

IMMUNOVAC – poliwalentna szczepionka przeciw salmonellozom kur*)

RENATA GŁOŚNICKA, HALINA DZIADZIUSZKO, DANUTA KUNIKOWSKA,
MAŁGORZATA LIS*, MAGDALENA WICHA*, MARIAN HELESKI*,
EWA TOKARSKA-PIETRZAK, LEONARD STRZAŁKOWSKI**, PIOTR BUGAJAK***

Zakład Mikrobiologii Molekularnej i Serologii Akademii Medycznej w Gdańsku,
Krajowy Ośrodek Salmonella, ul. Powstania Styczniowego 9 b, 81-519 Gdynia

*Biowet Puławy Sp. z o.o., ul. Arciucha 2, 24-100 Puławy

**Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk

***Prywatna Praktyka Weterynaryjna, ul. Skowieszyńska 17, 24-100 Puławy

Głośnicka R., Dziadziuszko H., Kunikowska D., Lis M., Wicha M., Heleski M., Tokarska-Pietrzak E.,
Strzałkowski L., Bugajak P.

Immunovac – polyvalent vaccine against salmonellosis in hens

Summary

The new vaccine constructed from eight inactivated *Salmonella* serovars bounded with polyclonal rabbit antibodies is proposed for active and passive immunization by oral route against salmonellosis. This vaccine protected 100% of mice against challenge with virulent *S. Enteritidis* strain. Furthermore, this vaccine protected 80% of hens against challenge with *S. Gallinarum* strain. Immunovac showed bacteriostatic activity for *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* in in vitro test. The vaccine evoked cell-mediated immune responses, induced lymphocyte proliferation and antigen-specific rosette formation. The level of humoral response was on lower level by oral route administration than by intravenous injection. The results of the research showed good humoral and cell-mediated response in animals. Immunovac vaccine is safe for animals and environment. This vaccine is very easy to application, and with high activity for immunization against salmonellosis.

Keywords: *Salmonella*, immunization, polyvalent vaccine

Immunizacja odgrywa ważną rolę w zapobieganiu i zwalczaniu salmonelloz wśród zwierząt, a co za tym idzie, chroni ludzi przed zakażeniem salmonellozami odzwierzęcymi. Zapobiega także znacznym stratom w hodowli i w produkcji żywności. Istnieje szereg preparatów komercyjnych i szczepionek produkowanych laboratoryjnie, skierowanych przeciw tak zwanym „host adapted” serotypom, np. *S. Dublin* dla cieląt, *S. Choleraesuis* dla świń i *S. Gallinarum* dla kurcząt lub przeciw bakteriom *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*, które powodują zakażenia różnych gatunków zwierząt (1, 6). Stosowane są różne rodzaje szczepionek: żywe, inaktywowane oraz zawierające genetycznie zmodyfikowane żywe szczepy (5). Szczepionki zawierające bakterie inaktywowane ogrzewaniem lub formaliną są produkowane z pojedynczych, najczęściej występujących serotypów (6).

Preparaty te są zwykle podawane parenteralnie w dwóch dawkach. Przy takiej aplikacji inaktywowanych lub żywych atenuowanych szczepów obserwowano nadmierną reakcję na endotoksynę lub nawet przypadki zachorowań i padnięć zwierząt (4).

Dotychczas opisano 2500 serotypów *Salmonella*. Problem uodporniania zwierząt na tak szerokie spektrum typów serologicznych tych bakterii nie został do tej pory rozwiązany. W związku z tym opracowanie skutecznej poliwalentnej szczepionki jest ciągle aktualne (12).

*) Badania sponsorowane przez Zakład Badawczo-Wdrożeniowy Ośrodka Salmonella Immunolab Sp. z o.o. oraz Biowet Puławy Sp. z o.o.

Stosowanie szczepionek wykonanych z jednego typu serologicznego *Salmonella* nie wywołuje odporności krzyżowej przeciw innym typom serologicznym (8). Nie jest możliwe stosowanie szczepionek z żywych bakterii w przypadku ostrej infekcji w stadzie, a także nie uzyskuje się odporności u bardzo młodych zwierząt. Preparaty wykonane ze szczepów genetycznie zmodyfikowanych są bardzo kosztowne, a żywe szczepy podawane w formie szczepionek mogą być unieczynniane przez antybiotyki powszechnie stosowane w hodowli zwierząt (6). Jako dodatkowe argumenty przeciw stosowaniu żywych genetycznie zmodyfikowanych szczepów podaje się możliwość włączenia takich szczepów w łańcuch zakażeń u ludzi (12).

Stosowanie doustne szczepionek przeciw salmonellozom jest obecnie przedmiotem intensywnych badań i wstępne ich wyniki wskazują, że podawanie tą drogą szczepionek zawierających żywe lub zainaktywowane bakterie stymuluje lokalną odporność jelitową, a także przyczynia się do zmniejszenia wydalania bakterii przez immunizowane zwierzęta (2, 6). Obecnie najczęstszą przyczyną zatrucia pokarmowych u ludzi są produkty spożywcze zawierające jajka. W żółtkach jaj kur zakażonych bakteriami *Salmonella* stwierdzono obecność przeciwciał przeciw lipopolisacharydowi (LPS), rzęskom i białkom szoku termicznego Hsp60 (3). Badania referencyjne wykonywane w Krajowym Ośrodku Salmonella wykazały obecność bakterii *Salmonella*, które są izolowane z tuszek drobiowych, a szczegó-

nie od piskląt, pochodzących z hodowli rodzimych i z importu. Profilaktyczne szczepienia zwierząt na fermach hodowlanych powinny stanowić istotny czynnik zwalczania salmonelloz. Działania takie są prowadzone obecnie w wielu krajach. Zakażenia kur są spowodowane przez kilka serotypów *Salmonella*, a między innymi przez *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* i inne.

Przedstawione powody były bodźcem do opracowania poliwalentnej, kompleksowej szczepionki, która składa się z 8 najczęściej występujących serotypów bakterii *Salmonella* i zawiera przeciwciała królicze zaabsorbowane na wybranych determinantach antygenów somatycznych tych bakterii. Dodatkowym walorem szczepionki jest to, że jest ona przygotowana do stosowania *per os* w wodzie pitnej. Zakładano, że tak skonstruowana szczepionka będzie stanowić ochronę bierną piskląt przed zakażeniem i stymulować powstawanie odporności czynnej.

Materiał i metody

Szczepionka Immunovac jest zawiesiną z inaktywowanych szczepów *Salmonella* i przeciwciał króliczych. Przeznaczona jest dla kur niosek i stad rodzicielskich do stosowania w profilaktyce salmonelloz. Preparat w postaci zawiesiny składa się z kompleksu 8 szczepów *Salmonella* związanych ze swoistymi przeciwciałami. Bakterie są inaktywowane działaniem formaldehydu i zawieszane w chlorku sodowym ($8,5 \text{ g/cm}^3$), zawierającym 0,02% formaldehydu. Jeden mililitr zawiesiny zawiera około $3,5 \times 10^{11}$ bakterii: *S. Gallinarum* – $0,4 \times 10^{11}$, *S. Enteritidis* – $1,5 \times 10^{11}$, *S. Dublin* – $0,4 \times 10^{11}$, *S. Typhimurium* – $0,8 \times 10^{11}$, *S. Heidelberg* – $0,1 \times 10^{11}$, *S. Choleraesuis* – $0,1 \times 10^{11}$, *S. Kentucky* – $0,1 \times 10^{11}$ i *S. Senftenberg* – $0,1 \times 10^{11}$. Do bakterii przyłączono poliklonalne przeciwciała uzyskane z surowic królików uodpornionych antygenami somatycznymi bakterii *Salmonella* z grup: B, C₁, C₂₋₃ i D₁. Szczegółowy opis metody wytwarzania szczepionki Immunovac jest przedmiotem patentu (Nr 196172).

Przeprowadzono badanie aktywności przeciwbakteryjnej szczepionki *in vitro*.

Szczepy *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* LT2 namnażano w bulionie do stężenia 10^4 jtk/ml i dodawano szczepionkę Immunovac zawierającą zawiesinę bakterii o stężeniu 10^{11} jtk/ml. Inkubację prowadzono w 37°C przez 24 godziny. Przeżywalność bakterii badano przez wysiewanie przed inkubacją i w czasie inkubacji na płytki z podłożem agarowym. Kontrolę stanowiły bakterie namnażane w bulionie.

Przeprowadzono badanie zdolności indukowania odporności na zakażenie szczepami *Salmonella*: Enteritidis na myszach (BALB/c) oraz Gallinarum na kurach.

Myszy podzielono na dwie grupy. Jedna grupa – 10 myszy otrzymało preparat Immunovac rozcieńczony w wodzie do picia w ilości odpowiadającej $10,5 \times 10^{11}$ jtk bakterii na 1 mysz, drugiej grupie (10 myszy) podano wodę do picia. Po 6 dniach wszystkie myszy zakażono zawiesiną bakterii *S. Enteritidis*, podając im w naczyniu do picia po około 2×10^8 jtk bakterii na mysz. Po 16 dniach uśpiono myszy, które przeżyły. Do badań bakteriologicznych pobierano wycinki ze śledziony i wątroby.

Do określenia właściwości ochronnych szczepionki dla kur użyto ptaków, które pochodziły z trzech ferm. W jednej z nich przeprowadzono pełny cykl szczepień. Szczepionkę Immunovac podawano czterokrotnie w odstępach tygodniowych. Pierwsze szczepienie przeprowadzono w 1. tygodniu życia. Ptaki otrzymały odpowiednio 30 ml, 60 ml, 120 ml i 240 ml szczepionki, zgodnie ze schematem szczepień. W dwóch pozostałych fermach szczepienia przeciw salmonellozom nie były prowadzone. Kury ze stad wybrano losowo i utworzono trzy grupy doświadczalne

po 10 osobników. Ptaki w warunkach laboratoryjnych zakażono zjadliwym szczepem *S. Gallinarum*, podając domięśniowo po $1,86 \times 10^8$ jtk bakterii. Kury szczepione zakażono w 10. tygodniu życia, tj. 6 tygodni po zakończeniu szczepień i obserwowano 38 dni. Kury z dwóch stad nie szczepionych zakażono odpowiednio w 6. oraz w 15. tygodniu życia. W grupach kur nie szczepionych eksperyment, ze względu na padnięcia, zakończył się po 8 i 17 dniach. Wykonano badania anatomopatologiczne i bakteriologiczne. Do badań bakteriologicznych pobierano wycinki mięśnia sercowego, wątroby, śledziony, zawiązków jajnika, dwunastnicy oraz kępek Peyera jelit ślepych. W dniu sekcji od ptaków pobierano również wymazy z kloaki.

W celu zbadania zdolności wywoływania odpowiedzi humoralnej króliki szczepiono *per os* preparatem Immunovac o stężeniu $3,5 \times 10^{11}$ jtk/ml, podając odpowiednio 0,1 ml; 1ml; 1,5 ml i 2 ml w 5-dniowych odstępach czasu. Ponadto zaszczerpiono czterokrotnie dożylnie 2 króliki preparatem Immunovac zawierającym około 10^8 jtk/ml, podając odpowiednio 0,1 ml; 1ml; 2 ml i 3 ml w 5-dniowych odstępach czasu. Badanie odpowiedzi immunologicznej dla antygenów LPS wykonano testem ELISA.

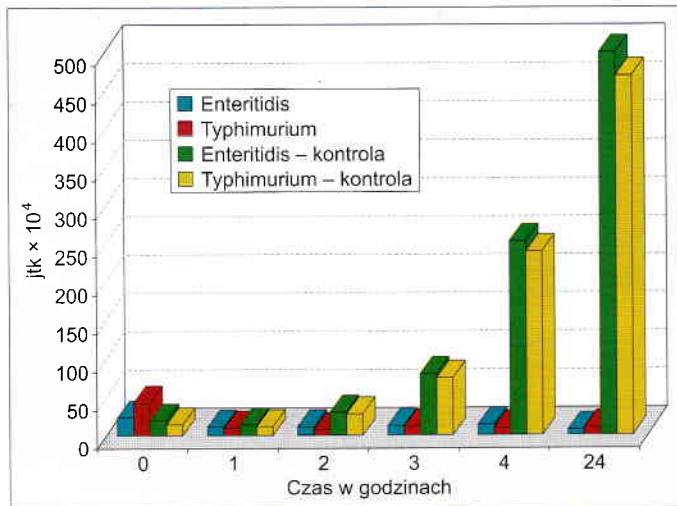
Przeprowadzono badanie poziomu przeciwciał u kur szczepionych preparatem Immunovac testem Idexx. Przepisy weterynaryjne obligują do przeprowadzenia badań serologicznych stad szczepionych przeciw salmonellozie. Poziom przeciwciał IgG anty-*Salmonella* w surowicy kur określono testem ELISA SE (Idexx). Monitoring serologiczny prowadzony był w trzech stadach, z których dwa przeszły pełny cykl szczepień szczepionką Immunovac (stado R – nioski towarowe i B – stado rodzicielskie). Trzecie stado (M – nioski towarowe) nie było szczepione przeciw salmonellozie. Krew od ptaków nie szczepionych pobierano w pierwszym dniu oraz w 5., 10., 15. tygodniu życia. Krew od ptaków szczepionych ze stada R pobrano przed pierwszym szczepieniem w 6. dniu życia, 6 dni po pełnym cyklu szczepień, tj. w 10. tygodniu życia oraz w 16. tygodniu życia. W stadzie B krew pobierano przed szczepieniem w 2. tygodniu życia, 11 dni po pełnym cyklu szczepień szczepionką Immunovac oraz w 27., 40., 49. tygodniu życia. Krew do badań pobierano od kur losowo wybranych z każdego stada. Oznaczenia testem ELISA wykonano zgodnie z zaleconym przez producenta postępowaniem analitycznym. Surowice ptaków szczepionych rozcieńczono 1 : 250, a od nie szczepionych 1 : 2. O.D._{655nm} mierzono w czytniku do płytek ELISA (Multiscan Plus).

Badanie zdolności wywoływania odpowiedzi komórkowej przeprowadzono z zastosowaniem testu transformacji blastycznej. Limfocyty izolowane ze śledziony 5 myszek białych BALB/c mieszano ze szczepionką o stężeniu bakterii 10^{11} jtk/ml lub z fitohemaglutyniną (PHA) o stężeniu $10 \mu\text{l/ml}$ i inkubowano w ciemności w 37°C przez 96 godzin w atmosferze 5% CO₂. W preparatach liczono komórki blastyczne przypadające na 500 limfocytów.

Ponadto wykonano odczyn rozetkowy w celu wykrycia receptorów na limfocytach myszy szczepionych *per os* szczepionką, która zawierała $2,2 \times 10^9$ jtk/ml. Komórki śledzionowe myszy immunizowanych i myszy nie szczepionych mieszano z krwinkami baraniami formalizowanymi (KBf) opłaszczonymi antygenami LPS 4,14 i LPS 9,12 ($100 \mu\text{g}$ antygeny/ml) lub KBf nieopłaszczonymi. Po inkubacji w temp. 4°C (1 godzinę), mieszaninę nakładano na szkiełko podstawowe i uformowane rozetki liczono w mikroskopie świetlnym.

Wyniki i omówienie

Przeprowadzone badania miały na celu wykazanie zdolności hamowania wzrostu bakterii przez przeciwciała zawarte w szczepionce oraz właściwości pobudzania układu



Ryc. 1. Aktywność przeciwbakteryjna Immunovac – badania *in vitro*. Szczepy *Salmonella* Enteritidis i Typhimurium hodowano w podłożu z dodatkiem szczepionki. Kontrolę stanowiły bakterie hodowane w samym bulionie

immunologicznego, a także działania ochronnego przed zakażeniem.

Wyniki badania aktywności przeciwbakteryjnej wykonane w testach *in vitro* przedstawiono na ryc. 1. Szczepionka dodawana do hodowli bakteryjnej wykazywała działanie bakteriostatyczne dla szczepów *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* – liczba kolonii zmniejszała się 2- lub 4-krotnie i pozostawała na takim poziomie w czasie 24 godzin. Liczba kolonii w próbach kontrolnych wzrastała ponad 10-krotnie po 4 godzinach inkubacji, a po 24 godzinach liczba bakterii wynosiła 5×10^8 jtk/ml. Badanie to wykazało właściwości bakteriostatyczne przeciwiał króliczych opłaszczonych na bakteriach dla szczepów *Salmonella* Enteritidis i Typhimurium. Działanie bakteriobójcze surowic i przeciwiał króliczych, a także przeciwiał kurzych zostało udokumentowane w licznych publikacjach (7, 9, 11, 13).

Przeprowadzono badanie działania ochronnego preparatu Immunovac przed zakażeniem szczepem *Salmonella*.

Tab. 2. Wyniki eksperymentu protekcyjnego dla kur ze stada szczepionego szczepionką Immunovac zakażonych w 10. tygodniu życia

Badany materiał	Ptaki padłe		Ptaki wykrwawione							
	5.	10.	Doba po zakażeniu							
			38.							
Nr ptaka										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Serce	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Wątroba	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Śledziona	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Zawiązek jajnika	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Dwunastnica	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kępkę Peyera	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wymaz w dniu sekcji	nb	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Objaśnienia: + wyizolowano *S. Gallinarum*; - nie wyizolowano *S. Gallinarum*; nb – nie badano

Tab. 1. Wyniki działania ochronnego szczepionki Immunovac dla myszy

Liczba myszy	Sposób podania szczepionki	Szczepienie	Zakażenie	Przeżywalność
10	w poidłach	Immunovac $10,5 \times 10^{11}$	Enteritidis $2,5 \times 10^8$	10/10
10	w poidłach	woda wodociągowa	Enteritidis $2,5 \times 10^8$	2/10

Jak przedstawiono w tab. 1, preparat podany jednorazowo w poidłach chronił myszy przed zakażeniem zastosowaną dawką szczepu *S. Enteritidis* chorobotwórczego dla ludzi. Na 10 szczepionych myszy wszystkie przeżyły zakażenie, podczas gdy wśród myszy nie uodpornionych tylko 2 przeżyły, a 8 sztuk padło w czasie 8 do 12 dni od zakażenia. Posiewy z narządów zakażonych myszy nie szczepionych, które padły, wykazywały masywne zakażenie wątroby i śledziony pałeczkami *S. Enteritidis*. Po 16 dniach uśpiono wszystkie pozostałe myszy i z materiału pobranego ze śledziony nie wyizolowano bakterii *S. Enteritidis*. Wyniki tych badań wskazują na bardzo dobre działanie ochronne szczepionki Immunovac.

Badanie działania ochronnego dla kur przeprowadzono na trzech grupach kur, które pochodziły z różnych ferm. W jednej z nich kury były szczepione czterokrotnie w odstępach tygodniowych. Ptaki wybierano losowo i zakażano domięśniowo bakteriami *S. Gallinarum*. Wyniki przedstawiono w tab. 2, 3 i 4.

W grupie kur szczepionych, w czasie trwania doświadczenia padły dwa ptaki w 5. i 10. dniu od zakażenia. Z większości pobranych od nich narządów wyizolowano *S. Gallinarum*. Pozostałe osiem ptaków nie wykazywało objawów chorobowych. W 38. dniu obserwacji ptaki zostały wykrwawione i tylko od dwóch wyizolowano *S. Gallinarum* z mięśnia sercowego. Pozostałe badania nie wykazały obecności bakterii w badanych narządach (tab. 2).

W dwóch grupach ptaków nie szczepionych w krótkim czasie od zakażenia *S. Gallinarum* pojawiły się objawy chorobowe i następowały padnięcia. W grupie kur 6-tygodniowych od 3. do 6. dnia po zakażeniu padło 9 na 10 ptaków. Dziesiąty ptak z objawami chorobowymi został wykrwawiony 8 dni po zakażeniu. Podczas badania anatomopatologicznego stwierdzono zmiany charakterystyczne dla zakażeń wywołanych przez pałeczki *Salmonella*. W badaniach bakteriologicznych ze wszystkich rodzajów materiału pobranego od ptaków, z wyjątkiem jednego wymazu z kloaki i jednego posiewu ze śledziony, wyizolowano *S. Gallinarum* (tab. 3). W grupie kur 15-tygodniowych od 3. do 12. dnia po zakażeniu padło 9 z 10 ptaków. Dziesiąty ptak, który nie wykazywał objawów chorobowych, został wykrwawiony 17 dni po zakażeniu. Z większości narządów wewnętrznych pobranych do badań oraz z wymazów z kloaki wyizolowano *S. Gallinarum* (tab. 4). Wyniki eksperymentu przeprowadzonego na kurach wykazują, że zastosowana szczepionka posiada właściwości ochronne przed zakażeniem najbardziej chorobotwórczymi dla kur bakteriami – *S. Gallinarum*. Zastosowanie dużej dawki bakterii podanych domięśniowo spowodowało cięż-

Tab. 3. Wyniki eksperymentu protekcyjnego dla kur ze stada nie szczepionego zakażonych w 6. tygodniu życia

Badany materiał	Ptaki padłe									Ptak wykrawiony	
	Doba po zakażeniu										
	3.			4.				6.			8.
	Nr ptaka										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Serce	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Wątroba	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Śledziona	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
Związek jajnika	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Dwunastnica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Kępki Peyera	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Wymaz w dniu sekcji	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	

Objaśnienia: + wyizolowano *S. Gallinarum*; - nie wyizolowano *S. Gallinarum*

Tab. 4. Wyniki eksperymentu protekcyjnego dla kur ze stada nie szczepionego zakażonych w 15. tygodniu życia

Badany materiał	Ptaki padłe										Ptak wykrawiony						
	Doba po zakażeniu																
	3.		4.		5.		6.		7.			12.		17.			
	Nr ptaka																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Serce	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wątroba	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Śledziona	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Związek jajnika	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Dwunastnica	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Kępki Peyera	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Wymaz w dniu sekcji	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Objaśnienia: jak w tab. 3

Tab. 5. Poziom przeciwciał w surowicy królików szczepionych doustnie (o.r.) i dożylnie (i.v.) preparatem Immunovac w teście ELISA

Surowica królika nr/ sposób podania	Antygeny – lipopolisacharydy bakterii <i>Salmonella</i>					
	Enteritidis	Typhimur.	Kapemba	Newport	London	Seftenberg
1. o.r.	320*	160	40	40	40	40
2. o.r.	320	40	80	80	40	40
3. o.r.	320	20	40	20	10	10
4. o.r.	640	1280	640	320	160	160
5. i.v.	5000	640	40	640	320	640
6. i.v.	10 000	10 000	1280	640	320	1280

Objaśnienia: * podane wartości oznaczają odwrotność miana surowic

kie objawy choroby u kur nie szczepionych i padnięcia 99,8% w tych grupach kur. U kur, które otrzymały preparat Immunovac stwierdzono 80% przeżywalności.

Zastosowanie testu immunoenzymatycznego pozwoliło na wykrycie przeciwciał w surowicy królików szczepionych doustnie (o.r.) i dożylnie (i.v.) preparatem Immunovac. Wyniki przedstawiono w tab. 5, w której widoczne są różnice poziomu przeciwciał zależne od drogi podawania szczepionki. Szczepienie dożylnie pozwoliło na uzyskanie odpowiedzi humoralnej wyższego stopnia niż szczepienie doustne. Związanie przeciwciał z frakcjami antygenów somatycznych nie zmniejszyło zdolności szczepionki do stymulacji swoistej odpowiedzi humoralnej dla antygenów grupowych szczepów użytych do jej produkcji, zarówno po podaniu drogą doustną, jak i dożylną.

Wyniki oznaczeń poziomu przeciwciał anti-*Salmonella* we krwi kur szczepionych szczepionką Immunovac pozwalają uznać badane stada za wolne od zakażeń *Salmonella*. Status immunologiczny tych stad opisuje uzyskany rozkład wyników. W stadach kur szczepionych nie uzyskano wyników dodatnich. W stadzie R 96,5% przebadanych próbek krwi dało wynik ujemny, a 3,5% stanowiły wyniki wątpliwe (tab. 6); próbki te winny być przebadane po ponownym pobraniu krwi w późniejszym terminie. W stadzie B, monitorowanym do 49. tygodnia życia ptaków, 84,7% stanowiły wyniki ujemne, a 15,3% próbek dało wynik wątpliwy (tab. 7). Ponowne badania nie były wykonywane. Wyniki dodatnie uzyskane w stadzie M kur nie szczepionych stanowiły 5,6%. Wyników wątpliwych było 11,2%, a pozostałe oznaczenia (83,2%) dały wynik ujemny (tab. 8). Wyniki dodatnie zostały potwierdzone w badaniach mikrobiologicznych.

Zdolność pobudzania odporności komórkowej przez szczepionkę Immunovac badano za pomocą testu transformacji blastycznej oraz przez określenie zdolności wytwarzania receptorów na limfocytach i wiązania opłaszczonych erytrocytów.

Pod wpływem szczepionki transformacja blastyczna limfocytów wystąpiła w 23,2% komórek. Dla porównania: fitohemaglutynina, która jest wzorcowym mitogenem, powodowała transformację w 29,5% komórek. Wyniki te wskazują na zdolność szczepionki do pobudzania limfocytów do przechodzenia w formy blastyczne.

Uzyskanie w teście rozetek świadczy o tym, że limfocyty myszek szczepionych doustnie wykształciły receptory immunoglobulinowe przeciw odpowiednim determinantom antygenowym badanej szczepionki. Dzięki nim możliwe było przyłączenie lipopolisacharydów (LPS) 4,12 i 9,12 opłaszczonych na erytrocytach do limfocytów i utworzenie rozetek EA (erythrocyte-antigen). Średnia liczba rozetek powstałych z limfocytów i przyłączonych erytrocytów wynosiła 296 dla LPS 4,12 i 303 dla LPS 9,12. Wynik ten

Tab. 6. Wyniki monitoringu serologicznego kur szczepionych szczepionką Immunovac, stado R (test Elisa Idexx)

Monitoring	Liczba zbad. kur	Wyniki		
		+	-	*
I	25	0	25	0
II	30	0	30	0
III	30	0	27	3

Objaśnienia: I – przed szczepieniem, 6. dzień życia; II – 6 dni po pełnym cyklu szczepień; III – 16. tydzień życia; + wynik dodatni; – wynik ujemny; * wynik wyższy od ujemnego

Tab. 7. Wyniki monitoringu serologicznego kur szczepionych szczepionką Immunovac, stado B (test Elisa Idexx)

Monitoring	Liczba zbad. kur	Wyniki		
		+	-	*
I	30	0	21	9
II	30	0	27	3
III	30	0	30	0
IV	24	0	24	0
V	30	0	20	10

Objaśnienia: I – przed szczepieniem, 2,5. tyg. życia; II – 11 dni po pełnym cyklu szczepień; III – 27. tydzień życia; IV – 40. tydzień życia; V – 49. tydzień życia; + wynik dodatni; – wynik ujemny; * wynik wyższy od ujemnego

Tab. 8. Wyniki monitoringu serologicznego kur nie szczepionych, stado M (test Elisa Idexx)

Monitoring	Liczba zbad. kur	Wyniki		
		+	-	*
I	10	2	8	0
II	20	1	17	2
III	30	0	25	5
IV	29	2	24	3

Objaśnienia: I – przed szczepieniem, 1. dzień życia; II – 5. tydzień życia; III – 10. tydzień życia; IV – 15. tydzień życia; + wynik dodatni; – wynik ujemny; * wynik wyższy od ujemnego

świadczy o bardzo dobrym działaniu indukcyjnym antygenów somatycznych O:4 i O:9 szczepów *Salmonella* zawartych w szczepionce. W kontrolach komórek śledzimy myszy nie immunizowanych z erytrocytami opłaszczonymi LPS 4,12 i 9,12 rozetek nie zaobserwowano, a także nie stwierdzono obecności rozetek z limfocytów myszy immunizowanych i erytrocytów nie opłaszczonych antygenami.

Skuteczność szczepień wykonanych z bakterii inaktywowanych została udokumentowana w licznych badaniach (1, 5, 6). Od wielu lat znane są właściwości bakterio-bójcze i ochronne surowic odpornościowych i przeciwciał (7, 11, 13). Stwierdzono wysoki poziom przeciwciał w żółtku jaj kurzych, które pochodziły od kur zakażonych bakteriami *S. Enteritidis* (3). Wykazano skuteczne działanie ochronne przeciwciał izolowanych z żółtka jaj kur szczepionych bakteriami *Salmonella* Enteritidis i Typhimurium lub frakcjami komórkowymi przeciw zakażeniom bakte-

riami *Salmonella*, podawanych *per os* (7) u zakażonych cieląt. Yokoama i wsp. (13) wykazali ochronne działanie przeciwciał ekstrahowanych z żółtka jaj kurzych u cieląt zakażonych doświadczalnie *S. Typhimurium* i *S. Dublin*. Przeciwciała kurze zastosowane jako czynnik terapeutyczny, podawane *per os*, zależnie od dawki, zmniejszały padnięcie lub całkowicie im zapobiegały u cieląt. Prowadzone są badania nad eliminacją zakażenia *S. Enteritidis* u kurcząt pod wpływem dodatku immunoglobulin żółtka jaja kurzego do paszy (9), a także nad zastosowaniem takich przeciwciał w profilaktyce biegunek u prosiąt (10).

Podsumowując można stwierdzić, że szczepionka Immunovac wykazała zdolność aktywacji układu odpornościowego. Powodowała pobudzenie odporności humoralnej i komórkowej. Chroniła myszy przed zakażeniem *per os* szczepem *S. Enteritidis* w 100% i kury przed zakażeniem bakteriami *S. Gallinarum* podanymi domięśniowo w 80%. Posiadała działanie bakteriostatyczne dla bakterii *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* w testach *in vitro*. Wykazała zdolność do pobudzania limfocytów do proliferacji, a także wysoką aktywność do indukowania swoistych receptorów na limfocytach myszy szczepionych. Badania wykazały obecność przeciwciał u królików, swoistych dla wszystkich szczepów wchodzących w skład szczepionki. Szczepionka nie wykazywała podwyższonego poziomu przeciwciał u kur szczepionych przy zastosowaniu testu Idexx. Poliwalentna, kombinowana szczepionka Immunovac jest bezpiecznym, łatwym do stosowania i skutecznym preparatem do zwalczania salmonelloz u kur.

Piśmiennictwo

- Barrow P. A.: *Salmonella* in domestic animals. CABI, New York 2000, s. 323.
- Cerquetti M. C., Gherardi M. M.: Orally administered attenuated *Salmonella* Enteritidis reduces chicken carriage of virulent *Salmonella* challenge organisms. *Vet. Microbiol.* 2000, 76, 185-192.
- Dera-Tomaszewska B., Wysocki J., Kunikowska D., Dziadziuszko H., Głównicka R.: Hsp60 specific antibodies in egg yolks from laying hens naturally infected with *Salmonella enterica* subspecies enterica serovars Enteritidis. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 2003, 26, 37-45.
- George A., Shroff K. E., Rath S., Ghosh S. N., Sengupta S. R., Kamat R. S.: Route-related variation in the immunogenicity of killed *Salmonella* enteritidis vaccine: role of antigen presenting cells. *Microbiol Immunol.* 1989, 33, 479-488.
- Mastroeni P., Chabalgoity J. A., Dunstant S. J., Maskell D. J., Dougan G.: *Salmonella*: immune responses and vaccines. *Vet. J.* 2000, 161, 132-164.
- Meyer H., Barrow P., Pardon P.: *Salmonella* immunization in animals. Symposium „*Salmonella* and Salmonellosis” Ploufragan/Saint-Brieuc, France 1992, s. 345.
- Peltra R. C., Yokoyama H., Ikemori Y., Kuroki M., Kodama Y.: Passive immunisation against experimental salmonellosis in mice by orally administered hen egg-yolk antibodies specific for 14-kDa fimbriae of *Salmonella* Enteritidis. *J. Med. Microbiol.* 1994, 41, 29-35.
- Segall T., Lindberg A. A.: Oral vaccination of calves with an aromatic-dependent *Salmonella* Dublin (O9,12) hybrid expressing O4,12 protect against *S. Dublin* (O9,12) but not against *Salmonella typhimurium* (O,4,5,12). *Infect. Immun.* 1993, 61, 1222-1231.
- Stefaniak T., Wieliczko A., Kuczkowski M., Kopeć W., Jamroz D.: Wpływ dodatku immunoglobuliny żółtka jaja kurzego (IgY) do paszy na eliminację zakażenia *Salmonella* Enteritidis oraz wyniki odchowu kurcząt rzeźnych. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 432-436.
- Stefaniak T., Kopeć W., Gąsowska A., Borkowski J., Gierzyńska E., Popławski M.: Zastosowanie immunoglobuliny żółtka jaja w profilaktyce biegunek u prosiąt ssących. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 539-542.
- Taylor P. W.: Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 1998, 47, 46-83.
- Wallis T. S.: *Salmonella* pathogenesis and immunity: we need effective multivalent vaccines. *Vet. J.* 2001, 161, 104-106.
- Yokoama H., Peltra R. C., Umeda K., Hashi T., Icatlo F. C. Jr., Kuroki M., Ikemori Y., Kodama Y.: Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk *Salmonella*-specific antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 1998, 59, 416-420.

Adres autora: prof. dr hab. med. Renata Głównicka, ul. Pilotów 18 B/4, 80-460 Gdańsk; e-mail: renglo@amg.gda.pl