

# Wpływ enrofloksacyny, florfenikolu i ceftiofuru na poziom IgY w woreczku żółtkowym oraz surowicy kurcząt<sup>\*)</sup>

KLAUDIA CHRZĄSTEK, ALINA WIELICZKO

Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Otrzymano 24.04.2014

Zaakceptowano 02.06.2014

Chrząstek K., Wieliczko A.

## Influence of enrofloxacin, florfenicol, and ceftiofur on IgY in the yolk sac and serum in chicks

### Summary

Maternal antibodies (matAb) can protect avian embryos and young birds after hatching against vertically transmitted pathogens. In birds, maternal IgY in egg yolk is transferred across the yolk sac through the FcRY receptor to passively immunize chicks. High-affinity binding occurs at pH 6, and does not occur at pH greater than 8.0. This study aimed to evaluate the influence of enrofloxacin, florfenicol, and ceftiofur on maternal IgY concentration in the yolk sac and serum of newly hatched chicks. In this study 184 one-day-old chicks were administered enrofloxacin, florfenicol, or ceftiofur in recommended doses according to the currently recommended treatment schedule. The yolk sac and blood were collected daily from day 1 to day 5 (yolk sac) or 7 (blood) of the experiment. Then, the samples were subjected to radial immunodiffusion investigation. The experiment showed that the concentration of IgY in serum on day 3 after the administration of ceftiofur and florfenicol was higher than that in the control group or the enrofloxacin group. It was also shown that after enrofloxacin treatment the level of IgY was higher in the yolk sac on day 4 of the experiment and lower in serum on day 5 of the experiment compared with the corresponding levels of IgY in the ceftiofur and florfenicol groups. These results suggest that the administration of enrofloxacin, florfenicol, and ceftiofur might influence the efficiency of matAb transfer from the yolk sac to the bloodstream of chicks.

**Keywords:** enrofloxacin, florfenicol, ceftiofur, IgY, chicks

W okresie okołolęgowym układ odpornościowy ptaków nie jest jeszcze w pełni efektywny, stąd też pisklęta szczególnie narażone są na ekspozycję na różne patogeny znajdujące się w środowisku. Dodatkowo, w tym samym czasie oddziałuje na ptaki wiele czynników stresogennych (transport, nowe warunki środowiskowe), jak również stosowana często antybiotykoterapia. Zanim dojdzie do rozwoju w pełni efektywnej odporności czynnej, niezwykle ważną rolę odgrywają przeciwciała matczyne (mat Ig, mAb) (1, 14). Transfer przeciwciał matczynych u ptaków zachodzi w dwóch etapach. Wysokie miano przeciwciał w surowicy krwi noski tworzy gradient umożliwiający jednokierunkowe przemieszczanie IgY, na zasadzie endocytozy wzdłuż nabłonka pęcherzyków jajnikowych, po czym przeciwciała dostają się do białka lub żółtka jaj podczas oogenezy. W dalszym etapie, przy udziale receptorów dla fragmentów stałych immunoglobulin FcRn ( $n =$  neonatal), u ptaków nazywanych FcRY przeciwciała są wychwytywane i przemieszczane do krwiobiegu

rozwijającego zarodka (13, 17, 19, 21). Hamal i wsp. (7) wykazali, że ogólny poziom IgY w surowicy lub jaju może być bezpośrednim wskaźnikiem transferu matAb do krążenia pisklęcia, z oczekiwanym poziomem około 30%. Przekazywanie immunoglobulin do wnętrza jaj jest zatem proporcjonalne do poziomu przeciwciał obecnych w surowicy krwi noski, natomiast do krwiobiegu zarodka dostaje się około  $\frac{1}{3}$  ich ilości (2, 10). Tylko przeciwciała połączone za pomocą fragmentów stałych z receptorem FcRY ulegają transcytozie, a proces ten zależny jest od pH środowiska. Połączenie z receptorem błony woreczka żółtkowego jest najbardziej efektywne przy pH = 6 (naturalne pH żółtka jaj), natomiast w pH = 8 proces ten zostaje zahamowany (3, 21). Ilość przekazanych przeciwciał zależy od wielu innych czynników, zarówno indywidualnych matek (genetyka, wiek, poziom hormonów, stres, faza owulacji), jak i środowiskowych (dostępność białka, pora roku). Ilość matAb w woreczku żółtkowym koreluje pozytywnie z kondycją zdrowotną niosek, z kolei obecność matAb w krwiobiegu kurcząt

<sup>\*)</sup> Badania finansowane przez MNiSW w ramach grantu nr N N308594538.

zależy od masy ciała pisklęcia, jego metabolizmu, rozwoju, jak również od czynników wpływających na mechanizm receptorowego wychwytu matAb, w tym zmiany pH środowiska. Dodatkowo, wszelkie zakażenia bakteryjne notowane u piskląt w okresie okołolęgowym (głównie na tle *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp.) wywołujące zapalenie woreczka żółtkowego mają negatywny wpływ na resorpcję przeciwciał. Zakażenia te skutkują często procesem uogólnionym i w efekcie podwyższoną śmiertelnością, szczególnie w pierwszych dniach życia piskląt. Z tego względu w wielkotowarowej produkcji drobiarskiej chemioterapeutyki przeciwbakteryjne są szeroko stosowane już od 1.-2. dnia życia ptaków. W dostępnym piśmiennictwie brak jest opracowań na temat wpływu chemioterapeutyków, w tym enrofloksacyny, florfenikolu czy ceftiofuru na układ odpornościowy ptaków, szczególnie w odniesieniu do piskląt. Natomiast Ellakany i wsp. (4) wykazali, że podawanie enrofloksacyny w dawce przekraczającej 10-krotnie zalecaną zmniejsza liczbę limfocytów w krwi u dorosłych kur. Dodatkowo, zaobserwowano zmiany w strukturze bursy Fabrycjusza, szczególnie wyrażoną rozrzedzeniem oraz deplecją komórek bursalnych. Z kolei Tokarzewski (20) wykazał, że enrofloksacyna może negatywnie wpływać na poziom specyficznych przeciwciał IgY zarówno w surowicy kur, jak też w żółtku jaj pochodzących od niosek stymulowanych żywym szczepem *Salmonella* Enteritidis i leczonych przez 10 dni enrofloksacyną lub chloramfenikolem.

Celem badań było określenie wpływu wybranych chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych podawanych w okresie okołolęgowym (enrofloksacyna, florfenikol oraz ceftiofur) na poziom przeciwciał matczy-nych w woreczku żółtkowym oraz surowicy kurcząt.

### Materiał i metody

Jednodniowe kurczęta stad rodzicielskich Hubbard Flex, płci męskiej (w ilości 184 sztuk) zostały zakupione w komercyjnej wylęgarni i umieszczone w wiwarium Katedry Epizootologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych. Po wylęgu u ptaków użytych do doświadczeń nie wykonano żadnych szczepień profilaktycznych. Wszystkie doświadczenia wykonano w warunkach zgodnych z Ustawą z dnia 21 sierpnia 2007 r. o ochronie zwierząt (Dz. U. z 2003 r., Nr 106, poz. 1002), przy całodobowym dostępie do wody i paszy, za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu.

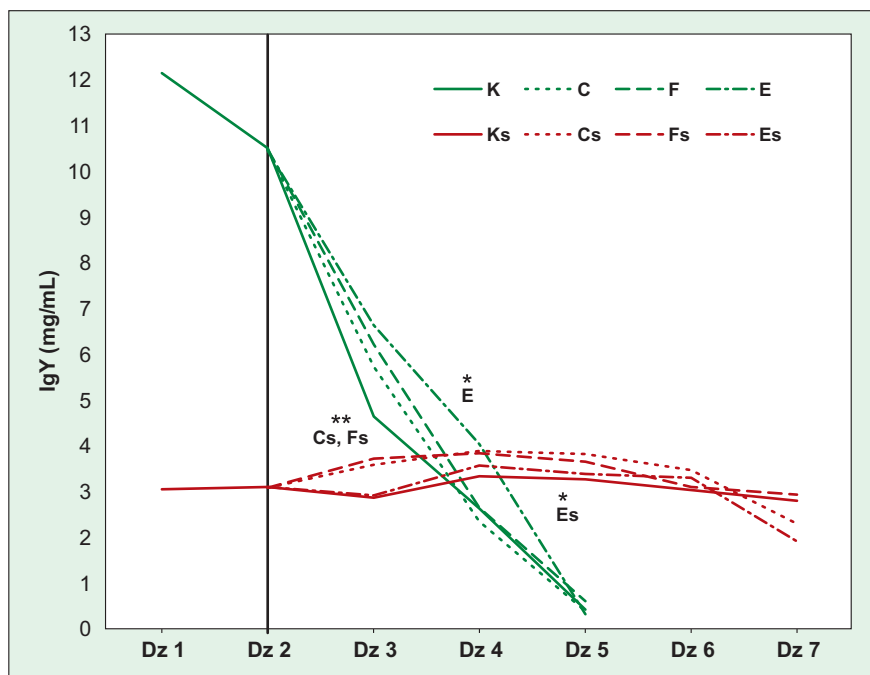
W pierwszej (DZ1) oraz drugiej (DZ2) dobie życia po 8 kurcząt poddano eutanazji, a krew oraz treść woreczka żółtkowego pobrano do dalszych analiz. Pozostałe 168 kurcząt w drugim dniu życia (DZ2) podzielono na cztery grupy doświadczalne, po 42 pisklęta w każdej: grupa E – kurczęta otrzymujące enrofloksacynę (Enrofloxan<sup>®</sup>, Biofaktor, Skierniewice, Poland) bezpośrednio do wola w dawce terapeutycznej 10,0 mg/kg m.c. począwszy od 2. dnia życia, przez 5 kolejnych dni, grupa F – kurczęta otrzymu-

jące florfenikol (Floron<sup>®</sup>, KRKA, Novo Mesto, Slovenia) w dawce 30 mg/kg m.c. bezpośrednio do wola począwszy od 2. dnia życia przez 5 kolejnych dni, grupa C – kurczęta otrzymujące ceftiofur (Cefur<sup>®</sup>, ScanVet, Skierszewe – Gdańsk, Poland) w dawce 2.0 mg ceftiofur sodium/kg m.c., grupa K – kontrolna, kurczęta nie otrzymujące żadnego z chemioterapeutyków, jedynie ekwiwalent wody do picia bezpośrednio do wola. Codziennie (w 2., 3., 4., 5., 6., 7. dniu życia) z każdej grupy (n = 7) kurczęta poddawano eutanazji, a krew pobierano do analiz. W przypadku woreczka żółtkowego pobieranie próbek, w związku z jego naturalną resorpcją, trwało do 5. dnia eksperymentu. Surowica oraz treść woreczka żółtkowego posłużyły do badań pozwalających określić stężenie przeciwciał IgY, które oznaczano w teście immunodifuzji radialnej wg Mancini i wsp. (12). Uzyskaną surowicę umieszczano w ilości 10 µg w żelu agarozowym zawierającym surowicę kozy anti-IgY kury. Natomiast zawartość woreczka żółtkowego rozcieńczano w stosunku 1 : 4 w PBS (pH = 7,2) i następnie umieszczano w ilości 10 µg w żelu agarozowym zawierającym surowicę kozy anti-IgG kury. Płytki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej, w komorze wilgotnej. Po tym czasie odczytywano średnicę pierścienia precypitacyjnego. Stężenie immunoglobulin oznaczano na podstawie porównania z krzywą standardową, utworzoną z IgG o stężeniu 1, 2 i 4 mg/ml (ChromPure chicken IgY (IgG), whole molecule, Jackson ImmunoResearch).

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej, wyliczając średnią i odchylenie standardowe, a istotność różnic między średnimi wartościami cechy dla grup oceniono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji i testu Dunca-na. Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą programu Statistica 10.0 (StatSoft Polska Sp. z o.o., Kraków, Polska).

### Wyniki i omówienie

Wartości średnie poziomu IgY w woreczku żółtkowym oraz surowicy kurcząt w poszczególnych grupach badanych przedstawiono na ryc. 1. W 3. dniu doświadczenia (DZ3) w surowicy kurcząt wykazano wyższy poziom IgY w grupie ptaków, którym podawano ceftiofur lub florfenikol, w porównaniu do grupy kontrolnej PBS ( $p \leq 0,001$ ) oraz grupy ptaków, którym podawano enrofloksacynę. Wyniki badań mogą sugerować, że w przypadku podaży ceftiofuru lub florfenikolu dochodzi do wcześniejszej resorpcji większej ilości matAb z woreczka żółtkowego do krwiobiegu piskląt niż ma to miejsce w pozostałych grupach (kontrolna, lub enrofloksacyna). Dodatkowo za potwierdzeniem tej hipotezy mogą przemawiać wyniki kolejnych dni. W 4. dniu doświadczenia (DZ4) wykazano wyższy poziom IgY w woreczku żółtkowym w grupie ptaków, którym podawano enrofloksacynę, w porównaniu do grupy ptaków, którym podawano florfenikol lub ceftiofur ( $p \leq 0,05$ ) oraz niższy poziom IgY ( $p \leq 0,05$ ) w surowicy w 5. dniu doświadczenia (DZ5) w grupie kurcząt otrzymujących enrofloksacynę również w porównaniu do grupy ptaków, którym podawano pozostałe antybiotyki. Natomiast w 7. dniu doświadczenia (DZ7) poziomy IgY we wszystkich gru-



Ryc. 1. Wartości średnie IgY w woreczku żółtkowym oraz surowicy kurcząt w poszczególnych grupach badanych

Objaśnienia: Dz – dzień doświadczenia, linia pionowa – dzień rozpoczęcia podawania chemioterapeutyków; K, C, F, E – średnie wartości poziomu IgY w woreczku żółtkowym w poszczególnych grupach badanych; Ks, Cs, Fs, Es – średnie wartości poziomu IgY w surowicy w poszczególnych grupach badanych; \*\* – różnica istotna statystycznie przy  $p \leq 0,001$ ; \* – różnica istotna statystycznie przy  $p \leq 0,05$

pach doświadczalnych kurcząt różniły się nieco między sobą, jednak różnice te nie były istotne statystycznie.

Z badań opublikowanych przez Tokarzewskiego (20) wynika, że podawanie chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych wpływa negatywnie na syntezę przeciwciał u niosek, natomiast w badaniach własnych wykazano, że może również zmieniać dynamikę resorpcji przeciwciał matczynych z woreczka żółtkowego kurcząt. Informacje te mogą mieć istotne znaczenie i zastosowanie w praktyce lekarsko-weterynaryjnej, szczególnie w przypadku prawidłowego wyboru terminu szczepienia kurcząt przeciwko chorobie Gumboro (2). Uwzględniając te informacje, można założyć, że poziom matAb w woreczku żółtkowym piskląt pochodzących od niosek wcześniej leczonych chemioterapeutykami przeciwbakteryjnymi jest niższy niż u kurcząt pochodzących od niosek nieleczonych. Ponadto, zastosowane we wczesnym okresie powylegowym chemioterapeutyki (np. florfenikol, ceftiofur czy enrofloksacyna) mogą zmieniać tempo wchłaniania przeciwciał z woreczka żółtkowego. Należy również podkreślić, że protekcja gwarantowana za pośrednictwem matAb jest zazwyczaj krótkotrwała, w związku z katabolizmem przeciwciał. U większości gatunków ptaków matczyne przeciwciała zanikają między 5.-14. a 21. dniem (specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko wirusowi choroby Gumboro), w porównaniu chociażby z ssakami, u których matAb występują dłużej, nawet do kilku miesięcy (5, 6, 8, 11, 18). Czas półtrwania matAb wynosi około 3-7 dni dla kurcząt,

około 2,2 dnia dla wróble i około 3,85 dnia dla papug (*Ara ararauna*) (15, 16). Kurczęta rozpoczynają syntezę endogennych przeciwciał 3-4 dni po wykluciu, jednakże nie są immunologicznie niezależne, dopóki wszystkie przeciwciała matczyne nie zostaną skatabolizowane z ich krwiobiegu (7, 9). Biorąc również pod uwagę powyższe, cytowane badania, można wysunąć hipotezę, że większa ilość matAb (a tym samym szybsze ich wchłonięcie do krwiobiegu) po podaży ceftiofuru lub florfenikolu w trzecim dniu życia kurcząt uległa następnie obniżeniu (w 7. dniu życia) w związku z ich naturalnym katabolizmem (okresem półtrwania), podczas gdy w grupie otrzymującej enrofloksacynę (jak i kontrolnej) resorpcja odbywała się na podobnym („stałym”) poziomie każdego dnia.

Reasumując, wyniki badań wskazują, że zastosowane chemioterapeutyki nie wpływają negatywnie na resorpcję przeciwciał matczynych u kurcząt, natomiast mogą zmieniać ich tempo wchłaniania. Florfenikol i ceftiofur w porównaniu z enrofloksacyną przyspieszają resorpcję przeciwciał w pierwszych dniach po ich podaniu.

## Piśmiennictwo

1. Ahmed Z., Akhter S.: Role of maternal antibodies in protection against infectious bursal disease in commercial broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 2003, 2, 251-255.
2. Al-Natour M. Q., Ward L. A., Saif Y. M., Stewart B., Keck L. D.: Effect of different levels of maternally derived antibodies on protection against infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 2004, 48, 177-182.
3. East L., Isacke C. M.: The mannose receptor family. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1572, 364-386.
4. Ellakany H. F., Abu El-Azm I. M., Bekhit A. A., Shehawy M. M.: Studies on the effects of enrofloxacin overdose on different health parameters in broiler chickens. *BS. Vet. Med. J., 5th Scientific Conference, 2007*, s. 176-186.
5. Grindstaff J. L., Brodie E. D., Ketterson E. D.: Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transfer. *Proc. R. Soc. B* 2003, 270, 2309-2319.
6. Grindstaff J., Hasselquist D., Nilsson J., Sandell M., Smith H. G., Stjernman M.: Transgenerational priming of immunity: maternal exposure to a bacterial antigen enhances offspring humoral immunity. *Proc. R. Soc. B* 2006, 273, 2551-2557.
7. Hamal K. R., Burgess S. C., Pevzner I. Y., Erf G. F.: Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poult. Sci.* 2006, 85, 1364-1372.
8. Hasselquist D., Nilsson J. A.: Maternal transfer of antibodies in vertebrates: trans-generational effects on offspring immunity. *Phil. Trans. R Soc B* 2009; 364, doi: 10.1098/rstb.2008.0137.
9. Lawrence E. C., Arnaudbattandier F., Grayson J., Koski I. R., Dooley N. J.: Ontogeny of humoral immune function in normal chickens – a comparison of immunoglobulin-secreting cells in bone-marrow, spleen, lungs and intestine. *Clin Exp Immunol* 1981, 43, 450-457.
10. Loeken M. R., Roth T. F.: Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. *Immunology* 1983, 49, 21-28.
11. Lozano G. A., Ydenberg R. C.: Transgenerational effects of maternal immune challenge in tree swallows (*Tachycineta bicolor*). *Can. J. Zool.* 2002, 80, 918-925.
12. Mancini G., Carbonara A. O., Heremans J. F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965, 2, 235-254.

13. *McCarthy K. M., Yoong Y., Simister N. E.*: Bidirectional transcytosis of IgG by the rat neonatal Fc receptor expressed in a rat kidney cell line: a system to study protein transport across epithelia. *J. Cell Sci.* 2000, 113, 1277-1285.
14. *Mondal S. P., Naqi S. A.*: Maternal antibody to infectious bronchitis virus: Its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2001, 79, 31-40.
15. *Nemeth N. M., Oesterle P. T., Bowen R. A.*: Am Passive Immunity to West Nile Virus Provides Limited Protection in a Common Passerine Species. *J. Trop. Med. Hyg.* 2008, 79, 283-290.
16. *Pihlaja M., Siitari H., Alatalo R. V.*: Maternal antibodies in a wild altricial bird: effects on offspring immunity, growth and survival. *J. Anim. Ecol.* 2006, 75, 1154-1164.
17. *Praetor A., Ellinger I., Hunziker W.*: Intracellular traffic of the MHC class I-like IgG Fc receptor, FcRn, expressed in epithelial MDCK cells. *J. Cell Sci.* 1999, 112, 2291-2299.
18. *Staszewski V., McCoy K. D., Tveraa T., Boulmier T.*: Interannual dynamics of antibody levels in naturally infected long-lived colonial birds. *Ecology* 2007, 88, 3183-3191.
19. *Tesar D. B., Tiangco N. E., Bjorkman P. J.*: Ligand valency affects transcytosis, recycling and intracellular trafficking mediated by the neonatal Fc receptor. *Traffic* 2006, 7, 1127-1142.
20. *Tokarzewski S.*: Influence of enrofloxacin and chloramphenicol on the level of IgY in serum and egg yolk after immunostimulation of hens with Salmonella Enteritidis antigens. *Pol. J. Vet. Sci.* 2002, 5, 151-158.2.
21. *West A. P., Herr A. B., Bjorkman P. J.*: The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog. *Immunity* 2004, 20, 601-610.

**Adres autora: prof. dr hab. Alina Wieliczko; pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław; e-mail: [alina.wieliczko@up.wroc.pl](mailto:alina.wieliczko@up.wroc.pl)**