

# Parametry biochemiczne oraz odporności nieswoistej u indyków uodpornionych wirusem ND po podaniu KLP-602 lub *Mycobacterium chelonae*

ROMAN WÓJCIK, GRAŻYNA ŚWIĘCICKA-GRABOWSKA

Zespół Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej Katedry Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn

Wójcik R., Świącicka-Grabowska G.

## Biochemical and nonspecific immunity parameters in turkeys vaccinated with ND virus following KLP-602 or *Mycobacterium chelonae* administration

### Summary

The aim of the study was to compare KLP-602 or *M. chelonae* on some biochemical and nonspecific immunity parameters in turkeys immunized with the virus antigen. Research was carried out on 30 turkeys (3 groups, 10 birds in each), who were given one of the two immunity stimulators: KLP-602 or *M. chelonae* at the age of 29 days. The control group was comprised of birds receiving no stimulators. All the birds received an active mesogenic Roakin strain of ND virus after 7 days and again after 100 days and the biochemical parameters (total proteins, gammaglobulin, ceruloplasmin level), humoral defense parameters (level of lysozyme), cellular parameters (potential killing activity, respiratory burst activity and proliferation activity) were determined. The obtained results demonstrated that *M. chelonae* had a more significant stimulatory effect on biochemical and humeral immunity parameters than KLP-602.

**Keywords:** turkeys, KLP-602, *Mycobacterium chelonae*, nonspecific immunity parameters, biochemical factors

Immunomodulacja, jako efekt stosowania różnego rodzaju środków i metod wpływających na funkcję układu immunologicznego organizmu, może wyrażać się w postaci: immunosupresji (osłabienie, a nawet zahamowanie reaktywności immunologicznej) bądź immunostymulacji (pobudzenie, wzmocnienie reakcji immunologicznych). To ostatnie zjawisko coraz częściej z dobrym skutkiem wykorzystywane jest nie tylko w medycynie ludzkiej, ale również w praktyce weterynaryjnej. W większości przypadków dotyczy to takich gatunków zwierząt, jak: koni, krów, świń, kotów oraz psów, nadal jednak w małym zakresie drobiu. Przyczyn tego stanu można dopatrywać się w specyfice hodowli drobiu. Duża liczebność zwierząt, a co za tym idzie – pracochłonność wykonywanych zabiegów i względy ekonomiczne oraz intensywne i krótkotrwały cykl produkcyjny obligują, aby stosowany stymulator charakteryzowała szczególnie duża skuteczność, a zarazem można go było podawać w formie najbardziej wygodnej, tzn. w paszach (zagrożenie, że może on zostać w niej zniszczony) lub jednorazowej iniekcji.

Z uwagi na to, że na rynku stale zwiększa się liczba stymulatorów, wskazane jest ich szerokie badanie w celu poznania mechanizmów działania oraz skuteczności dla poszczególnych gatunków zwierząt.

Celem badań było określenie parametrów biochemicznych oraz odporności nieswoistej u indyków uodpornionych szczepem Roakin wirusa NDV po podaniu KLP-602 lub *M. chelonae*.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na indykach obu płci, typu Big 6. Dwudniowe indyczęta odchowano w pomieszczeniach klinicznych sposobem tradycyjnym na ściółce.

**Układ doświadczenia.** Badania przeprowadzono na 3 grupach liczących po 10 indyków, którym w 29. dniu życia podano jednorazowo jeden z dwóch badanych stymulatorów odporności: grupa I (KP) otrzymała KLP-602, II (KM) – *M. chelonae*, natomiast grupa III – kontrolna (KK) nie otrzymała żadnego ze stymulatorów. Wszystkim ptakom po 7 dniach od podania stymulatorów odporności zaaplikowano żywy, mezogeniczny szczep Roakin wirusa choroby Newcastle, a następnie zabieg ten powtórzono 100. dnia po pierwszym podaniu. W dniu szczepienia 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 nieswoistej oraz parametrów biochemicznych.

Zastosowano następujące immunostymulatory naturalne: *M. chelonae* (*Mch*) – preparat handlowy produkowany przez Instytut Leon Joly w Eaubonne, Cedex we Francji, podawany

zgodnie z zaleceniami, domięśniowo w dawce 0,5 ml na ptaka oraz KLP-602 – substancję czynną preparatu o nazwie Lydium-KLP w stężeniu 0,1% produkowaną przez – Nika Health Products Inc. Princeton, NJ, USA – podawaną domięśniowo w dawce 50 µg/kg masy ciała.

**Wirus rzekomego pomoru drobiu.** Mezo-genicznego szczepu Roakin „R” wirusa rzekomego pomoru drobiu (NDV – Newcastle Diseases Virus) użyto do domięśniowego szczepienia indyków dawką  $10^{5.6}$ /ml  $EID_{50}$ . Jego miano zakaźne dla zarodków kurzych wynosiło  $EID_{50} = 10^{9.6}$ /ml, dla hodowli komórek zarodka kurzego  $10^{8.6}$ /ml  $TCID_{50}$ .

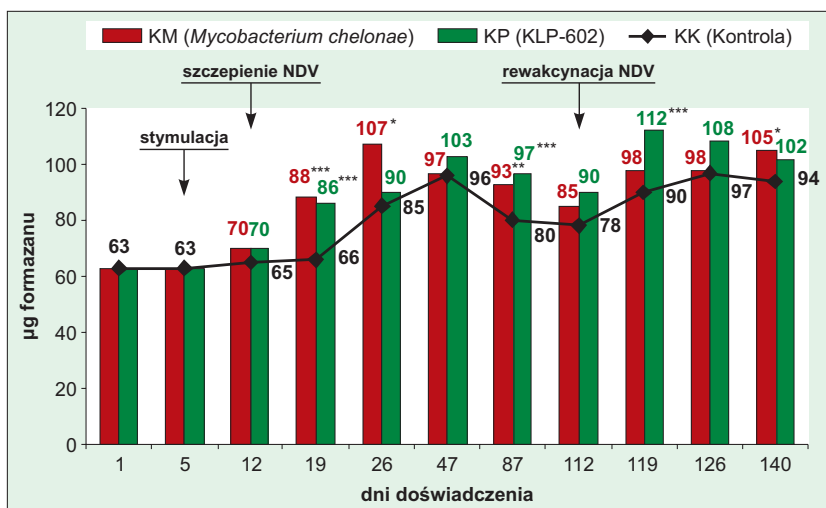
**Badanie odporności nieswoistej.** Wewnątrzkomórkową zdolność zabijania sfagocytowanych drobnoustrojów przez granulocyty obojętnochnone krwi obwodowej określono w odczynie NBT (15), aktywność fagocytarną leukocytów metodą standardową (18) w postaci odsetka komórek fagocytujących (%F) i indeksu fagocytarnego (IF), aktywność lizozymu (mg/l) metodą turbidymetryczną (11) w modyfikacji Siwickiego i Andersona (14), zdolność do proliferowania limfocytów wobec fitohemaglutyniny w teście transformacji blastycznej (TB) metodą Gocha i wsp. (3).

**Ocena parametrów biochemicznych.** Poziom białka całkowitego (g/l) oznaczono metodą spektrofotometryczną (7), poziom gammaglobulin (g/l) metodą precipitacji wg Siwickiego i Andersona (14), aktywność ceruloplazminy (mg%) metodą spektrofotometryczną (12).

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

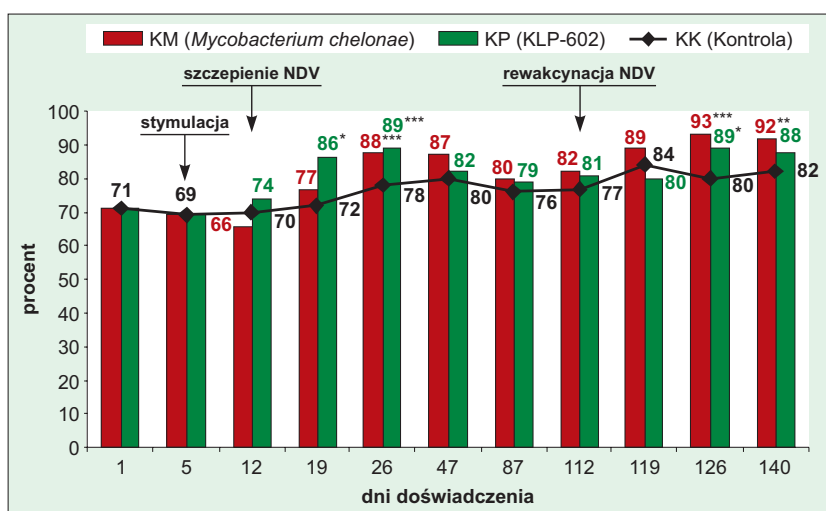
## Wyniki i omówienie

W badaniach oceniano efekt działania dwóch wybranych immunostymulatorów: KLP-602 oraz *M. chelonae* na wskaźniki biochemiczne i parametry odporności nieswoistej u indyków. Wybór tych preparatów do badań podyktowany był nieco odmiennymi przesłankami. KLP-602 jako lek, który został wprowadzony do leczenia weterynaryjnego w ostatnich latach, stanowił swego rodzaju punkt odniesienia do oceny *M. chelonae*, preparatu naturalnego, mniej znanego w kraju, a z powodzeniem stosowanego w praktyce lekarskiej na zachodzie Europy. We wcześniejszych badaniach własnych (13, 16) stwierdzono, że preparat ten stymuluje przede wszystkim odporność humoralną, w mniejszym zaś stopniu odporność komórkową. Mechanizm jego działania opiera się na pobudzaniu poliklonalnej proliferacji, właściwościach mitogennych splenocytów, migracji leukocytów krwi obwodowej oraz syntezy interleukin 1, 2, 4 i 5 (2, 4, 6, 10). Dużą jego zaletą jest to, że preparat jest bezpieczny nawet przy znacznych przekroczeniach dawki, dlatego podawać go można również samicom ciężarnym i karmiącym.



Ryc. 1. Aktywność NBT leukocytów w surowicy krwi indyków

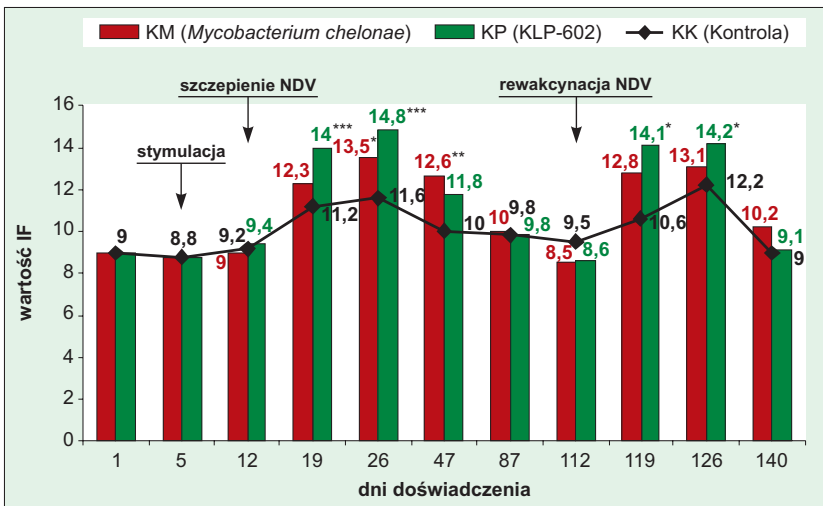
Objaśnienia do ryc. 1-8: \* – statystycznie istotne różnice  $p \leq 0,05$ , \*\* – statystycznie istotne różnice  $p \leq 0,01$ , \*\*\* – statystycznie istotne różnice  $p \leq 0,001$



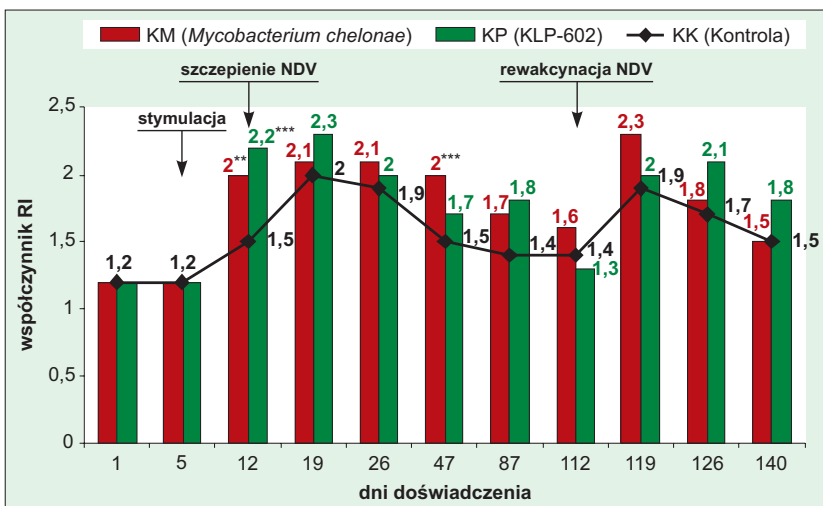
Ryc. 2. Fagocytoza – procent komórek fagocytujących w surowicy krwi indyków

Wyniki badań własnych wskazują, że w grupach stymulowanych użytymi w pracy preparatami wszystkie wskaźniki kształtowały się na wyższym poziomie niż w grupie ptaków kontrolnych. Jednak porównując efekt ich działania, obserwowano pewne zróżnicowanie między obu stymulatorami. KLP-602 wykazywał nieco większą aktywność niż *M. chelonae* w stosunku do parametrów nieswoistej odporności komórkowej, co znalazło wyraz w aktywności metabolicznej – NBT (ryc. 1) i fagocytarnej (%F) (IF) leukocytów (ryc. 2, 3) oraz zdolności (TB) transformowania w formy blastyczne limfocytów (ryc. 4). Jednak procent komórek fagocytujących w trakcie odpowiedzi wtórnej oraz aktywność metaboliczna leukocytów w trakcie odpowiedzi pierwotnej na antygen wirusa ND w grupach stymulowanych *M. chelonae* były statystycznie wyższe niż w grupie traktowanej KLP-602.

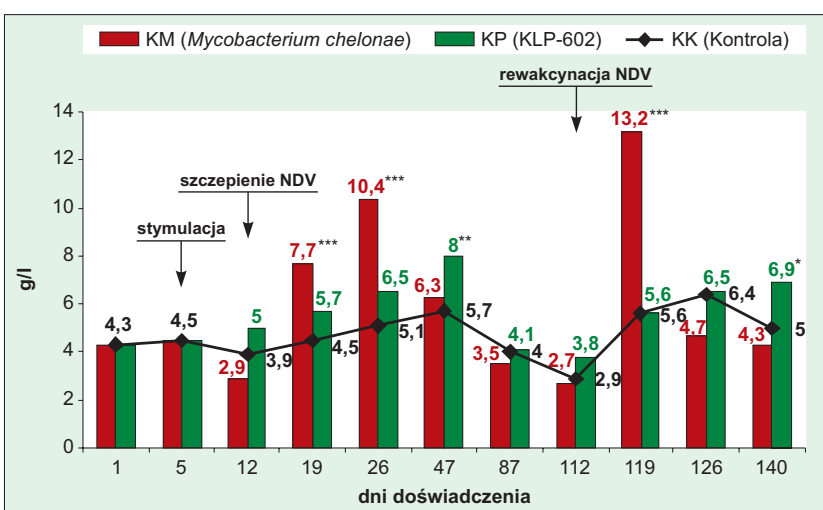
Podobnie pozytywne wyniki w stosunku do tego rodzaju odporności, po zastosowaniu KLP-602 uzyskali Malinowski i wsp. u krów (8) i loch (9) oraz Krzy-



Ryc. 3. Fagocytoza – indeks fagocyтары u indyków



Ryc. 4. Współczynnik reaktywności RI limfocytów stymulowanych fitohe-maglutyniną oznaczany w teście transformacji blastycznej u indyków



Ryc. 5. Poziom gammaglobulin w surowicy krwi indyków

żanowski i wsp. (5) u koni, stwierdzając wyższy procent komórek fagocytycznych, aktywność NBT leukocytów i indeks fagocyтары. Natomiast Lagrange i wsp. (6), Vincent-Naulleau i wsp. (17) oraz Garcia Garcia

i wsp. (1) po zastosowaniu *M. chelonae* u myszy i szczurów stwierdzili wzrost zdolności fagocyтары makrofagów, indeksu fagocyтары, zdolności transformowania limfocytów w formy blastyczne oraz poziomu białka całkowitego.

W zakresie oznaczanych wskaźników biochemicznych stwierdzono zdecydowanie wyższe ich poziomy w grupach stymulowanych prątkiem *M. chelonae* niż KLP-602. Najefektywniej wyraża to poziom gammaglobulin (ryc. 5), który pomiędzy 14. a 21. dniem odpowiedzi pierwotnej przy *M. chelonae* był 2 razy, a 7. dnia po rewakcyacji prawie 3 razy wyższy, zaś przy KLP-602 jedynie 35. dnia odpowiedzi pierwotnej i 28. dnia odpowiedzi wtórnej statystycznie istotnie wyższy niż w grupie kontrolnej.

Stwierdzono nieco słabszy niż przy gammaglobulinach wpływ obu preparatów na poziom ceruloplazminy. W obu stymulowanych grupach indyków do 35. dnia odpowiedzi pierwotnej obserwowano statystycznie istotne wzrosty poziomu tego białka ostrej fazy, natomiast po rewakcyacji były one okresowo niższe w grupach doświadczalnych niż kontrolnej (ryc. 6).

Podkreślić należy również fakt, że jedynie w grupie stymulowanej *M. chelonae* poziom białka całkowitego (ryc. 7) wykazywał znaczny wzrost wartości, tylko w trakcie odpowiedzi pierwotnej, podczas gdy po zastosowaniu KLP-602 mimo nieznacznie wyższych wartości niż w grupie kontrolnej, statystycznie istotne różnice zaznaczyły się krótkotrwale jedynie w pierwszym i dwunastym tygodniu po stymulacji.

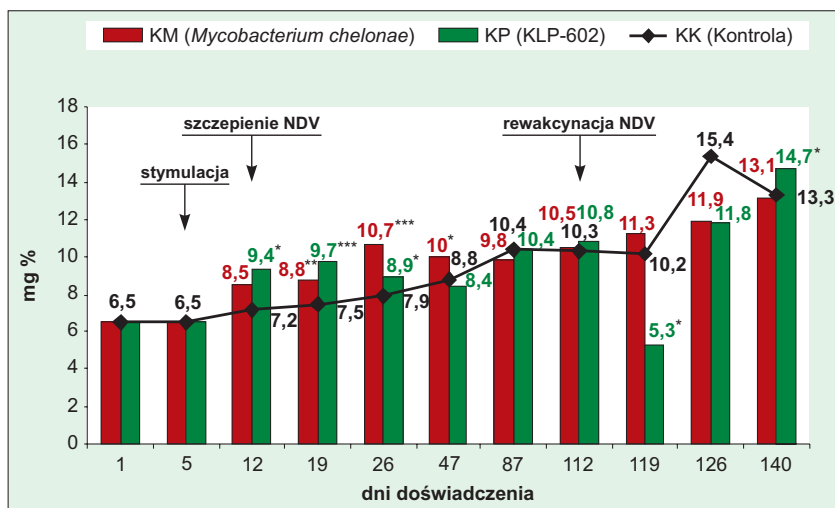
Jak wiadomo, gammaglobuliny stanowią podstawę do efektywnego wytworzenia odporności humoralnej, zaś białka ostrej fazy są pierwszą barierą w zwalczaniu czynnika zakaźnego, współpracując ściśle z innymi nieswoistymi czynnikami odporności np.: dopełniaczem, fagocytami itp., co wpływa na zdolność eliminacji czynnika zakaźnego.

Zaskakujące na tle badań innych autorów (13) wydają się uzyskane w niniejszej pracy wyniki dotyczące aktywności lizozymu (ryc. 8) oznaczanego we krwi indyków, gdyż statystycznie istotne różnice w porównaniu z grupą kontrolną obserwowano jedynie w grupie stymulowanej *M. chelonae* pomiędzy 35. a 75. dniem po pierwszym podaniu wirusa ND. Przypuszczać można, że związane to być może z gatunkiem zwierząt – u ptaków nieco inny przebieg mechanizmów odpornościowych niż u ssaków.

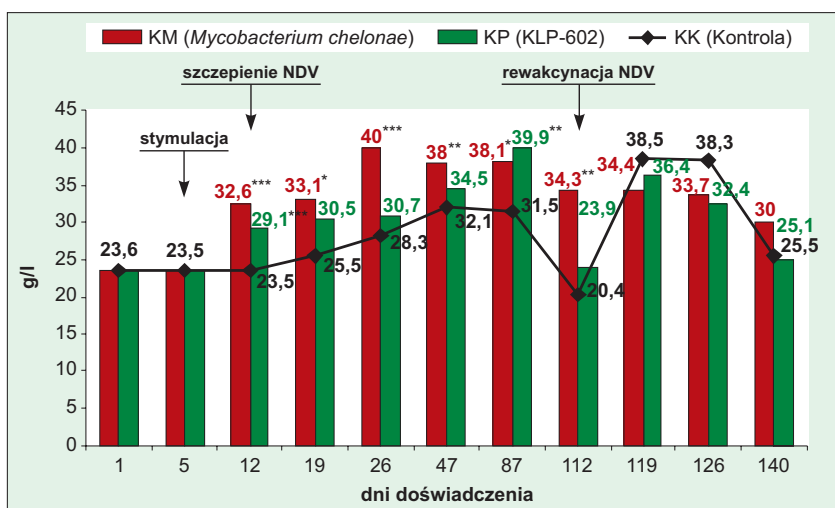
Na podstawie niniejszych badań można stwierdzić, że *M. chelonae* wykazywał równie dobre, a niekiedy lepsze właściwości stymulujące niż KLP-602. Preparat ten najskuteczniej stymulował wskaźniki biochemiczne oraz nieswoistą odporność humoralną (lepiej niż KLP-602), nieco słabiej nieswoistą odporność komórkową (podobnie jak KLP-602). Mając na uwadze, że oba preparaty stosowane były u indyków z prawidłowo działającym układem odpornościowym, to wyniki zachęcają do dalszych prac porównawczych ich skuteczności u indyków z osłabionym układem immunologicznym.

## Piśmiennictwo

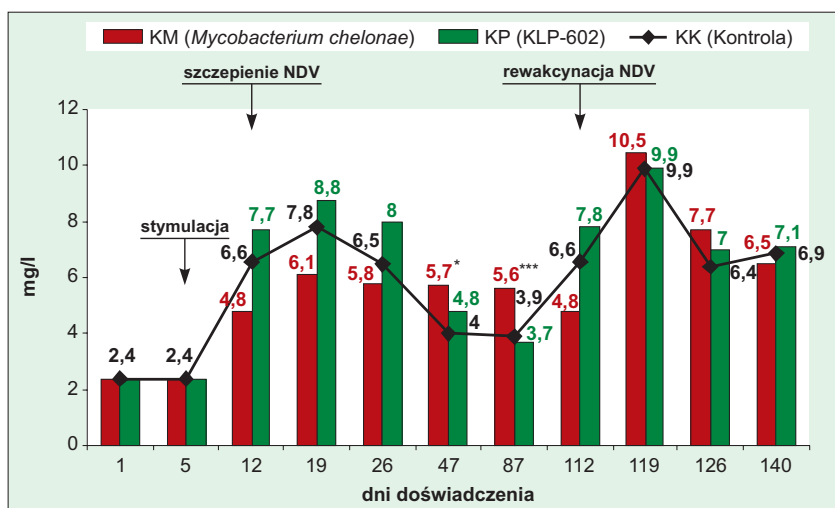
- Garcia Garcia J. J., Barriga C., Rodriguez A. B., Ortega E.: Effect of polar glycopeptidolipids from *Mycobacterium chelonae* (GPLp-Mc) on phagocytosis and superoxide anion production of macrophages from mice. Influence of physical activity. Mol. Cell. Biochem. 1998, 183, 159-163.
- Gjata B., Hannoun C., Boulouis H., Neway T., Pilet C.: Adjuvant activity of polar glycopeptidolipids of *Mycobacterium chelonae* (pGPL-Mc) on the immunogenic and protective effects of an inactivated influenza vaccine: C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie /Life sciences 1994, 317, 257-263.
- 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.
- Granier H., Sensebs A.: Arthritis a *Mycobacterium chelonae* chez un immunodeprime efficacité du traitement par clarythromycine. Faits cliniques et lettres. Ann. Med. Interne 1993, 144, 490-504.
- Krzyżanowski J., Krakowski L., Siwicki A. K.: Wpływ podawania izoprynozyny i *Mycobacterium chelonae* na wybrane wskaźniki nieswoistej odporności komórkowej i humoralnej u koni. Medycyna Wet. 1997, 52, 261-269.
- Lagrange P. H., Fourgeaud M., Neway T., Pilet C.: Mycobacterial polar glycopeptidolipids enhance resistance to experimental murine candidiasis: C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie /Life sciences 1995, 318, 359-365.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R.: Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-275.
- Malinowski E., Kłossowska A., Szalbierz M., Kuźma R.: Wpływ Lydium-KLP na przebieg i skuteczność dowymieniowej antybiotykoterapii klinicznych postaci mastitis u krów. Medycyna Wet. 1997, 53, 45-48.
- Malinowski E., Tarasiuk K., Nadolny M.: Lydium KLP w terapii zaburzeń okołoporodowych u loch. Medycyna Wet. 1995, 51, 351-353.
- Neway T., Boulouis H., Thibault D., Pilet C.: Activities of polar glycopeptidolipids from *Mycobacterium chelonae* in the reversal of a chemically induced leucopenia. C. R. Acad. Sci. III, Paris 1992, 315, 13-19.
- Parry R. M., Chandau R. C., Shahani R. M.: A rapid and sensitive assay of muramidase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1965, 119, 384-386.
- Rice E. W., Wagman E., Takenaka Y.: Ceruloplazmin assay in serum: standardization of ceruloplazmin activity in terms of international enzyme units. Diag. Lab. 1986, 12, 39-53.
- Rutherford M.: Rekonstrukcyjny wpływ *Mycobacterium chelonae* na odpowiedź immunologiczną drobiu będącego w stanie immunosupresji. Praca dokt., Wydz. Med. Wet., ART Olsztyn 1998.
- Siwicki A. K., Anderson D. P.: Immunostimulation in fish: Measuring the effects of stimulants by serological and immunological methods. U. S. Fish Wildl. Service-IFI, Olsztyn 1993, 1, 17.
- Sychłowy A., Lukas A.: Ocena mikroilościowej metody redukcji NBT przez granulocyty krwi obwodowej. Pol. Tyg. Lek. 1978, 33, 45-48.
- Świećicka-Grabowska G., Wójcik R.: An evaluation of the modifying effect of a single and repeated administration of *M. chelonae* on the immunity system in turkeys. Pol. J. Vet. Sci. 2001, 4, 177.



Ryc. 6. Poziom ceruloplazminy w surowicy krwi indyków



Ryc. 7. Poziom białka całkowitego w surowicy krwi indyków



Ryc. 8. Aktywność lizozymu w surowicy krwi indyków

- Vincent-Naulleau S., Neway T., Thibault D., Barrat F., Boulouis H. J., Pilet C.: Effect of polar glycopeptidolipids of *Mycobacterium chelonae* (pGPL-Mc) on granulomacrophage progenitors. Res. Immunol. 1995, 146, 363-371.
- Wiśniewski J., Grabowska G., Trybala E., Rotkiewicz Z.: Wpływ podania biotropiny i lewamizolu na wybrane wskaźniki odporności swoistej i nieswoistej u świń. Medycyna Wet. 1993, 49, 66-68.

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