

Praca oryginalna

Original paper

Kształtowanie się swoistej odpowiedzi humoralnej i komórkowej u gołębi immunizowanych atenuowaną i inaktywowaną szczepionką przeciwko salmonellozie

BARBARA MAJER-DZIEDZIC, MICHAŁ POCHODYŁA*, JADWIGA JAWORSKA-ADAMU**, ANNA DUDZIC***, STANISŁAW TOKARZEWSKI****, ANDRZEJ POCHODYŁA*****

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, **Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

*Laboratorios Hipra S.A., Av. La Selva, 13, 17170 Amer (Girona), Hiszpania

***Zakład Chorób Ptaków, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

****AVI EXPERT SPWCP, ul. Gajowa 1, 20-827 Lublin

*****VEPHARM Sp. z o.o., ul. Karpińskiego 7, 24-100 Puławy

Otrzymano 07.05.2014

Zaakceptowano 24.07.2014

Majer-Dziedzic B., Pochodyła M., Jaworska-Adamu J., Dudzic A., Tokarzowski S., Pochodyła A.

Course of specific humoral and cellular immune response in pigeons immunized with attenuated and inactivated vaccines against salmonellosis

Summary

The aim of the study was to observe the time course of the immune response in pigeons after immunization with a live (attenuated) vaccine, Zoosal T, and an autogenous bacterin (inactivated vaccine). The tube agglutination test and the ELISA test were used to measure the dynamics of serum antibodies to Salmonella, determine the white blood cell (WBC) count, and evaluate the leukogram of immunized pigeons. In order to evaluate the cellular response in immunized birds, a leukocyte migration inhibition (LMI) procedure was developed and tested. Histological changes were determined in pigeons immunized with ZOOSAL T and the experimental vaccine. The tests revealed a relationship between the beginning of the immune response as evaluated by tube agglutination and ELISA tests and by the MIF test.

After immunization with ZOOSAL T, when the cellular response, as measured by the LMI test, appeared at day 14 and amounted to 32% migration inhibition, there was also a significant increase in antibody titers in the agglutination test (70.00) and an increase in ELISA OD values (0.259). After a single administration of the experimental vaccine, the agglutination antibody titers at day 21 of the experiment increased markedly (93.33), as did ELISA OD value, which increased until day 35 (to 0.345). Leukocyte migration inhibition reached the highest value (26%) at day 28, which shows that the immune response after single immunization increased more slowly than in group B. At day 7 after repeat vaccination with the autogenous bacterin, there was a significant increase in agglutination antibody titers (320.00). Similar patterns of changes were observed in the ELISA test. High OD values appeared at day 7 after revaccination (0.985) and persisted during the subsequent days of the experiment (28 days after revaccination: OD = 0.931). The cellular response appeared as early as 24 hours after revaccination (39% migration inhibition) and increased very rapidly, reaching 76% inhibition at day 3. Subsequently, there was a slow decline, but 2 weeks after repeat vaccination, the percentage of migration inhibition was still 22% (tab. 1, 2, 5).

Our study demonstrated that the experimental vaccine based on an isolated strain of Salmonella Typhimurium var. Copenhagen, containing carbomer and Ginseng extract (Radix panax ginseng), administered twice to domestic pigeons induced a humoral and cellular immune response that was twice as strong as the response induced by the commercial vaccine ZOOSAL T.

Keywords: pigeons, vaccine, cellular response, humoral response

Salmonelloza stanowi poważny problem w hodowli gołębi domowych, zwłaszcza użytkowanych sportowo. Wprawdzie możliwe jest leczenie choroby, lecz długotrwała terapia i jej ograniczona skuteczność sprawiają,

że najpewniejszym sposobem jej zwalczania pozostają szczepienia ochronne.

Wprowadzenie w Europie w latach 90. XX wieku szczepień gołębi przeciwko salmonellozie wyraźnie

ograniczyło częstość zachorowań u immunizowanych ptaków. Efektywność szczepionek dla gołębi oceniana w testach laboratoryjnych jest zróżnicowana i może być uzależniona od drogi podania antygeny oraz rodzaju szczepu użytego w zakażeniu doświadczalnym (6, 9, 16, 20, 28). W Polsce do immunizacji gołębi stosuje się szczepionki żywe i inaktywowane. Atenuowana szczepionka firmy IDT Biologika GmbH pn. Zoosal T, zawiera auksotropowy mutant *Salmonella* Typhimurium (9), a wieloważne szczepionki Salmovir i Mykosalmovir produkcji Biowet Puławy mają w swoim składzie inaktywowane serotypy: *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi C*, *S. Typhimurium var. Copenhagen*, *S. Anatum*, *S. Senftenberg*.

Atenuowane preparaty wykorzystywane w immunoprofilaktyce salmonellozy ptaków mogą być podawane w iniekcji (gołębie) lub *per os* (kury). Żywe bakterie silnie indukują miejscową odporność błon śluzowych przewodu pokarmowego (GALT – Gut Associated Lymphoid Tissue), wywołują naciek heterofilów oraz stymulują wytwarzanie β -defensyn. Jak wykazano w badaniach, atenuowane szczepionki przeciwko salmonellozie kur są efektywne we wzbudzeniu odporności, jednak ich stosowanie wiąże się ryzykiem rewersji zmodyfikowanych szczepów *Salmonella* do postaci zjadliwej oraz siewstwem utrudniającym różnicowanie immunizowanych zwierząt od osobników zakażonych szczepami terenowymi (2). Szczepionki żywe mogą także indukować paradoksalne zjawisko przemijającej głębokiej immunosupresji ułatwiającej zakażenie innymi zarazkami (23).

Analiza porównawcza efektów stosowania żywych oraz zabitych szczepionek przeciwko salmonellozie ptaków wykazała, że szczepionki inaktywowane (bakteryny) są zwykle mniej efektywne w zapobieganiu chorobie. W porównaniu do szczepionek atenuowanych wyzwalają krótkotrwałą odpowiedź surowicznych przeciwciał IgG, słabiej wzbudzają odpowiedź komórkową oraz reakcję przeciwciał sekrecyjnych klasy IgA, jednak odpowiedź przeciwciał IgG wzmocniona szczepieniami przypominającymi odgrywa kluczową rolę w ochronie ptaków przed wtórnymi zakażeniami układowymi wywołwanymi przez *Salmonella* (23, 26, 31, 32). Zaletami bakteryn salmonellowych jest brak siewstwa oraz stymulacja biernej naturalnej odporności istotnej dla ochrony potomstwa w pierwszych dniach życia. Bakteryny mogą, niestety, prowokować miejscowe i ogólne reakcje poszczepienne związane z toksycznym oddziaływaniem endotoksyn bakteryjnych lub substancji pomocniczych wchodzących w skład adiuwantów (emulgatory, oleje mineralne) (1, 32). W latach 2009-2010 po stosowaniu dostępnej na polskim rynku inaktywowanej skojarzonej szczepionki przeciwko salmonellozie gołębi opartej na niekompletnym olejowym adiuwancie pn. Salmovir u szczepionych gołębi wystąpiły silne działania niepożądane w postaci reakcji miejscowych i ogólnych (osowienie, utrata apetytu, biegunka) oraz pojedyncze upadki ptaków, u których nie podjęto leczenia (10). Efektywność bakteryn oceniana w testach *challenge*

na gatunku docelowym – gołębiach jest zróżnicowana (6, 27, 28).

Celem badań była ocena immunogenności szczepu *Salmonella* wybranego po serii badań wstępnych, w których testowano trzy izolaty uzyskane od padłych gołębi, określone jako szczepy Typhimurium var. Copenhagen (15).

Oceniano reakcję immunologiczną ptaków na podanie żywej (atenuowanej) szczepionki Zoosal T oraz bakteryny własnej (szczepionki inaktywowanej). Przy pomocy testu aglutynacji probówkowej oraz testu ELISA przebadano dynamikę powstawania surowicznych przeciwciał anty-*Salmonella*, określono liczbę białych krwinek (WBC) oraz oceniono leukogram immunizowanych gołębi. Ponadto opracowano procedurę i wykonano test hamowania migracji leukocytów (leukocytes migration inhibition – LMI) do oceny odpowiedzi komórkowej szczepionych ptaków, a także określono zmiany histologiczne u gołębi uodpornianych szczepionką Zoosal T oraz szczepionką eksperymentalną.

Materiał i metody

Gołębie. Badania przeprowadzono na 6-8-tygodniowych gołębiach pocztowych (*Columba livia*) (72 ptaki) pochodzących z prywatnych hodowli. Sposób postępowania z ptakami opisali Majer-Dziedzic i wsp. (15).

Gołębie podzielono na 3 grupy doświadczalne (grupa B, C, D) oraz grupę kontrolną (grupa A), po 18 ptaków w każdej. Każdą dawkę szczepionki podawano gołębiom drogą iniekcji podskórnej w okolicę grzbietu szyi. Grupę B tworzyły gołębie immunizowane podskórnie żywą szczepionką Zoosal T (0,5 ml) podaną zgodnie z zaleceniami producenta (IDT Biologika GmbH). Z kolei grupę C stanowiły gołębie, którym podano jednokrotnie podskórnie szczepionkę własną (0,2 ml), natomiast grupę D tworzyły gołębie immunizowane podskórnie bakteryną własną (0,2 ml) dwukrotnie w odstępie 3-tygodniowym. Grupę kontrolną (grupa A) stanowiły gołębie, którym zamiast szczepionki podano podskórnie zbuforowany roztwór soli (PBS) w ilości 0,5 ml. Poszczególne grupy ptaków przetrzymywano w oddzielnych wolierach.

Krew do badania pobierano z żyły skrzydłowej w dniu 0, 7, 10, 14, 21, 22, 24, 28, 35, 42, 50. doświadczenia. Pobraną krew preparowano według standardowych procedur w zależności od specyfiki badań.

Szczepionka Zoosal T. W badaniach wykorzystano komercyjną żywą liofilizowaną szczepionkę Zoosal T (IDT Biologika GmbH) zawierającą w jednej dawce (0,5 ml) nie mniej niż 5×10^6 jtk i nie więcej niż 1×10^7 podwójnie atenuowanego, adenino-histydynowego, stabilnego genetycznie, auksotropowego mutantu bakterii *Salmonella* Typhimurium.

Szczepionka własna (prototyp). Bakteryna została oparta na izolacie 66-03 *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen i została sporządzona według zmodyfikowanej metody opisanej przez Abdolvahab i Friendship (1). W jednej dawce (0,2 ml) zawarto $10^{9,0}$ inaktywowanych komórek *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen, 0,20 mg ekstraktu żeńszenia oraz 1,00 mg karbomeru. Adiuwant przygotowano według patentu nr PL P.396327.

Jałowość szczepionki kontrolowano przez posiewy na podłoża agarowe z krwią, podłoża wybiórcze XLD oraz podłoża Wrzoska, a nieszkodliwość oceniano na 6 białych myszach,

którym podano dootrzewnowo 1 dawkę szczepionki (0,2 ml) i obserwowano przez okres 7 dni.

Aglutynacja probówkowa. Odczyn aglutynacji wykonywano według Majer-Dziedzic i wsp. (15).

Test immunoenzymatyczny ELISA. W badaniach zastosowano test ELISA wykonany wg Pochodyły i Samorek-Salamonowicz (19).

Wysokość miana przeciwciał w obu testach oceniano po 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 i 50 dniach od momentu podania szczepionek.

Wybrane parametry komórkowe krwi pełnej. Według standardowych metod określano liczbę krwinek białych w 1 μ l krwi pełnej, a także odsetkowy (%) skład subpopulacji leukocytów (leukogram).

Krew pełną do badania pobierano od gołębi grup A, B, C i D w dniu 0, 7., 14., 21., 22., 24., 28., 35., 42. i 50. doświadczenia.

Test hamowania migracji leukocytów (LMI). Badanie wykonano metodą kapilarową. Leukocyty uzyskiwano z krwi pobranej z żyły skrzydłowej od gołębi z grup A, B, C w 0, 7., 10., 14., 21., 28., 35., 42. i 50. dniu doświadczenia. W grupie D pobierano krew dnia 0, 7., 10., 14. i 21. W 21. dniu po pobraniu krwi gołębie poddano rewakcytacji i pobierano krew 24 godziny po iniekcji oraz 3., 7., 14., 21. i 29. dnia. Krew zbiorczą od 6 gołębi w całkowitej objętości 8 ml pobierano do jałowych probówek typu Vacutainer zawierających heparynę. Po rozcieńczeniu krwi płynem Eagle'a w stosunku 1 : 1 podwarstwiano ją gradientem (fikol z uropoliną o gęstości 0,835 g \times cm⁻³ i osmolalności 311 mm Os/kg), w proporcji 1 części gradientu na 3 części krwi. Badane próbki wirowano przy 800 g w czasie 30 minut w temperaturze 25°C. Uzyskiwano dwie interfazy komórek, z których górna zawierała komórki jądrowe, dolna – komórki wielojądrowe. Komórki interfaz zbierano i przemywano płynem Eagle'a z dodatkiem 10% inaktywowanej płodowej surowicy bydłowej, 0,1% albuminy bydłowej, 0,2% glukozy, 20 μ g/ml gentamycyny oraz heparyny (100 μ l/ml). Komórki po każdym płukaniu wirowano 15 minut przy 400 g w 4°C. Jeśli przy pierwszym wirowaniu stwierdzano w osadzie domieszkę erytrocytów, hemolizowano je 0,83% roztworem NH₄Cl w buforze Tris i ponownie płukano. Osad uzyskanych leukocytów zawieszano w płynie Eagle'a z dodatkiem gentamycyny (20 μ g/ml) i 20% inaktywowanej surowicy cielęcej, celem uzyskania gęstości 5 \times 10⁷ komórek w 1 ml. Silikonowe kapilary wypełniano zawiesiną komórek i zaklejano z jednej strony mieszaniną parafiny z wazeliną. Po odwirowaniu 10 minut przy 400 g w 4°C, odcinano końce kapilar na granicy płynu z osadem i przyklejano pastą silikonową do dna komór wykonanych z tworzywa sztucznego, nietoksycznego dla leukocytów. Do każdego oznaczenia przygotowywano 6-8 napełnionych komórkami kapilar, po 2 w jednym oczku komory. Następnie komory wypełniano płynem Eagle'a zawierającym określoną ilość antygeny. Antygen testowano w badaniach wstępnych.

Antygen *Salmonella* przygotowany według metody Abdolvahab i Friendship (1) miareczkowano testem hamowania migracji leukocytów celem określenia dawki nietoksycznej dla komórek. Oceniano: antygen nierozcieńczony, rozcieńczony 1/5, 1/10, 1/20 i 1/40 w dawkach 10, 20, 50, 70 i 100 μ l/ml podłoża. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie, wykonując analizę wariancji jednoczynnikowej, a różnicę weryfikowano testem t-Studenta. Największe różnice wskazujące na toksyczne działanie antygeny ($p \leq 0,001$) uzyskano z zawiesiną nierozcieńczoną 1/10 dla dawek 70 i 100 μ l \times 1 ml⁻¹.

Działanie toksyczne ($p \leq 0,01$) stwierdzono przy zastosowaniu antygeny nierozcieńczonego i rozcieńczonego 1/5 dla dawki 70 i 100 μ l \times 1 ml⁻¹. Antygen rozcieńczony 1/20 i 1/40 w dawkach 10, 20 i 50 μ l \times 1 ml⁻¹ nie był toksyczny w przeprowadzonych badaniach. Do wykonania właściwego odczynu przygotowano antygen w rozcieńczeniu 1/20 i dawce 50 μ l \times 1 ml⁻¹ podłoża. W badaniach wstępnych komórki inkubowano w temperaturze 37°C i 42°C. Temperatura 37°C wpływała hamująco na wielkość pól migracji leukocytów. Testy wykonywano zatem w temperaturze 42°C.

Do wykonania odczynu przygotowano antygen w rozcieńczeniu 1 : 20, który wprowadzano w ilości 50 μ l \times ml⁻¹ do komór reakcyjnych. Komory kontrolne wypełniano płynem odżywczym bez dodatku antygeny. Inkubację przeprowadzano w temperaturze 42°C przez 24 godziny. Następnie przy pomocy czytnika do mikrofilmów obrysowywano wielkość stref migracji i planimetryowano. Ze wzoru:

$$1 - \frac{\text{pole badane w obecności antygeny}}{\text{pole badane kontrolne}} \times 100 = x [\%]$$

Wartość odczytu podawano w procentach. Wartości hamowania migracji powyżej 20% uznano za swoiste.

Badanie zmian histologicznych w śledzionach gołębi doświadczalnych. Śledziony pobrane od gołębi z grupy kontrolnej (A) i wszystkich grup doświadczalnych (grupy B, C i D) utrwalono w zbuforowanej 10% formalinie. Następnie rutynową techniką histologiczną wykonywano parafinowe bloczki. Skrawki tkankowe o grubości 6 μ m barwiono hematoksyliną i eozyną (H + E). Następnie preparaty oglądano i fotografowano w mikroskopie świetlnym Axiolab (firmy Zeiss).

Opracowanie wyników. Uzyskane wyniki zestawiono w tabelach, podając wartości średnie, minimalne, maksymalne oraz odchylenia standardowe. Wykonano analizę wariancji i zweryfikowano istotność różnic pomiędzy średnimi testem Tukeya, stosując program statystyczny Statistica 9.0.

Wyniki i omówienie

Odczyn aglutynacji probówkowej. Surowice ptaków z grupy kontrolnej (A) podczas doświadczenia wykazywały aglutynację z antygenem *Salmonella* w zakresie poniżej 1 : 10. Wartości te uznawane są za ujemne.

Średnie wartości poziomu mian przeciwciał aglutynacyjnych w surowicach immunizowanych gołębi w badanych grupach zestawiono w tab. 1. Wyniki wskazują na szybszy wzrost mian w grupie B do 21. dnia doświadczenia w porównaniu do grupy C i D, a istotność statystycznych różnic ($P \leq 0,05$) wystąpiła w 7. i 14. dniu. Natomiast od 28. dnia w grupie D miana były najwyższe i w porównaniu z innymi grupami były to różnice istotne ($P \leq 0,05$).

Test ELISA. Metoda ta znajduje zastosowanie w standardowych badaniach serodiagnostyki salmonelloz zwierząt oraz w ocenie skuteczności szczepień przeciwko tej chorobie zarówno u kur, jak i gołębi (18-21, 26, 32).

W badaniach własnych podanie szczepionek gołębiom grupy B (Zoosal T), grupy C (bakteryjna własna) i grupy D (bakteryjna własna z rewakcyacją) wywołało serokonwersję swoistych przeciwciał. Serokonwersja u gołębi immunizowanych szczepionką Zoosal T (grupa B) wystąpiła już w 7. dniu doświadczenia, a w 14.

dniu była 2,5-krotnie wyższa niż średnia OD stężenia przeciwciał w dniu „0”. Parametry te utrzymywały się na zbliżonym poziomie do 35. dnia doświadczenia. Stopniowy spadek wartości OD obserwowano w 42. oraz 50. dniu. W grupie gołębi immunizowanych szczepionką własną (grupa C i D) zauważalny wzrost wartości OD wystąpił w 21. dniu i był blisko 2,5-krotnie wyższy od wartości wyjściowych. Uzyskane wartości w grupie gołębi immunizowanych jednokrotnie własną szczepionką utrzymywały się do 42. dnia doświadczenia. W grupie gołębi rewakcywowanych obserwowano silną reakcję anamnesticzną w 7. dniu po rewakcytacji (tj. 28. dnia doświadczenia), stwierdzając ponad 9-krotny wzrost wartości OD. W 50. dniu doświadczenia OD było najwyższe ze wszystkich grup doświadczalnych, przekraczając 7-krotnie wartość surowic zerowych (tab. 2).

Ogólna liczba białych krwinek (WBC). Istotną kwestią w badaniach własnych było prześledzenie

kształtowania się wybranych parametrów komórkowych pełnej krwi gołębi oraz ich ocena.

Średnie wartości ogólnej liczby białych krwinek (WBC) uzyskane dla grup A, B i C mieściły się w przedziale 9900-22 300 krwinek w 1 μ l i nie odbiegały istotnie od publikowanych norm fizjologicznych (5, 22, 24, 29). Wyraźny wzrost liczby leukocytów zaobserwowano w grupie D, w której w 24 godziny po rewakcytacji ich wartość wynosiła powyżej 30 000 i była 2,5-krotnie wyższa do wartości kontrolnych (tab. 3).

Heterofile. W ocenie leukogramu szczególną uwagę zwrócono na heterofile. Komórki te stanowią od 40% do 75% krwinek białych i są bardzo ważnym mediatorem odporności naturalnej, szczególnie w przebiegu zakażeń bakteryjnych (4, 11-13). Biorąc pod uwagę ich rolę w mechanizmach odporności komórkowej ptaków, postanowiono ocenić kształtowanie się odsetka tych granulocytów w przebiegu doświadczenia.

Tab. 1. Miana przeciwciał aglutynacyjnych w surowicy gołębi poszczególnych grup (n = 6)

Grupa		Dni po szczepieniu							
		0	7	14	21	28	35	42	50
A	\bar{x}	10,00 ^a	10,00 ^a	10,00 ^a	10,00 ^a	10,00 ^a	10,00 ^a	10,00 ^a	10,00 ^a
	SD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B	\bar{x}	10,00 ^a	26,67 ^b	70,00 ^c	106,67 ^b	53,33 ^b	30,00 ^b	30,00 ^b	20,00 ^b
	SD	0,00	10,33	50,20	41,31	30,11	10,95	24,50	21,90
C	\bar{x}	10,00 ^a	10,00 ^a	23,33 ^b	93,33 ^b	63,33 ^b	56,67 ^c	36,67 ^b	26,67 ^b
	SD	0,00	0,00	8,16	32,65	26,58	26,58	8,16	10,33
D	\bar{x}	10,00 ^a	10,00 ^a	20,00 ^b	80,00 ^b	320,00 ^c	160,00 ^d	73,33 ^c	50,00 ^c
	SD	0,00	0,00	0,00	39,32	260,91	87,63	46,76	24,50

Objaśnienia: a, b, c, d – średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

Tab. 2. Wartości OD surowic oznaczone testem ELISA (n = 6)

Grupa		Dni po szczepieniu							
		0	7	14	21	28	35	42	50
A	\bar{x}	0,102 ^a	0,118 ^a	0,115 ^a	0,122 ^a	0,128 ^a	0,141 ^a	0,123 ^a	0,125 ^a
	SD	0,017	0,028	0,029	0,018	0,015	0,025	0,013	0,017
B	\bar{x}	0,099 ^a	0,166 ^b	0,259 ^b	0,260 ^b	0,217 ^b	0,160 ^a	0,132 ^a	0,113 ^a
	SD	0,016	0,055	0,122	0,098	0,110	0,041	0,031	0,012
C	\bar{x}	0,113 ^a	0,122 ^a	0,135 ^a	0,294 ^b	0,312 ^c	0,345 ^b	0,278 ^b	0,173 ^b
	SD	0,013	0,019	0,021	0,202	0,342	0,416	0,239	0,047
D	\bar{x}	0,106 ^a	0,109 ^a	0,134 ^a	0,277 ^b	0,985 ^d	0,931 ^c	0,765 ^c	0,777 ^c
	SD	0,014	0,020	0,020	0,212	0,388	0,549	0,471	0,293

Objaśnienia: jak w tab. 1.

Tab. 3. Liczba białych ciałek krwi (WBC) w 1 μ l krwi (n = 6)

Grupa		Dni po szczepieniu									
		0	7	14	21	22	24	28	35	42	50
A	\bar{x}	14 300	14 100	12 933	11 766	14 600	13 600	15 566	15 433	12 966	14 166
	SD	2600	2117	1106	709	2352	3161	1041	3456	2421	1328
B	\bar{x}	12 433	13 500	20 367	21 467	15 300	16 167	14 567	14 600	12 667	14 233
	SD	3066	1778	4500	1650	889	5422	1721	2696	802	808
C	\bar{x}	11 900	12 500	15 000	17 367	16 700	13 533	14 200	13 933	11 900	12 167
	SD	1400	2234	1572	2887	3606	1193	2030	4336	2207	1270
D	\bar{x}	12 567	13 267	13 367	18 800	30 300	32 167	26 333	14 867	13 833	12 100
	SD	808	971	603	1735	3000	3635	6227	1401	2887	1539

W badaniach własnych wykazano, że ich średnie wartości u gołębi grup (A-D) przed rozpoczęciem doświadczenia mieściły się w przedziale 16,7-35,8% w leukogramie i były zgodne z publikowanymi wartościami (22), lecz odbiegały znacznie od wartości podanych przez Dorrensteina (5). Już po 7 i 14 dniach od podania szczepionki żywej Zoosal T (grupa B) w porównaniu do pozostałych grup gołębi zaobserwowano znaczny wzrost odsetka heterofilów (śr. ok. 35%). W grupie C nie odnotowano zmian w odsetku heterofilów. Natomiast w grupie gołębi dwukrotnie immunizowanych szczepionką własną (grupa D) w 24 i 72 godziny po szczepieniu przypominającym zaobserwowano wyraźny wzrost odsetka heterofilów do wartości, odpowiednio, śr. 66,3% i 58,7% (tab. 4).

Test hamowania migracji leukocytów (LMI). O potencjale immunogennym szczepionki świadczy wysokość mian przeciwciał, ale skuteczny preparat powinien

Tab. 4. Odsetek (%) heterofilów (n = 6)

Grupa		Dni po szczepieniu									
		0	7	14	21	22	24	28	35	42	50
A	\bar{x}	17,6 ^a	19,2 ^a	17,8 ^a	20,7 ^a	23,3 ^a	22,0 ^a	20,0 ^b	20,5 ^a	17,7 ^a	21,6 ^a
	SD	3,5	4,3	3,3	2,3	3,8	4,4	6,6	5,9	1,6	3,7
B	\bar{x}	21,3 ^b	35,0 ^b	35,8 ^b	22,0 ^a	19,2 ^a	19,0 ^a	16,7 ^a	19,3 ^a	22,7 ^b	17,7 ^a
	SD	4,4	2,0	3,3	4,4	2,5	1,0	2,5	1,5	3,1	1,5
C	\bar{x}	21,7 ^b	18,0 ^a	21,7 ^a	22,2 ^a	23,3 ^a	22,3 ^a	24,8 ^b	25,7 ^b	20,7 ^{ab}	21,7 ^a
	SD	1,5	1,0	3,5	4,6	2,3	6,8	6,9	5,8	1,2	5,5
D	\bar{x}	18,0 ^b	20,7 ^a	21,3 ^a	24,0 ^b	66,3 ^b	58,7 ^b	25,3 ^b	23,0 ^{ab}	18,0 ^a	18,0 ^a
	SD	6,6	3,2	1,2	3,6	4,0	9,5	4,5	3,0	1,0	5,0

Objaśnienia: a, b – średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

Tab. 5. Średnie wartości testu LMI krwi obwodowej gołębi grup doświadczalnych i kontroli

Dni	Grupy				Istotność różnic pomiędzy średnimi dla grup					
	A	B	C	D	A-B	A-C	A-D	B-C	B-D	C-D
0*	5,0	5,0	5,0	5,0	-	-	-	-	-	-
7	5,0	5,0	5,0	5,0	-	-	-	-	-	-
10	5,8	5,0	7,0	7,0	-	+	+	+	+	-
14	6,0	32,0	11,0	11,5	++	++	++	++	++	-
21**	5,5	24,0	11,0	12,0	++	++	++	++	++	-
22	-	-	-	39,0						
24	-	-	-	76,0						
28	7,0	5,0	26,0	22,5	+	++	++	++	++	-
35	6,5	5,0	20,3	21,9	-	++	++	++	++	-
42	6,3	5,0	0,8	17,2	-	++	++	++	++	++
50	5,8	5,0	0,6	10,0	-	++	++	++	++	++

Objaśnienia: * – próba zerowa wykonana przed szczepieniem, ** – rewakcyjnacja szczepionką własną 21. dnia w grupie D, + – istotność różnic pomiędzy grupami ($p \leq 0,05$), ++ – istotność różnic pomiędzy grupami ($p \leq 0,01$)

indukować także odpowiedź komórkową. W immunoprofilaktyce salmonellozy odpowiedź ta pełni funkcje bariery immunologicznej, dlatego jej rola powinna być uwzględniona w ocenie właściwości immunogennych szczepionek. W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych odnoszących się do oceny poszczepiennej lub zakaźnej reakcji komórkowej związanej z oddziaływaniem antygenów *Salmonella* na gołębie. Publikacje przedstawiają jedynie wyniki badania właściwości protekcyjnych szczepionek w zakażeniu kontrolnym (test *challenge*) (9, 27, 28). Obecnie do oceny stanu odporności komórkowej immunizowanych zwierząt wykorzystywana jest cytometria przepływowa. Znane są liczne publikacje z zastosowaniem metody cytometrii przepływowej do monitorowania odpowiedzi komórkowej kur (2, 3). Ze względu na niedostępność specyficznych gatunkowo przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko limfocytom gołębiom, w badaniach odpowiedzi komórkowej metodą cytometrii wykorzystywane są obcogatunkowe „kurze” przeciwciała monoklonalne (7, 25). Dlatego w badaniach własnych do oceny reakcji komórkowej gołębi immunizowanych szczepionką własną zastosowano metodę hamowania migracji leukocytów (test LMI). Zjawisko hamowania migracji makrofagów oraz leukocytów było w przeszłości wykorzystywane do oceny komórkowych reakcji po

immunizacji szczepionkami wirusowymi, grzybiczymi i bakteryjnymi (14, 17, 30, 33). Test hamowania migracji leukocytów (LMI) ocenia zdolność leukocytów do produkcji pod wpływem mitogenu lub antygeny cytokin hamujących migrację komórek fagocytujących (makrofagi, granulocyty).

W badaniach własnych wykazano, że leukocyty gołębi immunizowanych szczepionkami przeciwko salmonellozie stymulowane białkiem antygeny *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen, uzyskanym z izolatu własnego (66-03), reagują zahamowaniem migracji w teście *in vitro*. Odpowiedź komórkowa najwcześniej występowała w 14. dniu w grupie gołębi immunizowanych szczepionką żywą Zoosal T, osiągając najwyższe hamowanie migracji leukocytów wynoszące 32%, po czym wartości te ulegały stopniowemu obniżaniu. Po podaniu szczepionki własnej w dawce jednorazowej, 26% hamowania migracji wystąpiło dopiero 28. dnia i stopniowo obniżało się. Najwyższy odsetek hamowania migracji leukocytów wystąpił u gołębi rewakcyjowanych własną bakteryną w 3. dniu po rewakcyjnacji i wyniósł 76% (tab. 5). Należy nadmienić, że wyraźne hamowanie migracji komórek wystąpiło już w 24 godziny po rewakcyjnacji i wynosiło 39%. Rewakcyjnacja własną szczepionką wywoływała najsilniejsze i długotrwałe reakcje hamowania migracji leukocytów

świadczące o aktywacji mechanizmów komórkowych po immunizacji gołębi.

Badania wykazały zależność pomiędzy okresami pojawiania się odpowiedzi immunologicznej ocenianej testami aglutynacji probówkowej i ELISA oraz testem LMI.

Po immunizacji szczepionką Zoosal T, kiedy odpowiedź komórkowa mierzona testem LMI pojawiła się 14. dnia i wynosiła 32% hamowania, zauważono również znaczący wzrost mian przeciwciał w teście aglutynacyjnym (70,00) oraz podwyższone wartości OD w teście ELISA (0,259). Po jednokrotnym podaniu szczepionki eksperymentalnej miana przeciwciał aglutynacyjnych w 21. dniu doświadczenia uległy wyraźnemu podwyższeniu (93,33) podobnie jak OD w teście ELISA, które wzrastało do 35. dnia i osiągnęło wartość 0,345. Również 28. dnia hamowanie migracji leukocytów osiągnęło najwyższą wartość (26% hamowania), co w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie B świadczy o wolniejszym narastaniu reakcji immunologicznych po jednokrotnej immunizacji. W 7 dni po szczepieniu przypominającym bakterią własną miana przeciwciał aglutynacyjnych znacznie wzrosły (320,00). Podobne kierunki zmienności zaobserwowano w teście ELISA. Wysokie wartości OD pojawiły się 7. dnia po rewakcytacji (0,985) i utrzymywały się przez kolejne dni doświadczenia (28 dni po rewakcytacji OD = 0,931). Natomiast odpowiedź komórkowa pojawiła się już po 24 godzinach po rewakcytacji (39% hamowania) i narastała bardzo szybko, osiągając 76% hamowania w trzecim dniu. Później następował powolny spadek, ale w dalszym ciągu (2 tygodnie po szczepieniu przypominającym) wartości wynosiły 22% hamowania (tab. 1, 2, 5).

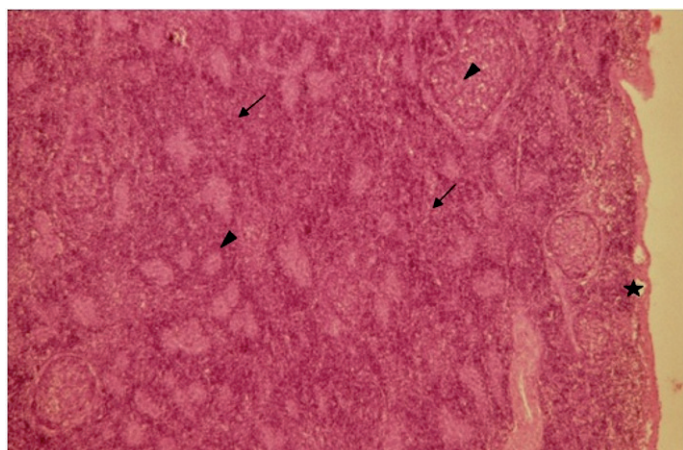
Uzyskany wysoki procent hamowania migracji (76%) w 3. dniu po rewakcytacji potwierdza skuteczność eksperymentalnej szczepionki w pobudzaniu odpowiedzi komórkowej. Badania własne przeprowadzone na gołębiach mają charakter pionierski. W dostępnym piśmiennictwie brak jest informacji związanych z powyższą tematyką. Jedynie Nagaraja i wsp. (17) opisali wyniki testu hamowania migracji leukocytów u kurcząt

zakażonych *S. Typhimurium*. Autorzy ci wykazali wysoki stopień hamowania migracji u tych ptaków.

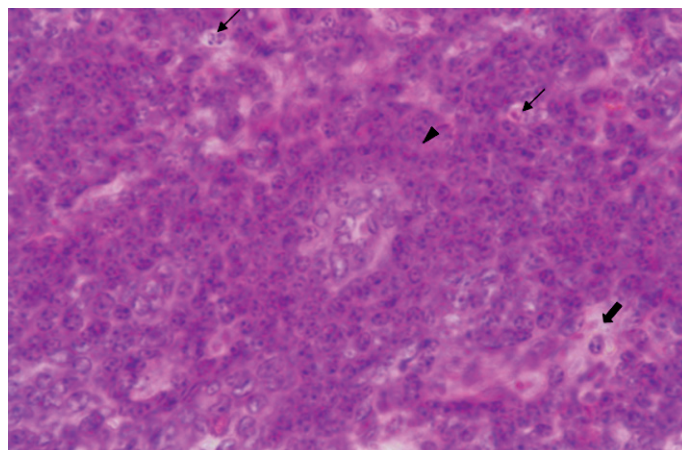
Aktualne publikacje przedstawiają natomiast wyniki badań oceniające parametry odpowiedzi komórkowej gołębi metodą cytometrii przepływowej. Dudek i Bednarek (8) oceniając te parametry po dożylnym podaniu endotoksyny *E. coli*, wykazali procentowy wzrost limfocytów T CD3+, Th CD4+ i Tc CD8+. Z kolei Stenzel i wsp. (25) badali reakcję subpopulacji limfocytów T CD4+ i CD8+. Immunizowali gołębie inaktywowaną szczepionką PM -VAC oraz podawali metizoprinol (immnomodulator). Uzyskane wyniki określili jako trudne do oceny ilościowej ze względu na wykorzystanie w badaniach przeciwciał mysich skierowanych przeciwko limfocytom kurzym (ze względu na nieosiągalność przeciwciał gatunkowo specyficznych dla gołębi).

Zmiany histologiczne w śledzionie. Skrawki tkankowe śledzion gołębi kontrolnych (grupa A) otaczała cienka, delikatna torebka łącznotkankowa, a miąższ narządu, w równych proporcjach, stanowiły miąższ biały i miąższ czerwony (ryc. 1). Skrawki tkankowe śledzion gołębi z grupy doświadczałnej B i C nie wykazywały zmian histologicznych i miały podobną morfologię do gołębi pochodzących z grupy kontrolnej. Wyraźne zmiany zaobserwowano u ptaków rewakcyntowanych. Cechowały się one zwiększeniem zawartości miąższu czerwonego z nagromadzonymi elementami komórkowymi. Pochewki okołotętnicze uległy pogrubieniu a w obwodowym ich obszarze obserwowano namnażanie limfocytów oraz zwiększoną liczbę makrofagów (ryc. 2). W tym samym czasie (24 i 72 godziny po rewakcytacji) wystąpił również znaczący wzrost odsetka heterofilów (śr. 66,3% i 58,7%) oraz silne hamowanie migracji leukocytów (76%) co wskazuje na mobilizację układu immunologicznego.

Wprowadzenie do obrotu nowego immunologicznego produktu leczniczego poprzedzają wieloetapowe badania wstępne, przedkliniczne i kliniczne mające na celu wykazanie bezpieczeństwa stosowania oraz jego skuteczności dla gatunków docelowych. Własne obserwacje z przeprowadzonych badań laboratoryjnych



Ryc. 1. Zmiany histologiczne w śledzionie. Torebka łącznotkankowa (★), miąższ biały (▼) i miąższ czerwony (▲), pow. 100 ×



Ryc. 2. Zmiany histologiczne w śledzionie. Okołotętnicza pochewka limfatyczna (▼), podział limfocytów (▲) i makrofag (▼), pow. 1000 ×

i klinicznych wykazały, że zarówno jednorazowe, jak i dwukrotne podanie szczepionki gołębiom doświadczalnym nie wywoływało jakichkolwiek widocznych działań niepożądanych. Szczepionka własna zawierająca w swoim składzie inaktywowany homologiczny dla gołębi drobnoustrojów zarazek *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen i opracowany specjalny adiuwant okazała się w badaniach preparatem skutecznie pobudzającym humoralne i komórkowe mechanizmy odporności immunizowanych gołębi. Silna modulacja odpowiedzi immunologicznej u szczepionych ptaków wskazuje na skuteczną formułę inaktywowanego antygeny z adiuwantem z saponin żeń-szenia i karbomeru, co może być w przyszłości wykorzystane do szybkiego opracowania nowych szczepionek dla innych gatunków zwierząt.

Na uwagę zasługuje wykazanie wyraźnej serokonwersji przeciwciał badanych testem ELISA i odczytem aglutynacji już po pierwszej dawce szczepionki własnej oraz silnej reakcji anamnesticznej przeciwciał po podaniu drugiej dawki. Ma to istotne znaczenie dla uzyskania prawidłowej biernej naturalnej odporności. Wysoki poziom długo utrzymujących się przeciwciał poszczepiennych oraz znaczący wzrost odsetka hamowania migracji leukocytów po podaniu drugiej dawki szczepionki stwierdzony w teście LMI jednoznacznie uzasadnia celowość wykonywania rewakcytacji u gołębi, jako zabiegu warunkującego rozwinięcie się pełnej odporności przeciwko infekcji zarazkiem *Salmonella*.

W badaniach własnych wykazano, że szczepionka eksperymentalna oparta o izolat *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen, zawierająca karbomer i ekstrakt żeń-szenia (*Radix panax ginseng*), dwukrotnie podana gołębiom domowym indukuje wyższą odpowiedź humoralną oraz komórkową w porównaniu do szczepionki komercyjnej Zoosal T (podanej jednokrotnie).

Piśmiennictwo

1. *Abdolvahab F., Friendship R. M.*: A clinical field trial to evaluate the efficacy of vaccination in controlling *Salmonella* infection and the association of *Salmonella*-shedding and weight gain in pig. *Can. J. Vet. Res.* 2010, 74, 258-263.
2. *Babu U., Scott M., Myers M. J., Okanamura M., Gaines D., Yancy H. F., Lillehoj H., Heckert R. A., Raybourne R. B.*: Effects of live attenuated and killed *Salmonella* vaccine on T-lymphocyte mediated immunity in laying hens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2003, 91, 39-44.
3. *Berndt A., Methner U.*: Gamma/delta T-cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella* Typhimurium strains. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2001, 78, 143-161.
4. *Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y., Zychlinsky A.*: Neutrophil Extracellular Traps kill bacteria. *Science* 2004, 303, 1532-1535.
5. *Dorrenstein G. M., Van Sluis J., Zwart P., Vander Hage M.*: Patologia gołębi ze szczególnym uwzględnieniem chorób gołębi pocztowych. *Mat. Konf. Choroby gołębi i ptaków ozdobnych – diagnostyka i zwalczanie*. PTNW, Wrocław 1996.
6. *Duchatel J. P., Vindevoegel H.*: Premiers essais de vaccination de pigeons contre la paratyphose au moyen de vaccins inactives adjuvés aqueux. *Annal. Med. Vet.* 1996, 140, 161-163.
7. *Dudek K.*: Wpływ lipopolisacharydu na występowanie i przebieg gorączki, kształtowanie się tolerancji pirogenowej oraz wskaźniki immunologiczne i zapalne u gołębi. *Praca dokt., Akademia Rolnicza, Lublin 2007.*
8. *Dudek K., Bednarek D.*: Cellular immune response of pigeons in the conditions of endotoxin fever and pyrogenic tolerance. *Polish J. Vet. Sci.* 2011, 14, 127-133.
9. *Grund S., Selbitz H. J., Kutzer P., Springer S., Eichberg J.*: Zur Schutzimpfung gegen die Taubensalmonellose. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 1997, 110, 171-175.
10. Inspekcja Weterynaryjna, Główny Lekarz Weterynarii, Decyzja o wstrzymaniu w obrocie szczepionki Salmovir 21.01.2011 r.
11. *Kogut M. H., Hargis B. M., Corrier D. E., DeLoach J. R.*: The effect of 5-fluorouracil treatment of chicks: A cell depletion model for the study of avian polymorphonuclear leukocytes and natural host defenses. *Poult. Sci.* 1993, 72, 1873-1880.
12. *Kogut M. H., Iqbal M., He H., Philbin V., Kaiser P., Smith A.*: Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. *Dev. Comp. Immunol.* 2005, 29, 791-807.
13. *Kogut M. H., Rothwell L., Kaiser P.*: Differential Regulation of Cytokine Gene Expression by Avian Heterophils During Receptor-Mediated Phagocytosis of Opsonized and Nonopsonized *Salmonella* Enteritidis. *J. Interferon Cytokine Res.* 2003, 23, 319-327.
14. *Majer-Dziedzic B.*: Biologiczna i immunologiczna charakterystyka parwowirusa wyizolowanego z przypadku zakaźnego zapalenia żołądka i jelit psów. *Rozprawy Naukowe Akademii Rolniczej w Lublinie, Lublin 2002, z. 260.*
15. *Majer-Dziedzic B., Pochodyła M., Tokarzewski S., Pochodyła A.*: Izolacja szczepów *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen od padłych gołębi i ocena ich immunogenności. *Praca przyjeta do druku.*
16. *Mi-Hyoung Kim, Yun-Young Byon, Eun-Ju Ko, Jie-Young Song, Yeon-Sook Yun, Taekyun Shin, Hong-Gu Joo.*: Immunomodulatory Activity of Ginsan, a Polysaccharide of *Panax Ginseng*, on Dendritic Cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 2009, 13, 169-179.
17. *Nagaraja K. V., Newman J. A., Pomeroy B. S.*: Leukocyte migration inhibition in chickens inoculated with *Salmonella* typhimurium. *Am. J. Vet. Res.* 1982, 43, 916-918.
18. OIE Terrestrial Manual. Fowl typhoid and pullorum disease chapter 2.3.11. OIE Terrestrial Manual. 2008.
19. *Pochodyła A., Samorek-Salamonowicz E.*: Opracowanie testu ELISA przeznaczonego do monitorowania statusu immunologicznego gołębi immunizowanych szczepionkami przeciwko salmonellozie. *Konf. Nauk. pt.: Osiągnięcia w farmakoterapii i profilaktyce weterynaryjnych produktów leczniczych i dodatków paszowych*. Feodosia, Krym 15.05.2004.
20. *Proux K., Humbert F., Guittet M., Colin P., Bennejean G.*: Vaccination du pigeon contre *Salmonella* Typhimurium. *Avian Pathol.* 1998, 27, 161-167.
21. *Schmeer R., Weiss R., Krauss H., Raddei J.*: Differenzierte Serodiagnose der Salmonellose der Tauben durch Nachweis von IgG und IgM-Antikörpern mittels Enzymimmuntest. *Zbl. Vet. Med. B* 1983, 30, 415-422.
22. *Scope A., Filip T., Gabler C., Resch F.*: The influence of stress from transport and handling on hematologic and clinical chemistry blood parameters of racing pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Dis.* 2002, 46, 224-229.
23. *Singh B. R.*: *Salmonella* Vaccines for Animals and Birds and Their Future Perspective. *Open Vac. J.* 2009, 2, 100-112.
24. *Stenzel T., Tykałowski B., Śmialek M., Kwiatkowska-Stenzel A., Koncicki A.*: The effect of different doses of methisoprinol on the percentage of CD4+ and CD8+ T lymphocyte subpopulation and the antibody titers in pigeons immunised against PPMV-1. *Polish J. Vet. Sci.* 2011, 14, 367-371.
25. *Stenzel T., Mazur-Gonkowska B., Koncicki A.*: Wybrane parametry odporności nieswoistej u gołębi. *Konf. Nauk.: Aktualne problemy w patologii drobiu*. Wrocław 15-16.09.2006.
26. *Tran Thi Q. L., Sylvain Quessy, Letellier A., Desrosiers A., Boulianne M.*: Immune response following vaccination against *Salmonella* Enteritidis using 2 commercial bacterins in laying hens. *Can. J. Vet. Res.* 2010, 74, 185-192.
27. *Uytendaele E., Devriese L., Gevaert D., Ducatelle R., Nells J., Haesebrouck F.*: Protective effects of vaccines against experimental Salmonellosis in racing pigeons. *Vet. Rec.* 1991, 128, 152-153.
28. *Vereecken M., De Herdt P., Ducatelle R., Haesebrouck F.*: The effect of vaccination on the course of an experimental *Salmonella* Typhimurium infection in racing pigeons. *Avian Pathol.* 2000, 29, 465-471.
29. *Vogel C.*: *Antomie und Physiologie, Tauben*. Bechtermünz Verlag, Augsburg 1997.
30. *Wawrzukiewicz K., Ziółkowska G.*: Immunological response in guinea pigs and calves infected experimentally with *Trichophyton verrucosum*. *Mykosen* 1979, 22, 314-324.
31. *Withanage G. S. K., Wigley P., Kaiser P., Mastroen P., Brooks H., Powers C., Beal R., Barrow P., Maskell D., McConnell I.*: Cytokine and Chemokine Responses Associated with Clearance of a Primary *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium Infection in the Chicken and in Protective Immunity to Rechallenge. *Infection Immunity* 2005, 73, 5173-5182.
32. *Woodward M. J., Gattinby G., Breslin M. F., Corkish J. D., Houghton S.*: The efficacy of Salenvac, a *Salmonella* enterica subsp. *Enterica* serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine in laying chickens. *Avian Pathol.* 2002, 31, 383-392.
33. *Ziętek J.*: Charakterystyka szczepów parwowirusa wyizolowanych od psów i ocena ich immunogenności w aspekcie opracowania inaktywowanej szczepionki. *Praca dokt., Uniwersytet Przyrodniczy, Lublin 2010.*

Adres autora: prof. dr hab. Barbara Majer-Dziedzic, ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin; e-mail: barbara.dziedzic@up.lublin.pl