Wpływ łącznego zastosowania szczepienia przeciwko FHV-1 i FCV oraz immunostymulatora Zylexis na wybrane parametry odpowiedzi immunologicznej kotów

OLIWIER TEODOROWSKI, BARBARA MAJER-DZIEDZIC*, MARCIN KALINOWSKI**, STANISŁAW WINIARCZYK**, ŁUKASZ ADASZEK**

Klinika Weterynaryjna „Teodorowsky”, ul. Żwirki i Wigury 5, 43-190 Mikołów

*Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin

**Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Otrzymano 01.04.2020

Zaakceptowano 27.05.2020

Teodorowski O., Majer-Dziedzic B., Kalinowski M., Winiarczyk S., Adaszek Ł.
Effect of combined application of Zylexis and a vaccine against FHV-1 and FCV on selected immune response parameters in cats

Summary

The aim of the study was to evaluate the immune response in cats after the administration of Zylexis (group A), a vaccine against FHV-1 and FCV infections (group B), and a combination of the vaccine and Zylexis (group D). The evaluated parameters included the total number of leukocytes and lymphocytes in peripheral blood, the number of CD4 and CD8 lymphocytes, the ratio of CD4 to CD8 (CD4/CD8) and the concentration of anti-FCV and anti-FHV-1 antibodies in the serum of the subjects, as well as the bacteriolytic activity of lysozyme and the haptoglobin level. Significantly higher values of almost all these parameters were recorded in cats receiving a combination of the immunostimulator and the vaccine during the whole study period compared to cats receiving only the immunostimulator or only the vaccine. Additionally, the increase in immunological parameters in animals from this group was positively correlated with the concentration of anti-FHV-1 and anti-FCV antibodies. This may indicate a stimulated humoral as well as cellular response. Neither Zylexis nor the vaccine alone induced as strong an immune response as the combined administration of the vaccine with the immunostimulator. This indicates that it may be advisable to combine vaccines against FHV-1 and FCV with immunostimulators to increase immunity against FHV-1 and FCV. Further studies of the influence of combined administration of vaccines and different immunomodulating preparations on the parameters of specific and non-specific immune responses in cats are necessary.

Keywords: cats, FCV, FHV-1, immune response, vaccines

Zakażenie górnych dróg oddechowych u kotów (FURTD – feline upper respiratory tract disease), określane często jako zespół oddechowy lub katar kotów, należy do jednych z najczęściej występujących chorób tego gatunku. Schorzenie to występuje powszechnie na całym świecie, powodując zachorowania zarówno kociąt, jak i dorosłych osobników. W etiologii tego schorzenia najważniejsze znaczenie odgrywają: herpeswirus kotów typu 1 (FHV-1) i kaliciwirus kotów (FCV) (3), które w warunkach naturalnych spotykane są najczęściej (1, 3, 4). Katar koci przebiega z zapaleniem spojówek, błony śluzowej nosa, tchawicy, płuc

oraz tworzeniem się pęcherzyków i owrzodzeń na błonie śluzowej jamy ustnej (15). FHV-1 należący do rodziny *Herpesviridae* jest wirusem DNA i należy do jednego serotypu (12). Chociaż szczepy FHV-1 różnią się zjadliwością, to obraz kliniczny zakażenia u kotów jest z reguły podobny. Po zakażeniu wirus stymuluje odpowiedź humoralną utrzymującą się przez około 5 miesięcy. U części kotów po przechorowaniu nie stwierdza się w surowicy przeciwciał neutralizujących wirus, jednak w takich przypadkach główną rolę odgrywa odporność komórkowa i odporność miejscowa błon śluzowych (21). Drugi z wirusów, FCV, jest

wirusem RNA i charakteryzuje się dużą zmiennością antygenową. Zakażenia na tle FCV mogą przebiegać pod różnymi postaciami, od bezobjawowej przez łagodną do ciężkiej (4, 22). Ponieważ oba wirusy występują powszechnie w populacji kotów, jednym z najskuteczniejszych sposobów zapobiegania potencjalnym zakażeniom jest szczepienie (1, 26, 27). W profilaktyce zakażeń FHV-1 i FCV stosowane są przeważnie szczepionki wieloważne, które chronią przed kliniczną postacią choroby, jednak nie chronią przed zakażeniem i nosicielstwem wirusów, a w przypadku FHV-1 również przed stanem latencji. Ponadto FHV-1 i FCV charakteryzują się niską immunogennością, co stwarza konieczność powtarzania szczepień (21, 27). Ograniczenia aktualnie stosowanych szczepionek uzasadniają potrzebę podejmowania kolejnych badań nad opracowaniem nowych i skutecznych biopreparatów lub nowych rozwiązań w zakresie programów profilaktycznych chorób zakaźnych kotów. Jedną z metod stosowanych w leczeniu i profilaktyce chorób zakaźnych kotów przebiegających z immunosupresją jest nieswoiste pobudzanie odpowiedzi immunologicznej za pomocą preparatów immunostymulujących, jak Zylexis (Pfizer, Polska).

Celem badań była ocena stopnia nasilenia, czasu trwania oraz mechanizmów odpowiedzi immunologicznej kotów po zastosowaniu szczepień przeciwko FHV-1 i FCV, immunostymulatora Zylexis oraz szczepień połączonych z podaniem preparatu Zylexis.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 28 kotach w wieku od 1 do 2 lat, samcach, rasy europejskiej, podzielonych na 4 grupy oznaczone jako A, B, C i D, z których każda liczyła po 7 osobników. Kotom w grupie A podany został preparat Zylexis (Pfizer, Polska) jako immunostymulator w dawce 1 ml na zwierzę w jednorazowej iniekcji podskórnej, mimo wskazań producenta do 2- lub 3-krotnego podania preparatu w przypadku przewidywanej ekspozycji na zakażenie w okresie najbliższych 7-14 dni. Preparat zawiera szczep D1701 *Parapoxvirusovis*, który stymuluje monocyty i komórki dendrytyczne do produkcji cytokin prozapalnych, jak interferon (IFN), TNF- α , interleukiny oraz powoduje aktywację komórek N i NK (2, 13, 30). W grupie B podana została szczepionka (Nobivac Tricat Trio, Intervet, Polska) zawierająca żywy, atenuowany szczep F9 FCV, żywy, atenuowany szczep G2620A FHV-1 oraz żywy, atenuowany szczep MW-1 wirusa panleukopenii (FPLV) w jednorazowej dawce 1 ml w iniekcji podskórnej. W grupie D podana została jednokrotnie szczepionka wraz z immunostymulatorem. Koty w grupie C stanowiły grupę kontrolną. Wszystkie osobniki w grupie A, B i D otrzymały wymienione preparaty tego samego dnia. Przez cały okres badań koty utrzymywane były w warunkach domowych i żywione jednakową karmą komercyjną. Zwierzęta były regularnie odrobaczane co 3 miesiące, jednak nigdy nie stosowano żadnych szczepionek oraz preparatów immunomodulujących. Zgodnie z informacjami uzyskanymi z wywiadu lekarsko-weterynaryjnego, koty nigdy wcześniej nie chorowały.

W trakcie badań pobierano krew do badań kolejno w dniu podania preparatów, następnie po 14 dniach, 1 miesiącu, 2 miesiącach, 6 miesiącach i 12 miesiącach od podania preparatów. Celem oceny wybranych parametrów określających stan odporności humoralnej i komórkowej badanych kotów w zależności od grupy doświadczalnej, zastosowano badania hematologiczne, serologiczne, metodę cytometrii przepływowej oraz określenie aktywności bakteriologicznej typu lizozymu i poziomu haptoglobiny w surowicy krwi.

Materiał od zwierząt (krew) pobierano w toku rutynowego postępowania lekarsko-weterynaryjnego i za zgodą ich właścicieli, celem określenia skuteczności zastosowanej szczepionki i preparatu immunomodulującego Zylexis. Kolejne wizyty kontrolne miały na celu określenie statusu immunologicznego kotów po zastosowaniu tych preparatów.

Badanie hematologiczne. Pełną krew pobierano do probówek z EDTA (Medlab Products, Polska) i analizowano w analizatorze Exigo (BouleMedical AB, Szwecja). Analiza obejmowała ogólną liczbę białych krwinek (WBC) oraz limfocytów we krwi obwodowej.

Cytometria przepływowa. Badania przeprowadzono za pomocą cytometru przepływowego BD FACScan (BD Biosciences, USA) z oprogramowaniem BD WinMDI 2.9 z użyciem kocich przeciwciał monoklonalnych (Feline CD4 i CD8 marker antibodies – CytofixCytoperm CO, BD Biosciences, USA), stosując jednostopniowe znakowanie komórek, zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Z uzyskanych wyników obliczano liczbę oraz stosunek liczbowy i procentowy limfocytów CD4 do CD8.

Badanie serologiczne. Poziom przeciwciał dla FCV i FHV-1 oznaczano ilościową metodą ELISA za pomocą zestawów FCV-Elisa Kit i FHV-Elisa Kit (Demeditec Diagnostics GmbH, Niemcy) wg zaleceń producenta.

Aktywność bakteriologiczna typu lizozymu w surowicy krwi. Aktywność bakteriologiczną typu lizozymu oznaczono płytkową metodą mikrobiologiczną. Oceniano wielkość strefy przejaśnienia wokół basenika wypełnionego surowicą w żelu agarozowym zawierającym *Micrococcus luteus* i 300 μ g siarczanu oksytetracykliny. Wynik odczytywano po 24 godz. inkubacji płytek wypełnionych surowicą w temp. 18-24°C. Stężenie lizozymu w badanej próbce obliczono z krzywej kalibracyjnej (analiza regresji, model eksponowany $y = \exp(a + gX)$) i wyrażono w mg/ml surowicy w przeliczeniu na aktywność lizozymu białka jaja kurzego (EC.3.2.1.17). Wszystkie oznaczenia powtórzono trzykrotnie, podając w wynikach wartości średnie oraz odchylenie standardowe.

Poziom haptoglobiny w surowicy krwi. Poziom haptoglobiny (Hp) w surowicy krwi kotów oznaczono metodą ELISA, stosując zestaw ELISA Kit, reactivity Cat (Feline) ABIN 956173 (Life Diagnostics, USA) wg procedury podanej przez producenta. Wielkość badanej próbki surowicy wynosiła 5 μ l. Zestaw umożliwia wykrycie haptoglobiny w stężeniu od 0 do 2000 ng/ml surowicy kota. Wszystkie oznaczenia powtórzono trzykrotnie, podając w wynikach średnią z trzech oznaczeń.

Analiza statystyczna. Uzyskane wyniki badań poddawano analizie statystycznej w programie Statistica 10.0 (StatSoft, Polska). W analizie uwzględniono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe oraz istotność różnic

poniędzy wynikami uzyskanymi w badanych grupach zwierząt. Istotność różnic obliczono za pomocą testu rang Manna-Whitneya-Wilcoxa. Korelacje między badanymi parametrami obliczono metodą Spearmana. Za statystycznie istotne przyjmowano wartości przy prawdopodobieństwie $p < 0,05$.

Wyniki i omówienie

Ogólna liczba leukocytów i limfocytów we krwi obwodowej. W grupie kontrolnej (C) średni poziom leukocytów we krwi obwodowej w poszczególnych okresach badania nie różnił się statystycznie istotnie. Zarówno po podaniu preparatu Zylexis (grupa A), jak i szczepionki (grupa B) nastąpił przejściowy, statystycznie istotny wzrost liczby leukocytów, odpowiednio, pomiędzy 14. dniem a 2. miesiącem w przypadku Zylexis oraz między 14. dniem a pierwszym miesiącem w przypadku szczepienia. W grupie B liczba leukocytów w 14. dniu była statystycznie istotnie wyższa ($p = 0,004$) w odniesieniu do 12. miesiąca od podania szczepionki. Ten wzrost był dodatnio skorelowany ze stężeniem przeciwciał anty-FCV ($r = 0,340195$). Ponadto szczepienie (grupa B) powodowało statystycznie istotny wzrost ($p = 0,003$) liczby leukocytów w pozostałych okresach badania w porównaniu do grupy kontrolnej (grupa C). Szczepienie łącznie z podaniem immunostymulatora (grupa D) powodowało istotny statystycznie wzrost liczby leukocytów jedynie 14. dnia od podania, a następnie istotny spadek w dalszych okresach badania ($p = 0,002$). Liczba leukocytów u kotów szczepionych (grupa B) była statystycznie istotnie wyższa ($p = 0,002$) w okresie od pierwszego miesiąca do 12. miesiąca badania w porównaniu do kotów, które

otrzymały szczepionkę wraz z immunostymulatorem (grupa D). Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 1.

W przypadku liczby limfocytów we krwi obwodowej po podaniu immunostymulatora (grupa A) dochodziło do statystycznie istotnego wzrostu ($p = 0,001$) w okresie od 14. dnia do końca badania w porównaniu do wartości wyjściowej. Dodatkowo liczba limfocytów w 14. dniu i pierwszym miesiącu była statystycznie istotnie wyższa ($p = 0,001$) w porównaniu do kolejnych okresów badania. Najwyższą liczbę limfocytów zarówno w grupie A, jak i B, wykazano 14. dnia i w pierwszym miesiącu, przy czym immunostymulator (grupa A) powodował dłuższy trwający i statystycznie istotny wzrost ($p = 0,002$) w okresach od 2. miesiąca do końca badania w porównaniu do szczepionki (grupa B) i grupy kontrolnej (C). Szczepienie łącznie z immunostymulatorem (grupa D) spowodowało statystycznie istotny spadek ($p = 0,001$) liczby limfocytów 14. dnia i w 6. miesiącu od podania w odniesieniu do pozostałych okresów w tej grupie i od 14. dnia do końca badania w odniesieniu do grupy A. Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 2.

Liczba limfocytów CD4 i CD8. Immunostymulator (grupa A), po przejściowym spadku w 14. dniu, powodował zwiększenie liczby limfocytów CD4 w okresie od 1. miesiąca do końca badania. Immunostymulator podany łącznie ze szczepionką (grupa D) również powodował zwiększenie liczby ale już od 14. dnia i wzrost ten był statystycznie istotny ($p = 0,001$). Szczepienie (grupa B) powodowało tylko nieznaczny i statystycznie nieistotny wzrost liczby limfocytów CD4, za wyjątkiem 14. dnia i 6. miesiąca od podania. W 14. dniu nastąpił statystycznie istotny spadek do wartości $1,61 \pm 0,58 \times 10^3/\mu\text{l}$, a w

Tab. 1. Poziom leukocytów we krwi obwodowej kotów (średnia wartość $\pm$ SD, $\times 10^3/\mu\text{l}$) po podaniu preparatu Zylexis (A), szczepieniu (B), kontrola (C), szczepieniu łącznie z podaniem preparatu Zylexis (D)

Grupa	Okres badania					
	1	2	3	4	5	6
A	12,16 $\pm$ 0,88	13,54 $\pm$ 0,51	15,68 $\pm$ 0,41	13,64 $\pm$ 0,98	11,78 $\pm$ 0,63	11,91 $\pm$ 0,72
B	11,45 $\pm$ 1,27	16,15 $\pm$ 0,78	13,34 $\pm$ 1,16	11,74 $\pm$ 1,15	12,14 $\pm$ 0,49	11,19 $\pm$ 0,67
C	10,96 $\pm$ 0,29	11,65 $\pm$ 0,91	11,08 $\pm$ 0,76	11,10 $\pm$ 0,96	10,95 $\pm$ 0,65	10,99 $\pm$ 0,40
D	11,15 $\pm$ 0,76	17,11 $\pm$ 0,89	10,44 $\pm$ 0,45	9,37 $\pm$ 0,58	9,51 $\pm$ 0,44	9,81 $\pm$ 0,66

Objaśnienia: okres badania: 1 – dzień pierwszy, 2 – 14. dzień, 3 – 1. miesiąc, 4 – 2. miesiąc, 5 – 6. miesiąc, 6 – 12. miesiąc

Tab. 2. Poziom limfocytów we krwi obwodowej kotów (średnia wartość $\pm$ SD, $\times 10^3/\mu\text{l}$) po podaniu preparatu Zylexis (A), szczepieniu (B), kontrola (C), szczepieniu łącznie z podaniem preparatu Zylexis (D)

Grupa	Okres badania					
	1	2	3	4	5	6
A	4,84 $\pm$ 0,56	9,17 $\pm$ 0,37	9,43 $\pm$ 0,72	6,24 $\pm$ 0,39	6,50 $\pm$ 0,88	5,99 $\pm$ 0,25
B	4,70 $\pm$ 0,36	9,77 $\pm$ 0,43	8,74 $\pm$ 0,68	4,76 $\pm$ 0,31	4,47 $\pm$ 0,15	4,50 $\pm$ 0,34
C	4,81 $\pm$ 0,54	4,17 $\pm$ 0,21	4,27 $\pm$ 0,36	4,50 $\pm$ 0,36	4,44 $\pm$ 0,21	4,34 $\pm$ 0,31
D	4,23 $\pm$ 0,31	3,33 $\pm$ 0,36	4,39 $\pm$ 0,31	4,29 $\pm$ 0,26	3,87 $\pm$ 0,17	4,30 $\pm$ 0,28

Objaśnienia: jak w tab. 1.

w 6. miesiącu istotny wzrost wynoszący $3,98 \pm 0,14 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($p = 0,001$). Ponadto liczba limfocytów CD4 w grupie A była statystycznie istotnie wyższa ($p = 0,001$) w porównaniu do grupy B w okresie od 1. do 12. miesiąca oraz do grupy kontrolnej C w okresie od 14. dnia do końca badania. Z kolei w grupie D liczba limfocytów CD4 wzrosła zarówno w odniesieniu do grupy kontrolnej (grupa C), jak i grupy kotów szczepionych (grupa B). W porównaniu do grupy A nastąpiła podobna tendencja wzrostowa liczby limfocytów CD4, z tym, że wartości statystycznie istotnie wyższe uzyskano w 14. dniu, 2. i 6. miesiącu od podania (ryc. 1).

Zarówno immunostymulator (grupa A), jak i immunostymulator podany łącznie ze szczepionką (grupa D) wywołały statystycznie istotny wzrost liczby limfocytów CD8 od 14. dnia do 12. miesiąca, jednak liczba ta miała tendencję spadkową pod koniec okresu badania. Zwiększenie liczby limfocytów CD8 w grupie A było dodatnio skorelowane ze wzrostem ogólnej liczby limfocytów ($r = 0,405706$) i leukocytów ($r = 0,423203$). Zastosowanie szczepionki (grupa B) powodowało tylko nieznaczny wzrost liczby limfocytów CD8 w porównaniu do grupy A i D. W każdym okresie badań, począwszy od 14. dnia, immunostymulator podany łącznie ze szczepionką (grupa D) powodował statystycznie istotny wzrost liczby limfocytów CD8 ($p = 0,001$) w porównaniu do efektu uzyskanego po podaniu samego immunostymulatora (grupa A) i samej szczepionki (grupa B). Liczba limfocytów CD8 w grupie D była dodatnio skorelowana ze stężeniem przeciwciał anti-FCV ($r = 0,718067$) i anti-FHV-1 ($r = 0,576038$). Wyniki przedstawiono na ryc. 2.

Stosunek liczbowy i procentowy limfocytów CD4 do CD8 (CD4/CD8). Zarówno immunostymulator (grupa A), szczepionka (grupa B), jak i immunostymulator podany łącznie ze szczepionką (grupa D) powodowały statystycznie istotny spadek stosunku liczbowego CD4/CD8 we wszystkich okresach badania w odniesieniu do dnia podania w poszczególnych grupach, za wyjątkiem 14. dnia w przypadku szczepionki (grupa B). W grupie B najniższy stosunek liczbowy CD4/CD8 wynosił 1,42 w 14. dniu, a spadek ten był ujemnie skorelowany ze wzrostem liczby limfocytów CD8 ($r = -0,677224$). W grupie D najniższa wartość wyniosła 1,13 w 6. miesiącu badania i była ujemnie skorelowana z poziomem haptoglobiny ($r = -0,721378$), stężeniem przeciwciał anti-FCV ($r = -0,736414$) oraz anti-FHC-1 ($r = -0,601740$). Immunostymulator (grupa A) powodował statystycznie istotny spadek stosunku liczbowego CD4/CD8 ($p = 0,001$) w odniesieniu do grupy kontrolnej (grupa C) w okresie od 14. dnia do 12. miesiąca badania. W przypadku szczepionki (grupa B) statystycznie istotny spadek ($p = 0,003$) w porównaniu do grupy kontrolnej (grupa C) nastąpił w 14. dniu oraz w okresie od 2. do 12. miesiąca. Najniższe wartości w porównaniu do grupy kontrolnej (grupa C) uzyskano po podaniu szczepionki łącznie z immunostymulatorem (grupa D), w której stosunek liczbowy limfocytów CD4/CD8 obniżył się statystycznie istotnie ($p = 0,002$) w okresie od 14. dnia do 12. miesiąca. Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 3.

Pod wpływem immunostymulatora (grupa A) stosunek procentowy limfocytów CD4 do CD8 nie ulegał statystycznie istotnym zmianom. Szczepienie (grupa B), po przejściowym obniżeniu 14. dnia obserwacji, powodowało nieznaczny, ale statystycznie istotny wzrost stosunku procentowego limfocytów CD4/CD8 ($p = 0,001$) w 6. i 12. miesiącu badania. Natomiast

Ryc. 1. Poziom limfocytów CD4 (średnia wartość $\times 10^3/\mu\text{l}$) u kotów po podaniu preparatu Zylexis (A), szczepieniu (B), kontroli (C), szczepieniu łącznie z podaniem preparatu Zylexis (D)

Objaśnienia: okres badania: 1 – dzień pierwszy, 2 – 14. dzień, 3 – 1. miesiąc, 4 – 2. miesiąc, 5 – 6. miesiąc, 6 – 12. miesiąc

Ryc. 2. Poziom limfocytów CD8 (średnia wartość $\times 10^3/\mu\text{l}$) po podaniu preparatu Zylexis (A), szczepieniu (B), kontroli (C), szczepieniu łącznie z podaniem preparatu Zylexis (D)

Objaśnienia: jak na ryc. 1.

Tab. 3. Stosunek liczbowy limfocytów CD4/CD8 w krwi obwodowej kotów po podaniu preparatu Zylexis (A), szczepieniu (B), kontroli (C), szczepieniu łącznie z podaniem preparatu Zylexis (D)

Grupa	Okres badania					
	1	2	3	4	5	6
A	2,36	1,09	1,74	1,61	1,68	1,20
B	2,66	1,42	2,25	1,75	1,78	1,76
C	2,38	2,43	2,38	2,54	2,88	2,89
D	2,65	1,29	1,23	1,14	1,13	1,97

Objaśnienia: jak w tab. 1.

po podaniu immunostymulatora wraz ze szczepionką (grupa D) nastąpił stały, statystycznie istotny wzrost stosunku procentowego limfocytów CD4/CD8 w każdym okresie badania w odniesieniu do dnia podania preparatów. Wzrost ten był dodatnio skorelowany ze wzrostem liczby limfocytów CD8 ($r = 0,715735$), stężeniem przeciwciał anti-FCV ($r = 0,729499$) i anti-FHV-1 ($r = 0,614312$). Dodatkowo immunostymulator (grupa A) powodował statystycznie istotny wzrost sto-

sunku procentowego limfocytów CD4/CD8 ($p = 0,002$) 14. dnia i 2. miesiąca badania w porównaniu do grupy kontrolnej (grupa C) oraz grupy kotów szczepionych (grupa B). Szczepienie łącznie z immunostymulatorem (grupa D) spowodowało statystycznie istotny wzrost we wszystkich badanych okresach w porównaniu do grupy kontrolnej (grupa C) oraz do analogicznych okresów w pozostałych badanych grupach (grupa A i B). Uzyskane wyniki przedstawiono na ryc. 3.

Stężenie przeciwciał anti-FCV i anti-FHV-1 w surowicy. Absorbancja surowicy kotów, u których zastosowano Zylexis (grupa A), wykazywała niewielkie odchylenia i wahała się w granicy od $0,225 \pm 0,06$ do $0,299 \pm 0,01$. Stężenie przeciwciał anti-FCV było skorelowane dodatnio ze stężeniem przeciwciał anti-FHV-1 ($r = 0,969111$) (ryc. 4).

Również w grupie kontrolnej (grupa C) absorbancja była na zbliżonym poziomie i wahała się w granicach od $0,281 \pm 0,008$ do $0,299 \pm 0,009$ w pierwszym i drugim miesiącu doświadczenia dla przeciwciał FCV i FHV-1. Szczepienie zwiększyło absorbancję począwszy od 14. dnia ($0,521 \pm 0,023$) do 2. miesiąca ($0,985 \pm 0,012$) w stosunku do początkowej $0,268 \pm 0,02$ i wzrost ten był statystycznie istotny ($p = 0,001$) (ryc. 3). Najwyższy wzrost absorbancji dla FCV wystąpił od 14. dnia do 6. miesiąca w surowicach kotów szczepionych i otrzymujących Zylexis (grupa D). Wahał się on od $1,205 \pm 0,05$ w 14. dniu, osiągając najwyższy poziom w 2. miesiącu wynoszący $1,73574 \pm 0,04$ do $0,562 \pm 0,02$ w 6. miesiącu doświadczenia. Wzrost absorbancji w grupie D w porównaniu do grupy B był w tych okresach statystycznie istotny ($p = 0,001$). Wzrost stężenia przeciwciał anti-FCV w tej grupie był dodatnio skorelowany z wzrostem przeciwciał anti-FHV-1 ($r = 0,831660$).

W przypadku FHV-1, zarówno szczepienie (grupa B), jak i szczepienie łącznie z zastosowaniem preparatu bodźcowego (grupa D) zwiększyło absorbancję i wzrost ten był statystycznie istotny w okresie od 14. dnia do 2. miesiąca w grupie B i 6. miesiąca w grupie D (wykres 10). Jednocześnie wzrost absorbancji był większy w grupie D w porównaniu do grupy B. W grupie B najwyższe wartości notowano w pierwszym miesiącu ($2,058 \pm 0,014$) i w drugim miesiącu ($1,941 \pm 0,06$), zaś w grupie D w 14. dniu ($2,694 \pm 0,06$), w pierwszym miesiącu ($3,863 \pm 0,05$) oraz w 2. ($2,401 \pm 0,09$) i 6. miesiącu ($2,499 \pm 0,07$). Wyniki te były statystycznie istotnie wyższe ($p = 0,001$) w odniesieniu do grupy A i C (kontrola) (ryc. 5).

Aktywność bakteriolityczna lizozymu. W grupie A aktywność lizozymu była najwyższa 14. dnia i 1. miesiąca od podania immunostymulatora i wzrost ten był statystycznie istotny ($p = 0,002$) w porównaniu do kolejnych okresów badania. W grupie B po podaniu szczepionki statystycznie istotny wzrost aktywności lizozymu wykazano również od 14. dnia, jednak aktywność ta była wyższa i utrzymywała się dłużej, do

Ryc. 3. Stosunek procentowy limfocytów CD4/CD8 po podaniu preparatu Zylexis (A), szczepieniu (B), kontroli (C), szczepieniu łącznie z podaniem preparatu Zylexis (D)
Objaśnienia: jak na ryc. 1.

Ryc. 4. Absorbancja (OD 420 nm) surowic kotów w kierunku przeciwciał dla FCV po podaniu preparatu Zylexis (A), szczepieniu (B), kontroli (C), szczepieniu łącznie z podaniem preparatu Zylexis (D)
Objaśnienia: jak na ryc. 1.

Ryc. 5. Absorbancja (OD 420 nm) surowic w kierunku przeciwciał dla FHV-1 po podaniu preparatu Zylexis (A), szczepieniu (B), kontroli (C), szczepieniu łącznie z podaniem preparatu Zylexis (D)
Objaśnienia: jak na ryc. 1.

2. miesiąca od szczepienia. Po tym okresie aktywność stopniowo ulegała obniżeniu do wartości zbliżonych, jak po podaniu immunostymulatora. W grupie D aktywność lizozymu znacznie wzrosła i była statystycznie istotnie wyższa ($p = 0,002$) od 14. dnia do 12. miesiąca od jednoczesnego podania szczepionki

wraz z immunostymulatorem. Jednocześnie wszystkie uzyskane wyniki w grupie D, począwszy od 14. dnia, były statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do analogicznych wyników w pozostałych grupach (A, B i C). Uzyskane wyniki przedstawiono na ryc. 6.

Poziom haptoglobiny. Zarówno w grupie A i B poziom haptoglobiny wzrósł w 14. dniu i osiągnął najwyższą wartość miesiąc po podaniu preparatów, przy czym wyższy wzrost uzyskano po podaniu immunostymulatora (grupa A). Uzyskane wyniki były statystycznie istotnie wyższe ($p = 0,001$) w porównaniu do poziomu haptoglobiny w kolejnych okresach w poszczególnych grupach. Ponadto poziom haptoglobiny w grupie A w 14. dniu i 1. miesiącu badania był statystycznie istotnie wyższy w stosunku do tych okresów w grupie B. W grupie D nastąpił znaczny wzrost poziomu haptoglobiny od 14. dnia do końca okresu badania i wartości te były statystycznie istotnie wyższe ($p = 0,002$) w tej grupie, jak i w stosunku do analogicznych okresów badania w grupie A, B i C. W stosunku do grupy kontrolnej C, począwszy od 14. dnia, poziom haptoglobiny był statystycznie istotnie wyższy w pozostałych badanych grupach. Uzyskane wyniki przedstawiono na ryc. 7.

Herpeswirus typu 1 (FHV-1) i kaliciwirus (FCV) należą do ważnych zakaźnych przyczyn chorób układu oddechowego u kotów (14, 15). W profilaktyce zakażeń przez nie wywołanych powszechnie wykorzystuje się szczepienia preparatami poliwalentnymi (27). Na rynku występują szczepionki żywe atenuowane oraz inaktywowane, które zapobiegają zachorowaniom, łagodzą objawy kliniczne oraz skracają czas siewstwa wirusów, jednak nie chronią przed zakażeniem i nosicielstwem oraz latencją w przypadku FHV-1 (9-11, 16, 20). Z reguły odporność poszczepienna pojawia się po 1-3 tygodniach po drugim szczepieniu i wymaga rewakcytacji po roku (9). Działanie ochronne trwa najczęściej do 3 lat, jednak nie zawsze jest ono zadowalające i w krótkim okresie po szczepieniu może ulegać obniżeniu (16).

Od wielu lat w leczeniu i zapobieganiu zakażeń wirusowych u zwierząt coraz większe znaczenie zyskują leki immunomodulujące (30). Zastosowany w badaniach własnych preparat Zylexis zawierający w swoim składzie *Parapoxvirus* owiec jest immunostymulatorem wpływającym na nieswoiste oraz swoiste mechanizmy odpowiedzi immunologicznej (2). Większość światowych badań koncentruje się na stosowaniu preparatu u zwierząt towarzyszących, gospodarskich i koni w zapobieganiu i leczeniu chorób zakaźnych oraz zaburzeniach odporności powodowanych przez czynniki stresogenne (7, 24, 30). Skuteczność działania stymulującego oceniano głównie na podstawie oceny obrazu klinicznego dotyczącego zmniejszenia odsetka zachorowań lub złagodzenia przebiegu choroby. Janeczek i wsp. (8) oceniali u kotów skuteczność preparatu na podstawie złagodzenia zmian zapalnych

Ryc. 6. Kształtowanie się średniej aktywności bakteriolitycznej lizozymu ($\mu\text{g/ml}$) w surowicy kotów po podaniu preparatu Zylexis (A), szczepieniu (B), kontroli (C), szczepieniu łącznie z podaniem preparatu Zylexis (D)

Objaśnienia: jak na ryc. 1.

Ryc. 7. Kształtowanie się średniego poziomu haptoglobiny (mg/ml) w surowicy kotów po podaniu preparatu Zylexis (A), szczepieniu (B), kontroli (C), szczepieniu łącznie z podaniem preparatu Zylexis (D)

Objaśnienia: jak na ryc. 1.

błony śluzowej jamy ustnej. Nieliczne badania, głównie u psów i koni, dotyczą mechanizmów działania i wpływu immunostymulatora na odpowiedź typu humoralnego i komórkowego (7, 23, 24, 29), natomiast brakuje doniesień związanych z zakażeniami górnych dróg oddechowych u kotów). Zylexis indukuje produkcję cytokin, zwłaszcza interferonu (IFN), a pobudzenie układu odpornościowego utrzymuje się do 14 dni (18). Wpływa również na produkcję przez monocyty i plazmocytoidalne komórki dendrytyczne wczesnych cytokin prozapalnych, jak $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 oraz powoduje aktywację komórek K i NK (13). Badania własne wykazały, że jednokrotne podanie preparatu powodowało statystycznie istotny wzrost ogólnej liczby leukocytów w okresie do 1 miesiąca natomiast limfocytów oraz limfocytów CD4 i CD8 przez cały okres badania. Preparat indukował także istotny wzrost aktywności lizozymu i poziomu haptoglobiny w okresie do 1 miesiąca po podaniu preparatu. Podobne wyniki uzyskali Traeder i wsp. (28), którzy badali wpływ preparatu u 11-12-tygodniowych kociąt eksperymentalnie zakażonych kaliciwirusem

(FCV). Po tygodniu okazało się, że trzykrotne podanie preparatu co drugi dzień spowodowało zmniejszenie nasilenia objawów klinicznych oraz zwiększenie proliferacji limfocytów do 44,67% w odniesieniu do ogólnej liczby leukocytów. W późniejszym okresie doświadczenia odsetek limfocytów zmalał, ale był ciągle wysoki i wynosił 32% w stosunku do grupy kontrolnej, w której wystąpiła wyraźna leukopenia i limfopenia. Podobnych wniosków w odniesieniu do ogólnej liczby limfocytów oraz limfocytów CD4 i CD8 dostarczają raporty z badań przeprowadzonych na psach i koniach (17, 23, 24, 29). Z drugiej strony, niektóre badania potwierdzają pobudzenie układu odpornościowego utrzymujące się jedynie do 14 dni (18). Niestety, w badaniach własnych nie wykazano pozytywnego efektu podawania Zylexisu na wzrost miana przeciwciał anti-FCV i anti-FHV-1, które były na poziomie grupy kontrolnej. Wynik ten może być jednak związany z faktem jednokrotnego podania preparatu, w związku z czym wskazane jest przeprowadzenie dalszych badań związanych z kilkukrotnym podaniem immunostymulatora.

W badaniach własnych wykazano, że skuteczniejszą metodą pobudzenia odpowiedzi związanej z produkcją przeciwciał anti-FHV-1 i anti-FCV jest zastosowanie szczepienia. Szczepienia indukowały ponadto lepszy efekt w odniesieniu do aktywności lizozymu, zwłaszcza w okresie pomiędzy 14. dniem a 2. miesiącem badania, jednak w przypadku haptoglobiny, jej poziom u osobników poddawanych wakcynacji był znacznie niższy niż po podaniu preparatu Zylexis. Szczepienie wpływało również na wzrost ogólnej liczby leukocytów i limfocytów we krwi obwodowej, jednak podobnie jak w przypadku haptoglobiny, lepszy efekt uzyskano po podaniu immunostymulatora. Tylko nieznacznie wzrosła liczba limfocytów CD4 i CD8 w stosunku do grupy kontrolnej oraz po podaniu immunostymulatora. Efekt ten może być spowodowany niewystarczającym pobudzeniem limfocytów T na skutek podania tylko jednej dawki szczepionki. Badania własne potwierdzają, że zastosowanie szczepionki w większym stopniu wpływa na rozwój odpowiedzi związanej z produkcją przeciwciał, ale, niestety, nie wzbudza zadowalającej odpowiedzi komórkowej ze strony limfocytów CD8. Mimo tego zasadność szczepień potwierdzają badania Dall'Ara P. i wsp. (5), którzy określali poziom miana przeciwciał anti-FH-1 i anti-FCV u kotów w różnym wieku. O ile w przypadku przeciwciał anti-FCV po szczepieniu miano było wysokie i dotyczyło 85,4% badanych kotów, o tyle w przypadku przeciwciał anti-FHV było niższe i dotyczyło jedynie 37,1% kotów. W swoich badaniach również Bergmann i wsp. (3) wykazali ponad 4-krotny wzrost miana przeciwciał anti-FCP u szczepionych kotów. Efekty szczepienia żywymi, atenuowanymi lub inaktywowanymi preparatami zawierającymi FHV-1 i FCV były przedmiotem badań różnych autorów (16, 19). Z reguły określano

jedynie wysokość miana przeciwciał oraz skutki zakażenia eksperymentalnego w okresie kilku tygodni po szczepieniu. Badania własne, zwłaszcza w odniesieniu do poziomu przeciwciał, są potwierdzeniem badań przeprowadzonych przez Scott i wsp. (25), które wykazały znaczący wzrost poziomu przeciwciał anti-FHV-1 i anti-FCV po szczepieniu, a następnie ich powolny spadek w ciągu 3 lat. Ponadto okazało się, że komórki pamięci w stosunku do FHV-1 i FCV wykrywano w organizmie szczepionych kotów jeszcze przez okres ponad 7 lat. Z kolei w przypadku dwukrotnego podania szczepionki żywej, atenuowanej przeciwko FCV, a następnie poddawania zwierzęta doświadczalnemu zakażeniu zjadliwym szczepem FCV-255, u badanych kociąt nie doszło do rozwoju choroby w odróżnieniu do grupy kontrolnej. Z drugiej strony, u dużego odsetka kociąt wystąpiła gorączka i drobne owrzodzenia jamy ustnej, co może świadczyć o zbyt niskim pobudzeniu układu immunologicznego. Może to świadczyć o potrzebie opracowania skuteczniejszych preparatów szczepionkowych zarówno w odniesieniu do użytych antygenów, jak i dodatku adjuwantów nowszej generacji lub stosowania dodatkowych preparatów immunostymulujących, zwiększających immunogenność szczepionki.

W badaniach własnych podjęto próbę jednoczesnego zastosowania szczepienia wraz z podaniem preparatu Zylexis (grupa D). Mimo niewątpliwych zalet w stosowaniu preparatu immunostymulującego Zylexis lub szczepionki zawierającej antygeny FHV-1 i FCV, okazało się, że każde z nich indukuje odmienne mechanizmy odpowiedzi immunologicznej, a ich działania w niektórych przypadkach wzajemnie się uzupełniają. U kotów z tej grupy w ciągu całego okresu badania zanotowano wyraźnie wyższe wartości niemal wszystkich ocenianych parametrów w porównaniu do kotów, które otrzymywały tylko immunostymulator lub tylko szczepionkę. Dodatkowo wzrost parametrów immunologicznych u zwierząt otrzymujących immunostymulator i szczepionkę był dodatnio skorelowany ze stężeniem przeciwciał anti-FHV-1 i anti-FCV. Może to świadczyć o wzbudzeniu zadowalającej odpowiedzi typu humoralnego, jak również komórkowego. Wyniki badań własnych wykazały, że ani Zylexis, ani szczepionka nie wywołują tak silnej reakcji immunologicznej, jak podanie szczepionki wraz z immunostymulatorem. Warto zwrócić uwagę na znaczny wzrost odsetka limfocytów CD4 i CD8 oraz stosunku procentowego limfocytów CD4/CD8 po zastosowaniu obu preparatów w porównaniu do opisanych wcześniej słabych efektów po zastosowaniu samej szczepionki. Potwierdzeniem wspomagającej roli immunostymulatora mogą być badania przeprowadzone u psów przez Nascinbeni i wsp. (17) oraz Schutze i wsp. (24), które wykazały pobudzenie limfocytów CD4 do proliferacji, zwiększenie produkcji IL-6 i TNF- α oraz wzrost stosunku

procentowego limfocytów CD4/CD8 w zakażeniach bakteryjnych. W badaniach własnych oceniano również wpływ nieswoistej odpowiedzi immunologicznej poprzez ocenę aktywności haptoglobiny i lizozymu. Haptoglobina jest białkiem ostrej fazy i bierze udział w utrzymaniu homeostazy organizmu zaburzonej pod wpływem działania stresu oraz zakażeń bakteryjnych i wirusowych (6). Wpływ haptoglobiny na odpowiedź immunologiczną związany jest z rolą regulującą proliferację limfocytów B, a w konsekwencji produkcję przeciwciał. Pełni również rolę aktywującą limfocyty T w procesie prezentacji antygenów. Analiza uzyskanych wyników wykazała wysoki i długo utrzymujący się poziom haptoglobiny i lizozymu po zastosowaniu szczepionki jednocześnie z immunostymulatorem. W przeciwieństwie do tego, oddzielne zastosowanie immunostymulatora lub szczepionki skutkowało mniejszym i krócej utrzymującym się poziomem tych parametrów. Niestety, dotychczas nie ma zbyt wielu badań dotyczących wpływu preparatów immunostymulujących i szczepionek u kotów na kształtowanie się poziomu białek ostrej fazy i lizozymu.

Reasumując: przeprowadzone badania wykazały, że najskuteczniejszą metodą pobudzenia odpowiedzi immunologicznej było jednoczesne zastosowanie szczepionki wraz z preparatem immunomodulującym. Już po podaniu jednej dawki immunostymulator w znacznym stopniu zwiększał immunogenność antygenów szczepionkowych w porównaniu do ich oddzielnego zastosowania. Niezbędne jest prowadzenie dalszych badań związanych z wpływem skojarzonego podawania szczepionek i różnych preparatów immunomodulujących na parametry swoistej i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej u kotów. Badania takie mogą przyczynić się do opracowania skuteczniejszych metod profilaktyki zakażeń wywołanych nie tylko przez FHV-1 i FCV, ale także przez inne wirusy.

Piśmiennictwo

- Afonso M. M., Pinchbeck G. L., Smith S. L., Daly J. M., Gaskell R. M., Dawson S., Radford A. D.: A multi-national European cross-sectional study of feline calicivirus epidemiology, diversity and vaccine cross-reactivity. *Vaccine* 2017, 35, 2753-2760.
- Anziliero D., Weiblen R., Kreutz L. C., Spilki F., Flores E. F.: Inactivated Parapoxvirusovis induces a transient increase in the expression of proinflammatory, Th1-related, and autoregulatory cytokines in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2014, 47, 110-118.
- Bergmann M., Ballin A., Schulz B., Dörfelt R., Hartmann K.: Treatment of acute viral feline upper respiratory tract infections. *Tierarztl. Prax. Ausg. K Kleintiere. Heimtiere* 2019, 47, 98-109.
- Caringella F., Elia G., Decaro N., Martella V., Lanave G., Varello K., Catella C., Diakoudi G., Carelli G., Colaianni M. L., Bo S., Buonavoglia C.: Feline calicivirus infection in cats with virulent systemic disease, Italy. *Res. Vet. Sci.* 2019, 124, 46-51.
- Dall'Ara P., Labriola C., Sala E., Spada E., Magistrelli S., Lauzi S.: Prevalence of serum antibody titres against feline panleukopenia, herpesvirus and calicivirus infections in stray cats of Milan, Italy. *Prev. Vet. Med.* 2019, 167, 32-38.
- Eckersall P. D., Bell R.: Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet. J.* 2010, 185, 23-27.
- Hue E. S., Richard E. A., Fortier C. I., Fortier G. D., Paillot R., Raue R., Pronost S. L.: Equine PBMC cytokines profile after in vitro α - and γ -EHV infection: efficacy of a Parapoxvirusovis based-immunomodulator treatment. *Vaccines* 2017, 5, pii: E28, doi: 10.3390/vaccines5030028.
- Janeczko M., Janus I., Janeczko W., Chroszcz A., Czerski A., Sender-Janeczko A., Zawadzki M.: Zapalenie błony śluzowej jamy ustnej kotów – wstępna ocena modelu postępowania klinicznego. *Acta Sci. Pol., Medicina Veterinaria* 2012, 11, 25-35.
- Jas D., Aeberlé C., Lacombe V., Guiot A. L., Poulet H.: Onset of immunity in kittens after vaccination with a non-adjuvanted vaccine against feline panleukopenia, feline calicivirus and feline herpesvirus. *Vet. J.* 2009, 182, 86-93.
- Jas D., Frances-Duvert V., Vernes D., Guigal P. M., Poulet H.: Three-year duration of immunity for feline herpesvirus and calicivirus evaluated in a controlled vaccination-challenge laboratory trial. *Vet. Microbiol.* 2015, 177, 123-131.
- Kanellos T., Sutton D. J., Salisbury C. F., Chalmers W. S.: Combined administration in a single injection of a feline multivalent modified live vaccine against FHV, FCV, and FPLV together with a recombinant FeLV vaccine is both safe and efficacious for all four major feline viral pathogens. *J. Feline Med. Surg.* 2008, 10, 346-354.
- Lewin A. C., Coghill L. M., McLellan G. J., Bentley E., Kousoulas K. G.: Genomic analysis for virulence determinants in feline herpesvirus type-1 isolates. *Virus Genes* 2020, 56, 49-57.
- Mayr A.: Development of a non-immunising, paraspecific vaccine from attenuated pox viruses: a new type of vaccine. *New Microbiol.* 2003, 26, 7-12.
- Meyer A., Kershaw O., Klopffleisch R.: Feline calicivirus-associated virulent systemic disease: not necessarily a local epizootic problem. *Vet. Rec.* 2011, 168, 589-593.
- Monne Rodriguez J., Köhler K., Kipar A.: Calicivirus co-infections in herpesvirus pneumonia in kittens. *Vet. J.* 2018, 236, 1-3.
- Mouzin D. E., Lorenzen M. J., Haworth J. D., King V. L.: Duration of serologic response to three viral antigens in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2004, 224, 61-66.
- Nascimbeni M., Shin E. C., Chiriboga L., Kleiner D. E., Rehmann B.: Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood* 2004, 104, 478-486.
- Petrinov B., Nenkov P., Shekerdjiysky R.: The role of immunostimulants in immunotherapy and immunoprophylaxis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2007, 21, 454-462.
- Poulet H.: Alternative early life vaccination programs for companion animals. *J. Comp. Pathol.* 2007, 137, 67-71.
- Poulet H., Jas D., Lemeter C., Coupier C., Brunet S.: Efficacy of a bivalent inactivated non-adjuvanted feline calicivirus vaccine: relation between in vitro cross-neutralization and heterologous protection in vivo. *Vaccine* 2008, 26, 3647-3654.
- Radford A. D., Addie D., Belák S., Boucraut-Baralon C., Egbernik H., Frymus T., Gruffydd-Jones T., Hartmann K., Hosie M. J., Lloret A., Lutz H., Marsilio F., Pennisi M. G., Thiry E., Truyen U., Horzinek M. C.: Feline calicivirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 2009, 11, 556-564.
- Radford A. D., Gaskell R. M.: Dealing with a potential case of FCV-associated virulent systemic disease. *Vet. Rec.* 2011, 168, 585-586.
- Ryan C., Giguère S., Fultz L., Long M. T., Crawford P. C.: Effects of two commercially available immunostimulants on leukocyte function of foals following ex vivo exposure to *Rhodococcus equi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010, 138, 198-205.
- Schütze N., Raue R., Büttner M., Alber G.: Inactivated Parapoxvirusovis activates canine blood phagocytes and T lymphocytes. *Vet. Microbiol.* 2009, 137, 260-267.
- Scott F. W., Geissinger C. M.: Long-term immunity in cats vaccinated with an inactivated trivalent vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 1999, 60, 652-658.
- Smith S. L., Afonso M. M., Pinchbeck G. L., Gaskell R. M., Dawson S., Radford A. D.: Temporally separated feline calicivirus isolates do not cluster phylogenetically and are similarly neutralised by high-titre vaccine strain FCV-F9 antiserum in vitro. *J. Feline Med. Surg.* 2019, 14:1098612X19866521, doi: 10.1177/1098612X19866521.
- Thiry E., Addie D., Belák S., Boucraut-Baralon C., Egbernik H., Frymus T., Gruffydd-Jones T., Hartmann K., Hosie M. J., Lloret A., Lutz H., Marsilio F., Pennisi M. G., Radford A. D., Truyen U., Horzinek M. C.: Feline herpes virus infection. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 2009, 11, 547-555.
- Traeder W., Brune A., Rehagen M.: Protective effect of the paramunity inducer Parapoxvirusovis (Zylexis®) in kittens experimentally infected with Calicivirus (strain FCV-KS 20). *Der Praktische Tierarzt* 2005, 86, 230-238.
- Ulgen S., Yaramis C. P., Rayaman E., SoyogulGurer U., Or M. E., Sehirli A. O.: Effects of inactivated Parapoxvirusovis on polymorphonuclear leukocyte function and myeloperoxidase activity in horses. *Vet. Med.* 2014, 59, 631-663.
- Weber O., Mercer A. A., Friebe A., Knolle P., Volk H. D.: Therapeutic immunomodulation using a virus – the potential of inactivated orf virus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2013, 32, 451-460.

Autor korespondencyjny: dr n. wet. Marcin Kalinowski, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin; e-mail: marcin.kalinowski@up.lublin.pl