubiec A., Kolakowska-Polubiec K., Stepka K.: Wyniki leczenia izoprynozyiną półpaśca i opryszczki. Pol. Tyg. Lek. 1984, 40, 45-48.
19. Reed L. J., Muench H.: A simple method of estimating fifty per cent and points. Am. J. Hyg. 1938, 27, 493.
20. Renoux G., Renoux M.: Thymus-like activities of sulphur derivatives on T-cell differentiation. J. Exp. Med. 1977, 145, 466-71.
21. Samorek-Salamonowicz E., Kozdrun W., Czekaj H.: Wpływ czynników środowiskowych na system immunologiczny u ptaków. Wyd. IRS – Biologiczne monitorowanie skażenia środowiska. 1996, 149-157.
22. Świącicka-Grabowska G., Rotkiewicz Z., Wójcik R., Wiśniewski J.: Stymulacja swoistej i nieswoistej odporności przeciwzakaźnej kurcząt poddanych unieruchomieniu. Mat. II Kraj. Symp. Immunologów Wet., Swinoujście, 1997, s. 196.
23. Wójcik R., Świącicka-Grabowska G.: A comparison of the level of immunity antiviral parameters in turkeys stimulated with levamisole and KLP-602. Pol. J. Vet. Sci. 2001, 4, 182.

Adres autora: dr Roman Wójcik, ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn; e-mail: brandy@moskit.uwm.edu.pl