

ZDZISŁAW LARSKI

Dwustopniowe doustne uodparnianie kurcząt przeciw chorobie Newcastle

Z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR-T w Olsztynie

Pojawienie się bardzo zjadliwych wiscerotropowych szczepów (VVND) wirusa rzekomego pomoru drobiu (choroby Newcastle) zmusza do poszukiwania metod szczepień zapewniających silniejszą i dłuższą trwającą odporność. Aktualne problemy immunoprofilaktyki tej choroby przedstawiono w osobnym artykule (5). Celem naszych badań jest określenie przydatności doustnego stosowania szczepu Roakin. Takie podanie go zapewnia solidną i długotrwałą odporność (4, 11), jednak mezogeniczny charakter szczepu powoduje, że kurczęta jeszcze w wieku 4 tygodni wykazywać mogą reakcje poszczepienne. Ponieważ odporność przekazana przez matkę trwa najwyżej 3 tygodnie i nie można dłużej zwlekać ze szczepieniem, wydało się celowym zastosowanie dwustopniowego szczepienia, pierwszego — lentogenicznym szczepem LaSota we wczesnym okresie i rewakcytacji mezogenicznym szczepem Roakin. Próby takiego uodparniania, wykonane przez Obreskova (8) u starszych ptaków (pierwsze szczepienie w wieku 50 dni) dały dobre efekty.

Materiał i metody

Kurczęta i kury. Do doświadczenia użyto ptaków w różnym wieku, rasy Sussex x karmazyn, New Hampshire x Sussex oraz karmazyn x leghorn.

Szczepy wirusa: a) lentogeniczny szczep LaSota stanowiła seria 390772 szczepionki „L”, produkcji PZPB Biowet w Puławach; b) mezogeniczny szczep Roakin stanowiła seria 30170 szczepionki „R” tego samego producenta; c) welogeniczny szczep „Italien”, używa-

ny do dotchawicowego zakażenia kontrolnego (challenge'u) o mianie $LD_{50} 10^{-8,5}$ otrzymano z Institut für Krankheiten des Haus- und Wildgeflügels der Ludwig Maximilian Universität w Monachium.

Uodparnianie ptaków wykonywano doustnie, podając szczepionkę „L” lub „R” rozcieńczoną w wodzie do picia w stosunku 1:750 w ilości około 15 ml na 1 kurczę.

Odczyn zahamowania hemaglutynacji do badania przeciwciał w surowicy i w żółtku jaj wykonywano metodą Beacha (1). W odczynie zubożenia badano surowicę, wypłuczynę tchawicy, przygotowaną przy użyciu 0,6 ml płynu fizjologicznego z antybiotykami 500 j. penicyliny i 1000 mcg streptomycyny, oraz wyciąg żółtka (1:5 z płynem fizjol.). Stosowano rozcieńczenia tych płynów przy stałej dawce 100 LD_{50} wirusa. Mieszaninami zakażano 10-dniowe zarodki. Miano oznaczano met. Reeda i Muencha. W tabelach przedstawiono je jako odwrotności rozcieńczeń.

Wyniki

Doświadczenie 1. Grupę 55 piskląt w wieku 10 dni (odczyn HI ujemny) uodporniono przez podanie im w wodzie do picia szczepionki „L” — grupa L_{10} . Po 32 dniach tj. w wieku 42 dni kurczęta podzielono na dwie grupy — 27 ptaków otrzymało powtórnie szczepionkę „L” — grupa $L_{10}+L_{42}$, a 28 pozostałych kurcząt również doustnie szczepionkę „R” — grupa $L_{10}+L_{42}$. Obie grupy trzymano oddzielnie, aby zapobiec transmisji wirusa szczepionkowego.

W określonych odstępach czasu pobierano od około 30% losowo wybranych ptaków obu grup krew do badania na obecność przeciwciał HI. Wyniki przedstawia tab. 1.

W 130 dni po rewakcytacji poddano po 6 ptaków obu grup zakażeniu kontrolnemu (challenge), wprowadzając dotchawicowo po 0,3 ml rozcieńczenia 10^{-3} szczepu „Italien”. Ptaki nie zareagowały klinicznie na zakażenie.

Tab. 1. Średnie geometryczne miana przeciwciał HI w surowicy

| Grupa | Szczepienie | | | | | | Zakażenie kontrolne | | |
|-----------------|-------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|---------------------|------------|-----------|
| | I | | II | | | | I | II | III |
| L_{10} | 0 | 6 (0—160) | 6 (0—80) | | | | | | |
| $L_{10}+L_{42}$ | | | | 8 (0—40) | 13 (0—40) | 2 (0—80) | 9 955! | 0 2800! | n.b. |
| $L_{10}+R_{12}$ | | | | 14 (0—40) | 8 (0—40) | 0 | 0 1096! | 0 1600! | 2 376! |
| Wiek w dniach | 10 | 26 | 42 | 48 | 56 | 81 | 172 | 194 | 257 |

Objaśnienia: wartości w nawiasach — rozpiętość mian; liczby z wykrzyknikiem — miano w 14 dni po zakażeniu kontrolnym; n.b. — nie badano.

Drugi challenge wykonano w 152 dni po rewakcytacji, zakażając po 6 dalszych ptaków z każdej grupy oraz dodatkowo 6 ptaków wrażliwych (kontrola challenge'u). Ptaki szczepione nie uległy zakażeniu, natomiast wszystkie kontrolne zachorowały i połowa z nich padła (stwierdzono typowe zmiany sekcyjne).

Po wykonaniu drugiego challenge'u i usunięciu kur do niego użytych pozostało 5 ptaków grupy $L_{10}+L_{42}$ i 9 grupy $L_{10}+L_{42}$. W dość długim okresie doświadczeń zredukowano bowiem ze względów technicznych liczbę kur a ponadto 4 ptaki grupy $L_{10}+L_{42}$ padły z przyczyn nie mających związku z prowadzonymi doświadczeniami.

W 210 dni po rewakcytacji poddano zakażeniu kontrolnemu 4 kury grupy $L_{10}+L_{42}$ oraz 4 kury wrażliwe (kontrola challenge'u), a pozostałe ptaki, po 5 z każdej grupy zabito i pobrano od nich krew i tchawicę w celu badania na obecność przeciwciał zobojętniających; w tym samym celu badano też żółtka zniesionych przez nie jaj.

Na challenge zareagowała 1 kura z grupy $L_{10}+L_{42}$ i wszystkie kontrolne. Poziom przeciwciał zobojętniających i HI przedstawia tab. 2.

Tab. 2. Średnie geometryczne miana przeciwciał zobojętniających wirus i hamujących hemaglutynację (HI) w 210 dni po rewakcytacji

| Grupa | Miano przeciwciał | | | | |
|-----------------|-------------------|-------------|----------------------|-----------|-------------|
| | zobojętniających | | | HI | |
| | suro-wica | żółtko jaja | wypłu-czyna tchawicy | suro-wica | żółtko jaja |
| $L_{10}+L_{42}$ | 15 | 15 | — | — | 1,5 |
| $L_{10}+R_{42}$ | 15 | 3 | — | — | 3 |

Doświadczenie 2. Grupę 29 piskląt w wieku 13 dni (odczyn HI ujemny) uodporniono doustnie szczepionką „L” — grupa L_{13} . W 15 dni po szczepieniu średnie geometryczne miano HI osiągnęło wartość 1:43. Następnie w wieku 42 dni, 15 tych ptaków rewakcyowano doustnie szczepionką „L” — grupa $L_{13}+L_{42}$ a pozostałe 14 kurcząt doustnie szczepionką „R” — grupa $L_{13}+R_{42}$. W 14 dni po rewakcytacji średnie geometryczne miano wyniosły w grupie $L_{13}+L_{42}$ — 1:19, a w grupie $L_{13}+R_{42}$ — 1:9.

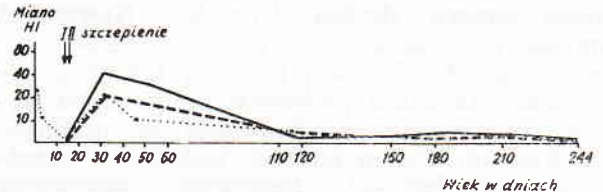
Doświadczenie 3. Użyto 150 piskląt rasy karmazyn x leghorn. W 1, 4 i 14 dniu życia skrawawiono po 5 ptaków i określono poziom przeciwciał HI w ich surowicy. W 14 dniu życia 105 kurcząt zaszczepiono doustnie szczepionką „L” i oznaczono je jako grupę L_{14} . Po określonych odstępach czasu — 2, 10 i 17 dni rewakcyowano po 15 ptaków z tej dużej grupy doustnie szczepionką „L” lub szczepionką „R” i uzyskano następujące grupy pochodne: $L_{14}+L_{16}$, $L_{14}+R_{16}$, $L_{14}+L_{24}$, $L_{14}+R_{24}$, $L_{14}+L_{31}$, $L_{14}+R_{31}$. Liczba przy symbolu L lub R oznacza wiek ptaka, w którym otrzymał doustnie szczepionkę „L” lub „R”. Ponadto kontrolę stanowiły następujące grupy po 15 kurcząt: L_{14} — ptaki nie rewakcywowane, L_{31} i R_{31} — ptaki szczepione tylko jeden raz szczepionką „L” lub „R” w 31 dniu życia.

W żadnej grupie nie obserwowano reakcji poszczepiennych. Po określonych odstępach badano poziom przeciwciał HI, który w postaci średnich geometrycznych mian przedstawiają ryc. 1—3.

Omówienie wyników

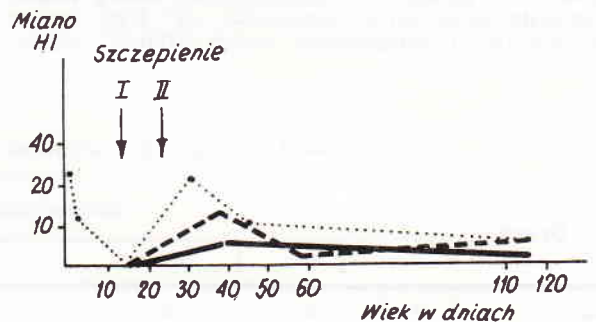
Przy pierwszej próbie dwustopniowego uodparniania, szczepionkę „L” podano w 10 dniu życia, to jest w najwcześniej do niedawna obowiązującym okresie, natomiast rewakcywowano szczepionką „R” w wieku 42 dni zgodnie z ogólnie przyjętymi zaleceniami dla sto-

sowania szczepionek mezogenicznych. Badania serologiczne nie wykazały różnic poziomu przeciwciał HI między ptakami obu grup. Miana nie tylko po pierwszym szczepieniu ale i po rewakcytacji były niższe od wymaganych przed kilku laty przy eksporcie brojlerów, kiedy to w badaniach własnych (12, 13) poziom przeciwciał po dwukrotnych szczepieniach szczepionką „L” kurcząt w 13—14 i 42 dniu życia, osiągał wartość około 1:200 i utrzymywał się na dość wysokim poziomie przez dłuższy czas.



Ryc. 1. Średnie geometryczne miana przeciwciał HI w surowicy kurcząt grupy $L_{14}+L_{16}$ (linia przerywana), $L_{14}+R_{16}$ (linia ciągła) i L_{14} (linia kropkowana). Liczby przy symbolach oznaczają tu i w następnych rycinach wiek w dniach, w którym podawano ptakom szczepionką „L” lub „R”

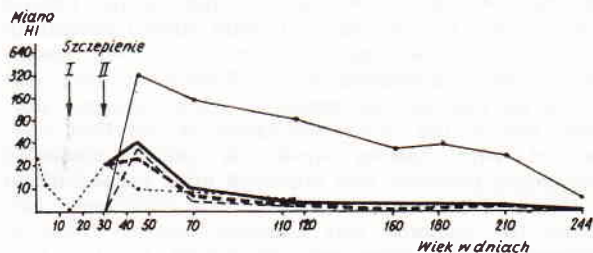
W tutaj opisanych doświadczeniach pierwsze szczepienie piskląt wykonano nieco wcześniej, bo już w 10 dniu życia, co mogło mieć pewien wpływ, gdyż pisklęta pochodziły od matek szczepionych a odporność bierna nabyta przez potomstwo wygasa u niego szybko, może jednak we wczesnym okresie życia hamować odpowiedź immunologiczną na pierwsze wprowadzenie szczepionki a nawet na rewakycjację (9). Niskie miano przeciwciał można też odnieść do właściwości samego szczepu. Na słabą produkcję przeciwciał HI po stosowaniu szczepionki „L” zwraca też ostatnio uwagę Karczewski (3).



Ryc. 2. Średnie geometryczne miana przeciwciał HI w surowicy kurcząt grupy $L_{14}+L_{24}$ (linia przerywana), $L_{14}+R_{24}$ (linia ciągła) i L_{14} (linia kropkowana)

Bezpośrednie badanie stanu immunologicznego przy pomocy zakażenia kontrolnego wykazało, że mimo bardzo niskiego miana przeciwciał HI a nawet ujemnego wyniku odczynu, ptaki wykazywały całkowitą odporność w 5

miesiący a częściową w 7 miesięcy po rewakcytacji. Znajduje to wyjaśnienie w obecności przeciwciał SN w surowicy i potwierdza większą miarodajność odczynu zobojętnienia dla określenia aktualnego stanu odporności. W 7 miesięcy po rewakcytacji kury przekazywać mogą przeciwciała w żółtku, natomiast nie wykazano już w tym okresie obecności przeciwciał odporności sekrecyjnej w wypłuczynach tchawicy.



Ryc. 3. Średnie geometryczne miano przeciwciał HI w surowicy kurcząt grupy $L_{14}+R_{81}$ (linia przerywana), $L_{14}+R_{81}$ (linia ciągła), L_{81} (linia przerywana cienka), R_{31} (linia ciągła cienka) i L_{14} (linia kropkowana)

Druga próba dwustopniowego uodpornienia miała na celu wyjaśnienie czy tak niskie, w porównaniu z uzyskiwanymi dawniej (12, 13), miana HI mogły być następstwem pierwszego szczepienia już w 10 dniu życia. Stwierdzono, że miano jest wyższe po podaniu szczepionki „L” pisklątom 13-dniowym, lecz po rewakcytacji zarówno szczepionką „L” jak i „R” miana odpowiadały tym, jakie uzyskano w poprzednim doświadczeniu.

Celem głównego doświadczenia była próba określenia optymalnego okresu doustnej rewakcytacji szczepionką „R” u kurcząt, które otrzymały po raz pierwszy szczepionkę „L” w 14 dniu życia. Szczepionkę „R” podawano w 16, 24 i 31 dniu życia. Uzasadnieniem dla tak wczesnego użycia szczepu mezogenicznego było to, że rewakcytacji następuje u piskląt co prawda młodszych, ale już częściowo chronionych. W wieku 16 dni osłonę tę stanowi interferencja w następstwie dwa dni przed tym podanej szczepionki „L” a w wieku 24 i 31 dni (to jest w 10 lub 17 dni po podaniu szczepionki „L”) chronią kurczę wytworzone już przeciwciała. Słuszność takiego założenia potwierdził brak jakichkolwiek reakcji poszczepiennych. Dane przedstawione na wykresach wskazują, że miana po rewakcytacji są dość niskie. Nieznaczna reakcja anamnesticzną stwierdzono po podaniu szczepionki „R” w 16 i 31 dniu życia. Na brak takiej reakcji po drugim a nawet trzecim podaniu szczepionki „L” wskazują też badania Karczewskiego (3). Natomiast po rewakcytacji zarówno szczepionką „R” jak i „L” w 24 dniu życia nie tylko nie wystąpił odczyn anamnesticzny, ale stwierdzono miano niższe niż u kurcząt szczepionych tylko jeden raz szczepionką „L” w 14 dniu życia. Takie zjawie-

sko hamującego wpływu pierwszego szczepienia wirusem choroby Newcastle na następne stwierdzili też Bankowski i Corstvet (cyt. za 3).

W badaniach własnych miarą tego hamowania jest 8-krotnie niższe miano HI u kurcząt rewakcykowanych szczepem Roakin w 31 dniu życia, niż u kurcząt szczepionych po raz pierwszy tym szczepem w tym samym wieku. Przy rewakcytacji szczepionką „L” hamowanie to jest znikome. Schulze-Rehm i wsp. (10) stosując dwukrotnie, w odstępie 10 tygodni, aerozole w szczepionce kurcząt ale tylko szczepami lentogenicznymi — LaSota i B_1 , stwierdzili, że u ptaków uodpornionych szczepionką B_1 , rewakcytacji szczepionką LaSota powoduje bardzo wyraźną reakcję anamnesticzną, natomiast przy odwrotnej kolejności szczepienia, po rewakcytacji szczepem B_1 reakcja ta jest bardzo słaba. Można by to tłumaczyć tym, że ten ostatni, słabszy immunogenie (w sensie produkcji przeciwciał HI) stanowi niedostateczny bodziec dla ptaków uodpornionych szczepem LaSota. Ponieważ w naszych badaniach nawet rewakcytacji mezogenicznym szczepem Roakin powodowała niezbyt wyraźny wzrost miana, być może, że szczep LaSota ma jakieś szczególne właściwości powodujące, że uodpornione nim ptaki reagują immunologicznie słabiej na inne szczepy wirusa choroby Newcastle. Trudne do wytłumaczenia są znaczne różnice reakcji i brak regularności przy niezbyt dużych różnicach czasu wykonania rewakcytacji w naszych badaniach. Być może, że w okresie rozwoju kompetencji immunologicznej występować mogą pewne anomalie, analogiczne do stwierdzonych u płodów świń i młodych prosiąt (7). Może to być związane ze szczególnymi właściwościami samego wirusa choroby Newcastle, u którego stwierdzono działanie hamujące produkcję przeciwciał *in vitro* (6) a także mechanizmy odporności komórkowej (14).

Dalsze prowadzone obecnie badania własne mają na celu znalezienie optymalnego ale zarazem jeszcze bezpiecznego okresu pierwszego szczepienia piskląt, ustalenie dawki wirusa, co u bardzo młodych kurcząt może mieć znaczenie (2) i określenie najwłaściwszego czasu rewakcytacji. Wpływ tego ostatniego, jak to wynika z omówionych już badań (10) może być zależny nie tylko od pary użytych szczepów ale nawet od kolejności ich podania.

Piśmiennictwo

1. Beach: J. Am. vet. med. Ass. 112, 85, 1948.
2. Bitto Y., Sawai M.: Bull. Univ. Osaka Pref. B. 25, 1, 1973, ref. Vet. Bull. Abstr. Nr 4433/1974.
3. Karczewski K.: Bull. vet. Inst. Puławy, 17, 15, 1973.
4. Kozicki J.: Streszczenie prac I Krajowego Sympozjum Wirusologicznego, 57, 1972.
5. Larski Z.: Med. Wet. (praca w druku).
6. Medzon E. L., Vas S. T.: Canad. J. Microbiol. 10, 535, 1964.
7. Menstik J., Pokorny J.: Zbl. Vet. Med. 18 B, 177, 1971.
8. Obreskov K.: Vet. Med. Nauki, Sof. 2, 365, 1965.
9. Rizk J., Chu H. P.: 4th Europ. Poul. Conf., London, 583, 1973.
10. Schulze-Rehm G., Monreal G., Kraft V.: Zbl. Vet. Med. 21 B, 489, 1974.
11. Włósniewski J.: Zesz. Nauk. ART w Olsztynie, Weterynaria 3, 3, 1974.

12. Wiśniewski J., Larski Z., Wolszczak J.: Pol. Arch. wet. 15, 1, 1972.
13. Wiśniewski J., Tomczyński R.: Medycyna Wet. 25, 197, 1969.
14. Woodruff J. F., Woodruff J. J.: Infect. Immun. 9, 969, 1974.

Adres autora: prof. dr Zdzisław Larski, 10-957 Olsztyn — Kortowo, bl. 37.

Лярски З. — Двухстепенная пероральная иммунизация цыплят против азиатской чумы птиц.

Результаты исследований представлены в таблицах и рисунках указывают средние геометрические титры антител HI (реакции задержки гемагглютинации) у птиц отдельных групп. Группы обозначены символами содержащими большие буквы и число указывающее день жизни в котором применяли с питьевой водой вакцину L (лентогенический штамм LaSota) или R (мезогенический штамм Roakin).

Установили, что даже у цыплят ревакцинированных на 16-ый день жизни мезогеническим штаммом Roakin не появлялись поствакцинальные реакции, вероятно в связи с профилактическим действием предварительной вакцинации штаммом LaSota. Незначительную анамнестическую реакцию наблюдали после ревакцинации на 16 и 31 день жизни. В этом последний срок реакция была

однако слабее чем у цыплят того же возраста привитых первый раз. Автор подчеркивает, что даже у птиц с низким титром HI или серологически отрицательным установили иммунитет на контрольное заражение вирулентным штаммом Italien. Результаты обсуждены.

Larski, Z. — The two-stage immunization of chickens against Newcastle Disease.

The results presented in tables and figures show the geometric mean titers of HI antibodies in birds of separate groups. They were marked with symbols consisting of capital letters and numbers indicating the day of life at which "L" (lentogenic LaSota strain) resp. "R" (mesogenic Roakin strain) vaccine in drinking water was given. Even in chickens revaccinated with mesogenic strain Roakin at 16th day of life no postvaccinal reactions were observed probably due to the protective effect of the first vaccination with LaSota strain. A rather moderate anamnestic response was observed after revaccination at 16th and 31th day of life. In this latter case, however, the response was markedly weaker than in chickens of the same age vaccinated for the first time. In spite of a very low HI titer and even in HI negative birds the immunity to the challenge with virulent „Italien” strain was found. The obtained results have been discussed.

MAREK HOUSZKA, MICHAŁ MAZURKIEWICZ, ZENON WACHNIK

Zaćma u kur w zakaźnym zapaleniu mózgu i rdzenia (AE)

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR we Wrocławiu

Różnicowe diagnozowanie chorób zakaźnych układu nerwowego u drobiu napotyka na znaczne trudności i to nie tylko w badaniu klinicznym, lecz również w badaniu anatomopatologicznym.

Zakaźne zapalenie mózgu i rdzenia kur (AE) nie wywołuje w zasadzie zmian makroskopowych w mózgu i narządach wewnętrznych ptaków. Natomiast mikroskopowo obserwuje się namnożenie komórek mikrogleju, nacieki okołonaczyniowe w mózgu i chromatolizę neuronów. Zmiany te są zbliżone do występujących w chorobie Mareka i pomorze rzekomym (AP). Co raz bardziej wnikliwe obserwacje pozwalają jednak na ustalenie lokalizacji i pewnych różnic w charakterze zmian u ptaków w poszczególnych jednostkach chorobowych.

Cechami patognomicznymi AE w obrębie układu nerwowego jest chromatoliza neuronów jąder rdzenia przedłużonego i mostu oraz namnożenie komórek glejowych w *nucleus ovoidalis* i *nucleus rotundus* (8). Natomiast obserwowane u ptaków chorych na AE i AP namnożenie komórek glejowych w warstwie drobino-

wej mózdzku nie występuje w chorobie Mareka. Pozostałe zmiany jak *gliosis* i nacieki okołonaczyniowe w *nucleus cerebellaris*, *lobus opticus* czy *corpus striatum* występują we wszystkich trzech jednostkach, a ich większe nasilenie przy AE ma raczej charakter różnicy ilościowej niż jakościowej. Ze zmian występujących w innych narządach na uwagę zasługują charakterystyczne dla AE limfoidalne nacieki w warstwie mięśniowej żołądka gruczołowego. Mniejsze znaczenie diagnostyczne mają natomiast podobne nacieki w trzustce. Wielu autorów zwraca również uwagę, że zakaźnemu zapaleniu mózgu i rdzenia towarzyszą często zmiany o charakterze zaćmy w soczewce oka.

Opisywany przez nas przypadek dotyczył stada liczącego ponad 400 3 miesięcznych kogutów rasy Cornish, w którym około 30% ptaków wykazywało objawy zaćmy. Proces chorobowy rozwijał się stopniowo przez okres kilku tygodni, a procent utraty wzroku u poszczególnych ptaków był bardzo zróżnicowany. Na podstawie przeprowadzonego wywiadu ustalono, że ptaki chorowały w okresie pierwszych tygodni życia z objawami odpowiadającymi zakaźnemu zapaleniu mózgu i rdzenia.