

Szczepienia *in ovo* – nową techniką immunizacji drobiu

WANDA BARBARA BORZEMSKA, PIOTR SZELESZCZUK

Zakład Chorób Ptaków Katedry Epizootiologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Borzemska W. B., Szeleszczuk P.

The *in-ovo* vaccination – a new technique for poultry immunization

Summary

Sharma et al. were the first authors who found that immunizing 17-19 day old chicken embryos with HVT virus might induce an active immunity against Marek's disease. This postulate has formed the base for the development of a new technique for immunization of birds at the final period of embryogenesis. Immunization of embryos has enabled the vaccines to be administered before the transfer of maternal antibodies from the yolk sac to blood stream. In 1984 Sharma and Burmester received a patent for a new *in-ovo* technique, and the American company, Embrex, in 1989 an auto-system of INVOJECT® which, initially, had a capacity of 30.000 and now has increased to 60.00 injections/hour. First, the *in-ovo* method was used as a prophylactic against Marek's disease but it appeared that this method could also be used for other antigens. In practice it had already been used as a vaccine and apart from a relatively virulent Gumboro disease virus also contained a so called virus neutralizing factor (VNF) – the serum of birds hyperimmunized against Gumboro disease virus.

Up to now, the method of *in-ovo* vaccinations against infectious tracheitis is in the experimental phase. Presently, the least amount of information is known about the immunization of embryos against Newcastle disease. Vaccinating by using strains of a live Newcastle virus is dangerous. Even a mildly lentogenic strain of B1-Hitchner is extremely highly pathogenic for 18-day old embryos. At present studies are being conducted on the preparation of new vaccines, mainly intranasal, for the *in-ovo* technique.

Keywords: vaccines, poultry, immunization.

Wśród rozmaitych technik stosowanych do masowych szczepień drobiu, największe zastosowanie znalazły sposoby podawania szczepionek z wodą do picia lub w aerozolu. Najbardziej kłopotliwa domięśniowa metoda immunizacji przeciwko chorobie Mareka, w której szczepienie musi być przeprowadzone w pierwszym dniu życia piskląt, doprowadziła nawet do konstrukcji półautomatów, które usprawniają ten zabieg.

Obecnie powszechnie stosowane w drobiarstwie programy profilaktyczne zakładają, że przez szczepienie stad rodzicielskich osiąga się możliwie najwyższy poziom odporności biernej u potomstwa. Daje to gwarancję, że pisklęta w okresie powylęgowym będą w pełni zabezpieczone przed skutkami wczesnych zakażeń. Przeciwciała matczyne hamują jednak uzyskanie pełnej odporności poszczepiennej. Współczesna nauka stanęła zatem przed problemem wypracowania skutecznych zasad czynnej immunizacji u ptaków młodych.

Sharma i wsp. (25) jako pierwsi zwrócili uwagę, że po podaniu wirusa HVT (Herpesvirus of turkeys) ist-

nieje możliwość wytworzenia odporności czynnej już przez 17-19 dniowe embriony kurcze. Dało to podstawę do opracowania nowej techniki podawania szczepionek w końcowym etapie embriogenezy ptaków. Immunizacja zarodków pozwala na zastosowanie szczepionki przed przedostaniem się przeciwciał matczynych z woreczka żółtkowego do krwiobiegu. Jakkolwiek przeciwciała te zaczynają przenikać do układu krążenia zarodka już 12-14 dnia inkubacji, to jednak poziom ich gwałtownie wzrasta dopiero w okresie okołolęgowym. Osiągają one maksymalną koncentrację w 2 dobie po opuszczeniu skorupy, tj. w okresie kiedy przypada szczepienie przeciwko chorobie Mareka (27). Wyjaśnia to wszystkie dotychczasowe niepowodzenia wczesnej immunizacji przeciwko tej chorobie.

Początkowo metoda *in ovo* została zastosowana w profilaktyce choroby Mareka (17, 19, 25, 28), wkrótce okazało się jednak, że równie skutecznie może być ona zastosowana dla innych antygenów (1, 20, 21, 30). W 1984 r. Sharma i Burmester (26) opatentowali metodę *in ovo*, a amerykańska firma Embrex przedstawi-

ła w 1989 r. skonstruowanego przez siebie robota – system „INOVOJECT®”, o wydajności początkowo 30 000, a obecnie już 60 000 iniekcji na godzinę (3, 4, 17). Według wymienionych autorów opracowana technika zapewnia bezpieczeństwo wykonywanego zabiegu dla zarodka oraz umożliwia zachowanie jałowości zabiegu przez automatyczne odkażanie igły po każdej iniekcji. Ponadto nie zakłóca się procesu inkubacji, wykorzystując na szczepienie czas przeznaczony na przekład jaj z komory lęgowej do klujnikowej, która to czynność jest przewidziana technologią lęgu. Z ekonomicznego punktu widzenia wadą tej metody jest, jak na razie, możliwość wykorzystania jej wyłącznie w dużych zakładach wylęgowych o pełnej automatyzacji. Ponadto w lęgach przeznaczonych do seksowania nie ma możliwości ominięcia szczepienia kogutów.

Z badań własnych przeprowadzonych wcześniej (5, 6, 7, 8) wynika, że przy zastosowaniu tradycyjnych szczepionek i rutynowych sposobów inokulacji do jaja, straty w lęgach były najwyższe przy szczepionkach przeciwko chorobie Mareka (7, 8). Nie notowano natomiast zwiększonej śmiertelności zarodków po podaniu szczepu S-706 wirusa choroby Gumboro (6).

Dotychczas w praktyce weterynaryjnej stosuje się metodę *in ovo* głównie do szczepień przeciwko chorobie Mareka (2, 3, 10, 11, 15, 17) i zakaźnemu zapaleniu torby Fabrycjusza (3, 12-14, 33, 34). Niezależnie od osiągnięć praktycznych Sharma (20) oraz Stone i wsp. (29) próbowali zastosować metodę *in ovo* dla szczepionek skojarzonych przeciwko chorobie Mareka i chorobie Gumboro, a także przeciwko rzekomemu pomorowi drobiu i influencji ptaków. Aktualnie trwają badania nad opracowaniem nowych szczepionek, specjalnie dostosowanych do metody *in ovo* (2, 4, 13).

Szczepienie metodą *in ovo* w immunoprofilaktyce choroby Mareka

Pojawienie się wysoce zjadliwych szczepów wirusa choroby Mareka (vvMDV) u brojlerów spowodowało konieczność jak najwcześniejszego ich zabezpieczenia przed wczesnymi zakażeniami vvMDV. W pierwszych badaniach Sharma i wsp. (25, 27) wykazali, że podanie indyczego herpeswirusa (HVT) zarodkom kurzym SPF zabezpieczyło 80-93% ptaków przed kontrolnym zakażeniem zjadliwym szczepem JM choroby Mareka. Uzyskano wówczas wyższy stopień zabezpieczenia niż przy tradycyjnej metodzie immunizacji.

Wykazano także, że zastosowanie do uodpornienia metodą *in ovo* szczepionki zawierającej wirus związany z komórką zapewnia, podobnie jak w iniekcji domięśniowej u piskląt, lepszą ochronę immunologiczną niż podanie wirusa pozbawionego osłony komórkowej (27). W dalszej pracy Sharma (23) wykazał, że podanie samego wirusa choroby Mareka 18 dniowym embrionom opóźnia jego namnażanie. Z innych badań Sharmy (22) wynikało, że po podaniu wirusa HVT



Ryc. 1. Robot INOVOJECT® (Za zgodą firmy Embrex Europe)

17 dniowym embrionom najintensywniej namnażał się on w płucach zarodka. Było to niewątpliwie zaskoczeniem, ponieważ w porównaniu do metody tradycyjnej pierwotnym miejscem replikacji wirusa jest śledziona (28). Mimo braku zmian makroskopowych i histopatologicznych w płucach udało się wykazać obecność antygeny wirusowego w komórkach podobnych do fibroblastów lub komórkach epitelialnych. Najbardziej interesujące jest jednak stwierdzenie, że wczesna replikacja wirusa nie odbywa się u zarodków ani w komórkach limfoidalnych, ani w makrofagach (22).

Rola interferonu u zarodków szczepionych przeciwko chorobie Mareka metodą *in ovo* nie jest całkowicie jasna. Według kolejnych badań Sharmy (24) poziom interferonu w płucach embrionów 18 dniowych uodpornianych wirusem HVT był wyższy w porównaniu do szczepionych tym szczepem piskląt. U embrionów stwierdzono wzrost jego aktywności nie tylko po szczepie HVT, lecz także po podaniu wirusa choroby Mareka, pomimo że wirus ten nie namnaża się w płucach.

Ostatnio Sarma i wsp. (18) w warunkach terenowych dokonali oceny porównawczej skuteczności szczepionki biwalentnej zawierającej serotyp 2 (szczep SB-1) wirusa choroby Mareka i szczep HVT (FC-126). Szczepiono domięśniowo pisklęta jednodniowe oraz 17,5-18,5 dniowe zarodki. Autorzy ci wykazali obniżenie wylęgu o około 0,5%, przy niższym brakowaniu piskląt po wykluciu. Stwierdzono równocześnie korzystny wpływ szczepienia embrionów na późniejsze efekty ekonomiczne, takie jak mniejsze spożycie paszy na kg przyrostu oraz niższe konfiskaty rzeźne. W badaniach nad określeniem stopnia zabezpieczenia przed zachorowaniem stwierdzono, że w grupie kurcząt szczepionych metodą *in ovo* po kontrolnym zakażeniu zjadliwym szczepem MD było zabezpieczonych 93,25% ptaków natomiast przy metodzie konwencjonalnej tylko 89,58%.

Masowe szczepienia metodą *in ovo* u brojlerów prowadzili także Miles i wsp. (17) oraz niedawno Marsh

i wsp. (15). Celem badań Marsh i wsp. (15) było dokonanie szczegółowej oceny pracy systemu „INOVO-JECT[®]” w warunkach konwencjonalnego zakładu wylęgowego. Stwierdzono między innymi, że miano wirusa szczepionkowego nie obniża się w trakcie ciągu technologicznego, to jest od pobrania szczepionki z pojemnika do chwili inokulacji do jaja.

Wykazanie skuteczności szczepienia *in ovo* przeciwko chorobie Mareka zachęciło Sharmę (20) do przeprowadzenia badań nad przydatnością szczepionki skojarzonej. Pierwszą propozycją była immunizacja zarodków przeciwko chorobie Mareka i równocześnie przeciwko chorobie Gumboro.

Szczepienie metodą *in ovo* w immunoprofilaktyce choroby Gumboro

Obserwowany w Europie od końca lat osiemdziesiątych wzrost zagrożenia wysoce patogennymi szczepami wirusa choroby Gumboro czyni problem immunoprofilaktyki tej choroby znacznie bardziej skomplikowanym. Mimo rozmaitych programów profilaktycznych i rozmaitych szczepionek skuteczność ich jest ciągle niezadowalająca. Przyczyną takiego stanu rzeczy są obok pojawienia się szczepów o wysokiej wirulencji, hiperimmunizacja stad rodzicielskich, która utrudnia prowadzenie szczepień u ich potomstwa. W praktyce jedynym ułatwieniem przy układaniu programu szczepień przeciwko tej chorobie jest monitoring serologiczny, którego skuteczność jest w dużej mierze uzależniona od wyrównanego poziomu przeciwciał matczynych.

Po podaniu 18 dniowym zarodkom zjadliwego szczepu BVM wirusa choroby Gumboro Sharma (21) stwierdził po 24 godz. od zakażenia obecność zarazka w płucach, grasicy, żołądku gruczołowym, wątrobie, śledzionie i nerkach. Wirus utrzymywał się w tych narządach do 7 dnia po wylęgu. W porównaniu do piskląt szczepionych w pierwszym dniu życia, miano wirusa w tkankach u ptaków szczepionych jako zarodki, było generalnie wyższe i wirus utrzymywał się dłużej. Należy także podkreślić, że podobnie jak w przypadku szczepień przeciwko chorobie Mareka, wirus choroby Gumboro podany metodą *in ovo* wybiórczo namnaża się w płucach. Nie izolowano natomiast wirusa z płuc piskląt szczepionych *per os* po wylęgu.

Stwierdzono także, że tradycyjne szczepionki aktualnie stosowane w immunoprofilaktyce choroby Gumboro nie nadają się do stosowania metodą *in ovo*. Dla przykładu można podać, że zastosowanie „łagodnych” szczepionek zawierających silnie atenuowany wirus nie miało niekorzystnego wpływu na łęgi, lecz prowadziło do wystarczającego zabezpieczenia wyłącznie u zarodków SPF (20). Dawało to 100% protekcję w 4, 6, 8 i 10 tyg. po zakażeniu kontrolnym (21). U zarodków pochodzących ze stad uodpornionych przeciwko chorobie Gumboro tradycyjne szczepionki łagodne były mało skuteczne. Natomiast szczepy mniej atenu-

owane okazały się bardziej zjadliwe dla embrionów, doprowadzając nie tylko do obniżenia wylęgu, lecz nawet do pojawienia się choroby u piskląt (20). W tej sytuacji była potrzeba opracowania specjalnie przystosowanych szczepionek do stosowania metodą *in ovo*. W praktyce znalazła już zastosowanie szczepionka zawierająca w swym składzie obok stosunkowo zjadliwego wirusa choroby Gumboro także tak zwany czynnik neutralizujący wirusy (Virus Neutralising Factor-VNF) będący surowicą od ptaków hiperimmunizowanych wirusem choroby Gumboro (33). Przeprowadzone badania dowiodły, że stosowanie VNF opóźnia zakażenie wywołane przez wirus szczepionkowy zwiększając w ten sposób bezpieczeństwo stosowania szczepionki dla embrionów, nawet zarodków SPF (3, 34). Taka kompleksowa szczepionka cechowała się wysoką immunogennością. U zarodków uodpornionych tym preparatem stwierdzono w teście ELISA wysokie miana przeciwciał wynoszące, u kurcząt w 28 dniu życia, średnio 2633 (3). Ostatnio Jeurissen i wsp. (12), Lehrbach i wsp. (14) oraz Whitfill i wsp. (33, 34) bardzo szeroko przebadali skuteczność tej szczepionki. W porównaniu z konwencjonalną metodą szczepienia stwierdzono w obserwacjach terenowych, że w stadach uodpornianych metodą *in ovo* szczepionką kompleksową uzyskano lepsze efekty ekonomiczne.

W badaniach własnych (6) nad zastosowaniem w metodzie *in ovo* szczepów S-706 i Lukert CT wirusa choroby Gumboro, stwierdzono wydłużenie się czasu wykluwania piskląt uodpornianych szczepem Lukert CT.

Szczepienie metodą *in ovo* w immunoprofilaktyce zakaźnego zapalenia oskrzeli

Jak dotychczas szczepienie metodą *in ovo* przeciwko zakaźnemu zapaleniu oskrzeli nie wyszło poza fazę badań eksperymentalnych. Pierwsze prace Wakenell i wsp. (30) wykazały, że komercyjne szczepionki zawierające standardowe szczepy Massachusetts okazały się zbyt patogenne dla zarodków. Podjęta przez cytowanych autorów próba atenuacji zarazka zakończyła się sukcesem, bowiem uzyskany po 40 pasażach szczep wirusa IB okazał się niepatogenny dla embrionów. Ocena skuteczności pasażowanego izolatu, wykazała, że po zaszczepieniu 18 dniowych zarodków, odporność u kurcząt trwała do 4 tygodni.

W późniejszej pracy Wakenell i wsp. (31) ocenili wpływ szczepień zarodków przeciwko IB na zmiany histopatologiczne. Uzyskany obraz patomorfologiczny u piskląt szczepionych metodą *in ovo*, nie różnił się od zmian obserwowanych u ptaków uodpornianych po wylęgu. Zmiany te lokalizowały się głównie w tchawicy i płucach. Szczegółowa analiza morfopatologiczna dokonana przez Chew i wsp. (9) wykazała, że atenuowany wirus IB podany *in ovo* nie powoduje zmian w jajowodzie, co ma istotne znaczenie dla przyszłych niosek. W badaniach własnych (5) nad wpływem

szczepu H-120 wirusa IB na przebieg embriogenezy, wykazano obniżenie wylęgu i wyraźne objawy poszczepienne u piskląt. Badania te potwierdzają, że bez przygotowania odpowiednich szczepionek preparaty aktualnie stosowane w immunoprofilaktyce IB nie nadają się do stosowania metodą *in ovo*.

Szczepienie metodą *in ovo* w immunoprofilaktyce rzekomego pomoru drobiu

Dotychczas najmniej informacji zebrano w odniesieniu do immunizacji zarodków przeciwko rzekomemu pomorowi drobiu – chorobie Newcastle (ND). Szczepienia takie wykonywali Ahmad i wsp. (1). Podobnie jak w przypadku szczepienia przeciwko zakażnemu zapaleniu oskrzeli, uodparnianie żywymi szczepami wirusa ND okazało się niebezpieczne. Nawet łagodny lentogeniczny szczep B1-Hitchnera jest silnie patogenny dla 18 dniowych embrionów. Ahmad i wsp. (1) próbowali zmniejszyć zjadliwość tego szczepu poprzez traktowanie go siarczanem etylometaniny. Tak zmodyfikowany szczep wirusa cechował się niską patogennością dla embrionów i równocześnie zabezpieczał kurczęta w 4 tyg. życia przed skutkami zakażenia kontrolnego.

Inną koncepcję przedstawili ostatnio Stone i wsp. (29). W warunkach eksperymentalnych autorzy ci podawali metodą *in ovo* inaktywowaną szczepionkę przeciwko ND i wirusowi grypy ptaków. Podanie tej skojarzonej szczepionki okazało się bezpieczne dla zarodków jak również potwierdzono jej skuteczność na kurczętach.

Perspektywy szczepienia *in ovo* w immunoprofilaktyce innych chorób

Na różnych etapach badań są szczepionki do stosowania metodą *in ovo* przeciwko kokcydiozie, zakażnemu zapaleniu nosa i tchawicy indyków (TRT) i ospie ptaków (4, 32). Najbardziej interesujące są zastosowania naturalnych immunomodulatorów do zwiększenia efektywności szczepień tą metodą (4, 13, 16). W kraju pierwsze urządzenie do szczepień *in ovo* (ryc. 1) zostało już wprowadzone do praktyki. Zastosowano szczepionkę przeciwko chorobie Mareka (liofilizowany szczep HVT). Wstępne obserwacje wskazują, że szczepienie nie wpływa ujemnie na przebieg lęgu, nie powoduje również uszkodzenia zarodków.

Piśmiennictwo

- Ahmad J., Sharma J. M.: Am. J. Vet. Res. 53, 11, 1992.
- Baines D., Gildersleeve R. P.: Int. Poult. Product. Suppl. 3, 1995.
- Baines D.: Mat. Seminarium: System INOVOJECT® aktualne możliwości i perspektywy zastosowań w praktyce drobiarskiej. Warszawa, 1998, s. 7.
- Baines D.: Mat. Seminarium: System INOVOJECT® aktualne możliwości i perspektywy zastosowań w praktyce drobiarskiej. Warszawa, 1998, s. 21.
- Borzemska W., Kosowska G., Karpińska E., Malec L., Niezgodą J., Malec H.: Medycyna Wet. 49, 76, 1993.
- Borzemska W., Kosowska G., Karpińska E., Szeleszczuk P., Malicka E., Malec H.: Ann. Warsaw. Agric. Univ.-SGGW, Vet. Med. 20, 117, 1997.
- Borzemska W., Kosowska G., Karpińska E., Szeleszczuk P., Malec H., Niezgodą J.: Ann. Warsaw. Agric. Univ.-SGGW, Vet. Med. 19, 119, 1994.

- Borzemska W., Niedziółka J., Niezgodą J., Szeleszczuk P.: Medycyna Wet. 46, 9, 1990.
- Chew P. H., Wakenell P. S., Farver T. B.: Avian Dis. 41, 598, 1997.
- Fabris G., Patterello I., Figarolli V.: Europ. Poult. Conf., Glasgow 1994, s. 123.
- Gildersleeve R. P., Hoyle C. M., Miles A. M., Murray D. L., Ricks C. A., Secrest M. N., Williams C. J., Womack C. L.: J. Appl. Poultry Res. 2, 337, 1993.
- Jeurissen S. H. M., Lehrbach P. R., Whitfill C. E.: Abstr. XI th Int. Cong. WVPA, Budapest 1997, s. 9.
- Johnston P. A., Liu H., O'Connell T., Phelps P., Bland M., Tyczkowski J., Kemper A., Harding T., Avakian A. P., Haddad E. E., Whitfill C. E., Gildersleeve R. P., Ricks C. A.: Poult. Sci. 76, 165, 1997.
- Lehrbach P. R., Whitfill C. E., Chettle N.: Abstr. XI th Int. Cong. WVPA, Budapest 1997, s. 10.
- Marsh T. E., Fluke D. K., Villegas P.: Avian Dis. 41, 452, 1997.
- McGruder E. D., Ramirez G. A., Kogut M. H., Moore R. W., Corrier D. E., Deloach J. R., Hargis B. M.: Poult. Sci. 74, 18, 1995.
- Miles A. M., Williams C. J., Womack C. L., Murray D. L., Gildersleeve R. P.: Abstr. IX Cong. WPSA, Amsterdam 1992, s. 320.
- Sharma G., Greer W., Gildersleeve R. P., Murray D. L., Miles A. M.: Avian Dis. 39, 211, 1995.
- Sharma J. M.: Poultry Dig. 42, 58, 1983.
- Sharma J. M.: Avian Dis. 29, 1155, 1985.
- Sharma J. M.: Avian Dis. 30, 776, 1986.
- Sharma J. M.: Avian Pathol. 16, 567, 1987.
- Sharma J. M.: Avian Dis. 31, 570, 1987.
- Sharma J. M.: Am. J. vet. Res. 50, 882, 1989.
- Sharma J. M., Burmester B. R.: Avian Dis. 26, 134, 1982.
- Sharma J. M., Burmester B. R.: Disease control in avian species by emryonal vaccination U. S. Patent No. 4, 458, 1984.
- Sharma J. M., Graham C. K.: Avian Dis. 26, 860, 1982.
- Sharma J. M., Lee L. F., Wakenell P. S.: Am. J. vet. Res. 45, 1619, 1984.
- Stone H., Mitchell B., Brugh M.: Avian Dis. 41, 856, 1997.
- Wakenell P. S., Sharma J. M.: Am. J. vet. Res. 47, 293, 1986.
- Wakenell P. S., Sharma J. M., Slocombe R. F.: Avian Dis. 39, 752, 1995.
- Watkins K. L., Brooks M. A., Jeffers T. K., Phelps P. V., Ricks C. A.: Poultry Sci. 74, 1597, 1995.
- Whitfill C. E., Avakian A. P., Haddad E. E., Ryan R., J. C. van den Wijngaard, Baines D., Chettle N., Lehrbach P. R.: Abstr. XI th Int. Cong. WVPA, Budapest 1997, s. 11.
- Whitfill C. E., Ricks C. A., Haddad E., Avakian A. P.: Proc. Int. Cong. WVPA, Sydney 1993, 154.

Adres autora: prof. dr hab. Wanda Borzemska, ul. Perzyńskiego 8 m. 18, 01-872 Warszawa

GOONERATNE S.R., CHRISTENSEN D.A.: Wpływ czynników chelatujących na wydalanie miedzi, cynku i żelaza z żółcią oraz z moczem u owiec. (Effect of chelating agents on the excretion of copper, zinc and iron in the bile and urine of sheep). Vet. J. 153, 171-178, 1997 (2)

W leczeniu zatruc miedzią są zalecane najrozmaitsze substancje chelatujące. Przebadano efekt TM (tetratiomolibdenian), EDTA, PEN (d-penicylamina), BAL i DDC (dimetyltiokarbaminian) na wydalanie miedzi, cynku i żelaza z żółcią i moczem u owiec otrzymujących karmę o różnej zawartości miedzi. Karma owiec z grupy A zawierała 19,6 mg Cu/kg suchej masy, z grupy B 48,2 mg Cu/kg suchej masy. Jedynie TM zwiększał znacząco wydalanie miedzi z żółcią, a PEN z moczem. Wydalanie cynku z moczem zwiększało się po stosowaniu EDTA i PEN, żelaza pod wpływem EDTA. Zarówno TM jak i PEN wpływały najsilniej na usuwanie miedzi z organizmu owiec, zaś PEN ponadto wpływał w sposób znamienny na usuwanie cynku z organizmu. W leczeniu zatruc miedzią wskazane jest stosowanie TM i PEN.