

# Lokalizacja szczepu wirusa HVT FC126 w narządach wewnętrznych kurcząt szczepionych przeciwko chorobie Mareka

ELŻBIETA SAMOREK-SALAMONOWICZ, HANNA CZEKAJ,  
WOJCIECH KOZDRUŃ, KATARZYNA KRÓL

Pracownia Diagnostyki Chorób Wirusowych Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego  
– Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Samorek-Salamonowicz E., Czekaj H., Kozdruć W., Król K.

## Localization of the HVT FC 126 virus strain in internal organs of chickens vaccinated against Marek's disease

### Summary

The aim of this study was a comparison of the occurrence and presence of Marek's disease strain HVT FC 126 in internal organs after in ovo vaccination and after vaccination of one day old chicks. One hundred SPF chicken embryos were used in the experiment on the 18<sup>th</sup> day of incubation. Forty-five embryos were vaccinated in ovo with a dose of 2400 pfu of virus HVT FC 126. Twenty-eight embryos were injected in the back area (group I), and for 17 embryos the vaccine was provided to the embryonic fluids (group II). All of the embryos were hatched. Chicks from non-vaccinated embryos were divided into two groups. On the first day after clutch, 30 chicks were vaccinated in the leg muscle (group III). The fourth control group consisted of non-vaccinated chicks. Blood samples and sections of the liver, spleen, kidneys, and bursa of Fabricius were taken on days 1, 3, 7 and 10 from 5-day-old chicks (group I), on days 1, 3 and 10 from group II, and on days 3, 7 and 10 from groups III and IV. Total DNA was extracted from the samples, and used for the detection of viral DNA with PCR method. For amplification, two primers, specific for the fragment of A gene of MDV 3 serotype were used. No influence of in ovo vaccination on hatching was observed. Percentage of hatched chicks after in ovo vaccination was 85.7% and in the control group 87.3%. Chicks were healthy and well-developed. Viral DNA was found in the blood and lungs in group I about 3 hours after hatching, and was detected on the third day of life in blood, liver, spleen, lungs and kidneys of birds from group I as well as in blood samples from group II. From the 7<sup>th</sup> day of life characteristic for HVT FC 126 product (434 bp) was observed in all the samples collected from group I. It was subsequently detected in blood, spleen and lungs on the 7<sup>th</sup> day of life and in the bursa of Fabricius and liver on the 10<sup>th</sup> day of life in group III. Viral DNA was not found in samples taken from the heart and kidneys.

**Keywords:** Marek's disease, vaccination

Choroba Mareka (MD) jest to nowotworowa choroba drobiu o etiologii wirusowej, stanowiąca poważne źródło strat w wielkostadnej produkcji drobiarskiej. Najbardziej wrażliwe na zakażenie wirusem choroby Mareka (MDV) są pisklęta w pierwszych dniach życia. Podobnie jak w przypadku innych chorób wirusowych jedyną formą zapobiegania tej chorobie jest immunoprofilaktyka. Stosowane są szczepionki żywe homologiczne oparte na atenuowanym szczepie Rispens CVI 988, na naturalnie apatogennym szczepie SB1 oraz heterologiczne, zawierające indycki herpeswirus HVT FC 126, a także szczepionki biwalentne zawierające zarówno szczep HVT FC126, jak i szczep Rispens. Szczepienie nie zabezpiecza przed zakażeniem zjadliwym wirusem, po zakażeniu w organizmie

szczepionego ptaka odbywa się swoisty „wyścig” pomiędzy wirusem szczepionkowym a zjadliwym terenowym. Jeśli wygra wirus szczepionkowy, ptak jest zabezpieczony przed skutkami zakażenia, jeżeli natomiast wygra wirus terenowy, następuje rozwój choroby. Mechanizm tego nie jest w pełni wyjaśniony. Wiadomo, że szczepy szczepionkowe po wprowadzeniu do organizmu ptaka replikują się i powstaje wiremia trwająca przez całe życie. Wirus szczepionkowy ogranicza namnażanie się terenowego szczepu wirusa MD, którego wiremia oraz zasiedlenie i replikacja w brodawkach piór są znacznie uboższe. Następuje zmniejszenie siewstwa wirusa do środowiska i ograniczenie rozprzestrzeniania się zakażenia wśród kurcząt. Ponadto zredukowana jest możliwość powstania latent-

nej infekcji i uszkodzenia tkanek limfatycznych oraz wywołania zmian w nerwach i narządach wewnętrznych (3, 8, 10).

Z mechanizmu działania szczepionek przeciwko chorobie Mareka wynika konieczność jak najszybszego wprowadzenia do organizmu ptaka szczepu szczepionkowego. Dlatego szczepieniu poddaje się jednodniowe pisklęta, którym wprowadza się domięśniowo lub podskórnie wirus szczepionkowy bądź wykonuje się szczepienia *in ovo* 18-dniowych zarodków (3, 5, 11).

Celem badań było porównanie okresu pojawiania się i lokalizacji w narządach wewnętrznych piskląt wirusa szczepionkowego HVT FC 126 po szczepieniu metodą *in ovo* oraz po szczepieniu jednodniowych piskląt.

### Materiał i metody

**Zarodki kurze.** Do doświadczenia użyto 100 zarodków kurzych SPF (Lohmann, Niemcy), w wieku 18 dni. Zarodki inkubowano do wylęgu w aparacie firmy Jamesway (USA) w temperaturze 37,8°C i wilgotności około 70%.

**Szczepionka.** Zastosowano komercyjną, liofilizowaną szczepionkę przeciwko chorobie Mareka, zawierającą heterologiczny, apatogenny herpeswirus indyjski HVT FC 126 (Merial, Francja). Rozpuszczano ją w rozcieńczalniku do szczepionki, zgodnie z zaleceniem producenta.

**Izolacja całkowitego DNA z narządów wewnętrznych kurcząt.** Do izolacji całkowitego DNA stosowano po 500 µl homogenizatów przygotowanych z wątroby, śledziony, płuc, mięśnia sercowego, nerek i torby Fabrycjusza indywidualnie od każdego ptaka. Przeprowadzano ją przy użyciu zestawu komercyjnego A@A Biotechnology, zgodnie z metodyką podaną przez producenta. Uzyskane całkowite DNA pulowano, aby z danej grupy piskląt, w wyznaczonym terminie badania, z każdego narządu uzyskać 1 próbkę. Do dalszych badań DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

**Izolacja całkowitego DNA z krwi kurcząt.** Do izolacji stosowano próbki po 500 µl krwi pobranej do probówek zawierających 100 µl 0,25% roztworu heparyny. Bezpośrednio po pobraniu przeprowadzano izolację całkowitego DNA, którą wykonywano przy użyciu zestawu komercyjnego firmy A&A Biotechnology wg metodyki producenta.

**Oligonukleotydy (startery).** Zastosowano parę starterów specyficznych dla genu A szczepu HVT FC 126. Startery o sekwencji: PMDV 4A: 5' GTT CTA CCG GAC TGC CGC TCG 3'; PMDV 4B: 5' ACA TTC TTT TGG TTG GCG TGG TAT 3' zostały zsyntetyzowane w IBB PAN w Warszawie.

**Amplifikacja DNA.** Reakcję amplifikacji przeprowadzano w 50 µl mieszaniny reakcyjnej o składzie: 2 µl każdego ze starterów; 5 µl buforu do PCR, 2 µl dNTPs, 1 µl polimerazy DNA, 5 µl wyizolowanego DNA oraz 33 µl wody dejonizowanej. Stosowano następujące parametry reakcji amplifikacji: denaturacja wstępna - 96°C - 2 min.; denaturacja właściwa - 94°C - 1 min.; przyłączanie starterów - 52°C - 30 s.; wydłużanie łańcucha - 72°C - 30 s.; końcowe wydłużanie łańcucha - 72°C - 10 min.

**Analiza produktów PCR.** Produkty PCR analizowano po przeprowadzeniu rozdzielania elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym. Do baseników w żelu nanoszono po 5 µl mie-

szaniny poreakcyjnej i 2 µl buforu obciążającego. Wzorzec masowy stanowił DNA plazmidu pUC19 (DNA Gdańsk). Elektroforezę przeprowadzano w buforze elektrodowym 1 × TBE przez 1 h przy napięciu 10 V/cm długości żelu. Następnie żel barwiono w roztworze bromku etydyny (1 µg/ml) i porównywano drogę migracji prążków z produktami PCR z zastosowanym wzorcem masowym DNA.

**Układ doświadczenia.** 45 zarodkom w 18. dniu inkubacji, podczas przekładania ich do komory klujnikowej podano 0,05 ml szczepionki zawierającej 2400 pfu wirusa. Szczepionkę podano 28 zarodkom w okolicę grzbietu, 17 zarodkom wprowadzono ją do płynów zarodkowych. Z zarodków szczepionych dogrzebietowo wykuło się 25 piskląt oznaczonych jako grupa I, z zarodków szczepionych do płynów zarodkowych otrzymano 15 piskląt - była to grupa II. Z pozostałych 55 zarodków nie szczepionych wykuło się 48 piskląt, które podzielono na dwie grupy. 30 pisklątom w 3 h po wylęgu podano domięśniowo w mięsień udowy lewej nogi taką samą dawkę wirusa szczepionkowego, jak zarodkom. Pisklęta te stanowiły grupę III. Grupę IV kontrolną stanowiło 18 piskląt nie szczepionych. Układ doświadczenia przedstawiono w tab. 1.

Pisklęta odchowywano w izolowanych pomieszczeniach i obserwowano przez 10 dni. W terminach podanych w tab. 1 skrwawiano po 5 ptaków z poszczególnych grup i pobierano indywidualnie próbki krwi oraz wycinki wątroby, śledziony, płuc, serca, nerek i torby Fabrycjusza. W materiałach tych określano obecność DNA wirusa szczepionkowego HVT FC 126.

Tab. 1. Układ doświadczenia

Grupa	Liczba zarodków	% wylęgu	Liczba piskląt w grupie	Sposób podania szczepionki	Terminy pobierania próbek
I	28	85,7	25	grzbiet zarodka	1., 3., 7. i 10. dzień życia
II	17	88,2	15	płyny zarodkowe	1., 3. i 10. dzień życia
III	55	87,3	30	1. dzień życia	3., 7. i 10. dzień życia
IV			18	nie szczepione	3., 7. i 10. dzień życia

### Wyniki i omówienie

Zabieg szczepienia, jak również wirus szczepionkowy HVT FC126 nie miały wpływu na wyniki lęgow. Nie notowano zwiększonej zamieralności zarodków ani anomalii w rozwoju zarodka. Odsetek wylęzonych piskląt poddanych szczepieniu *in ovo* wynosił 85,7 (tab. 1). Z 55 zarodków nie szczepionych podczas inkubacji wykuło się 48 piskląt (87,3%). Wszystkie pisklęta były zdrowe, żywotne, wykazujące zainteresowanie wodą i paszą.

U piskląt szczepionych *in ovo* z grupy I obecność DNA wirusa stwierdzano we krwi oraz w płucach już około 3 h po wylęgu (tab. 2, ryc. 1a). Otrzymany prążek produktu PCR posiadał wielkość 434 bp i był charakterystyczny dla szczepu HVT FC 126. W tym samym terminie u piskląt z grupy II obecność DNA wirusa szczepionkowego stwierdzono we krwi. W 3. dniu

**Tab. 2. Obecność wirusa szczepionkowego HVT FC 126 w narządach wewnętrznych kurcząt szczepionych *in ovo* oraz w pierwszym dniu życia**

Badany narząd	Grupa I				Grupa II			Grupa III			
	1.	3.	7.	10.	dni życia			3.	7.	10.	
Krew	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
Wątroba	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	
Śledziona	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	
Płuca	+	+	+	+	nb	nb	nb	-	+	+	
Serce	-	-	+	+	nb	nb	nb	-	-	-	
Nerki	-	+	+	+	nb	nb	nb	-	-	-	
Torba Fabrycjusza	-	-	+	+	nb	nb	nb	-	-	+	

Objaśnienie: nb – nie badano

życia obecność jego wykryto we krwi, wątrobie, śledzionie, płucach oraz nerkach ptaków z grupy I oraz we krwi ptaków z grupy II. Od 7. dnia życia ptaków produkt PCR o wielkości 434 bp uzyskiwano we wszystkich badanych narządach wewnętrznych ptaków I grupy (tab. 2, ryc. 1b).

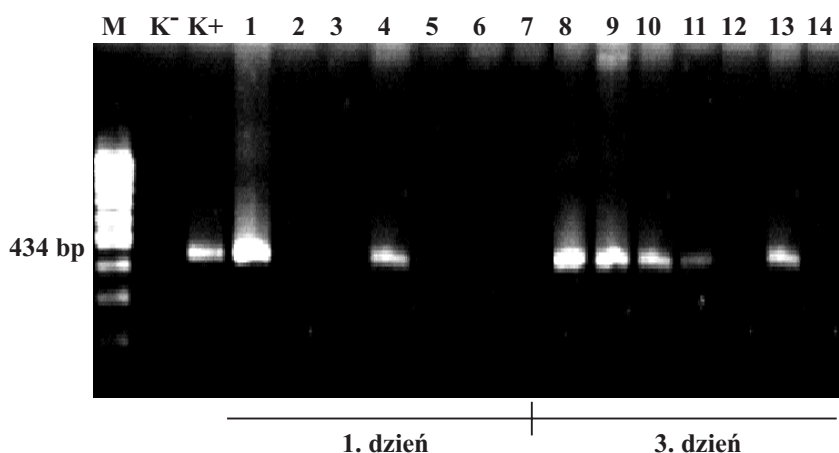
Dla porównania, u piskląt szczepionych w pierwszym dniu życia (grupa III) występowanie wirusa szczepionkowego HVT FC 126 notowano dopiero od 7. dnia życia (tab. 2, ryc. 2a i 2b). W tym terminie obecność DNA wirusa szczepionkowego stwierdzano we krwi, śledzionie i płucach ptaków. W 10. dniu życia ptaków był on wykrywany we krwi, wątrobie, śledzionie, płucach i torbie Fabrycjusza. Natomiast do 10. dnia trwania doświadczenia w mięśniu sercowym oraz nerkach nie stwierdzano obecności wirusa. We krwi i narządach wewnętrznych ptaków z grupy IV kontrolnej nie stwierdzano DNA wirusowego przez cały okres doświadczenia.

Zastosowanie w badaniach metody PCR pozwoliło na detekcję wirusa we wczesnej fazie infekcji komórek. Dużą zaletą tej metody jest jej wysoka specyficzność i czułość, która wynosi dla zastosowanej pary starterów ok. 10 pfu wirusa w próbce. W porównaniu do klasycznych metod wirusologicznych metoda ta jest mniej pracochłonna, a wyniki uzyskuje się w znacznie krótszym czasie. Do wykrywania DNA herpeswirusa indyjskiego HVT FC 126 w narządach wewnętrznych szczepionych ptaków użyto pary starterów specyficznej dla fragmentu genu A serotypu 3. Kodowana przez ten gen glikoproteina C uważana jest za jeden z głównych antygenów wirusowych (2, 8, 10).

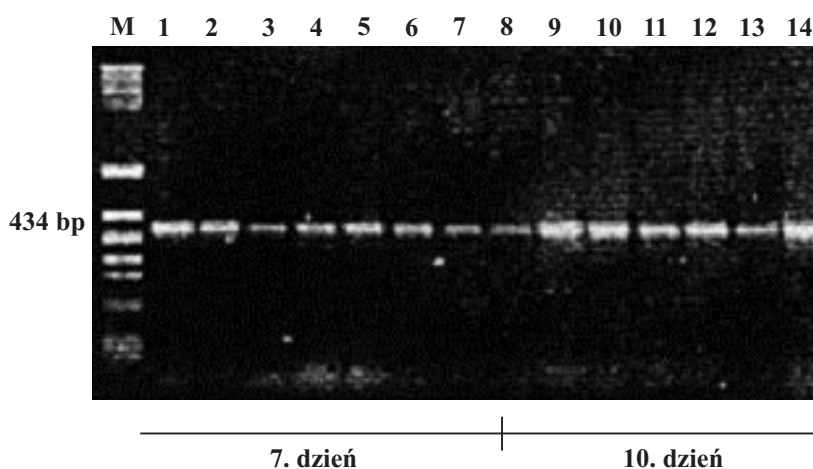
Zarodki kurze w 18. dniu inkubacji są już immunologicznie kompetentne. Sharma i Burmester (11) wykazali, że szczepienia *in ovo* przeciwko chorobie Mareka nie wpływają na wyniki lęgów, a pisklęta szczepione tą metodą są wcześniej zabezpieczone przed chorobą Mareką niż pisklęta szczepione tradycyjnie w pierwszym dniu życia. Okres potrzebny do zabezpieczenia piskląt przed skutkami zakażenia wirusem MD po szczepieniu *in ovo* ulega skróceniu i wynosi około 3 dni. Natomiast podanie szczepionki w pierwszym dniu życia powoduje wytworzenie wiremii po 7 dniach od szczepienia. Inni autorzy (1, 6, 9) również nie obserwowali obniżenia odsetka wylęgowości, pisklęta były zdrowe, rozwinięte prawidłowo, a w czasie odchowu notowano mniejszy odsetek padnięć i lepsze efekty wykorzystania paszy w porównaniu do ptaków szczepionych tradycyjnie w pierwszym dniu życia.

Skuteczność szczepień *in ovo* zależy od wieku szczepionych zarodków. Badania Sharmy i Burmestera (11) oraz Fabrisa i wsp. (4) wykazały, że szczepienie prze-

a) 1.-3. dzień życia



b) 7.-10. dzień życia



**Ryc. 1. Wykrywanie DNA wirusa HVT FC 126 w narządach wewnętrznych ptaków szczepionych *in ovo* – rozdziel elektroforetyczny produktów PCR. Ścieżki: 1 – krew, 2 – wątroba, 3 – śledziona, 4 – płuca, 5 – serce, 6 – nerki, 7 – torba Fabrycjusza, 8 – krew, 9 – wątroba, 10 – śledziona, 11 – płuca, 12 – serce, 13 – nerki, 14 – torba Fabrycjusza**

ciwko chorobie Mareka 17. lub 18. dnia inkubacji lepiej chroni pisklęta niż szczepienie między 8.-16. lub 19.-20. dniem inkubacji. Właściwy termin szczepienia pokrywa się więc z czasem przekładu jaj z komór lęgowych do klujnikowych.

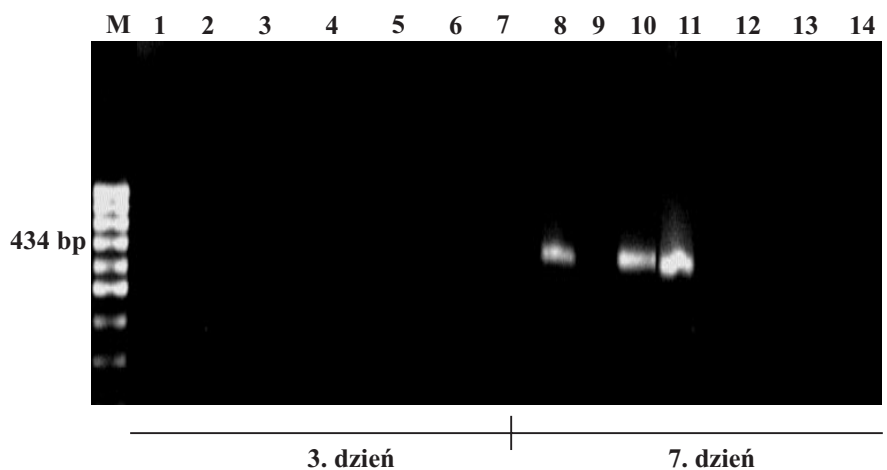
Na rozwój wirerii wirusa szczepionkowego istotny wpływ ma miejsce podania szczepionki zarodkom. Badania przeprowadzone przez Zhanga (13) oraz Islama (6) wykazały, że szczepienie wykonane w okolicę grzbietu zarodka indukowało znacznie lepszą ochronę piskląt, ponieważ już w 2 dni p. v. około 71% ptaków było wiremicznych i zabezpieczonych przed zakażeniem kontrolnym zjadliwym szczepem MD. Wprowadzenie szczepionki do płynów zarodkowych w tym samym czasie powodowało wiramię tylko u około 25% ptaków. Jest to związane z rozcieńczeniem szczepionki w płynach zarodkowych oraz możliwością działania przeciwwirusowego płynów w stosunku do wirusa szczepionkowego (1, 12).

Reasumując, szczepienie *in ovo* przeciwko chorobie Mareka zarodków w 18. dniu inkubacji nie ma ujemnego wpływu na ich rozwój oraz wylęgowość. Zastosowane startery oraz warunki przeprowadzania PCR pozwoliły na wykrycie produktu o wielkości 434 bp charakterystycznego dla szczepu HVT w narządach wewnętrznych piskląt. W ten sposób wykazano obecność szczepu HVT we krwi i płucach jednodniowych piskląt szczepionych *in ovo*, natomiast u piskląt szczepionych po wylęgu obecność wirusa HVT notowano od 7. dnia życia. Na tej podstawie można wnioskować, że pisklęta szczepione *in ovo* są wcześniej zabezpieczone przed chorobą Mareka niż pisklęta szczepione w sposób tradycyjny.

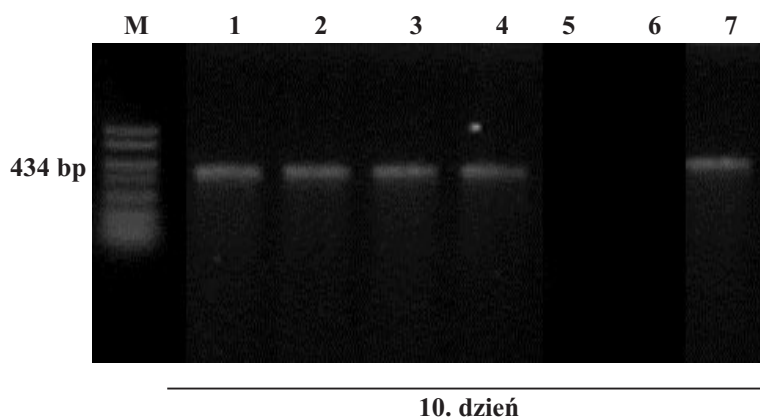
## Piśmiennictwo

1. Baines D.: Szczepienia *in ovo* w immunoprofilaktyce choroby Mareka i zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza. Mat. Symp. System INOVOJECT – aktualne możliwości i perspektywy zastosowań w praktyce drobiarskiej. Warszawa 1998, s. 21-23.
2. Becker Y., Asher Y., Tabor E., Davidson I., Malkinson M., Weisman Y.: Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDV) and vaccine viruses of MDV-serotypes 2 and 3. J Virol. Methods 1992, 40, 307-322.
3. Davison F., Venugopal N.: Marek's Disease – An Evolving Problem. Elsevier Academic Press, Institute for Animal Health, Compton Laboratory, UK 2004, s. 124.
4. Fabris G., Patarello J., Figarolli V.: *In ovo* Marek's vaccination. Europ. Poultry Conf., Glasgow 1994, s. 345-347.
5. Garcia-Camacho L., Schat K. A., Brooks R., Bounous D. I.: Early cell-mediated immune responses to Marek's disease virus in the chickens lines with defined MHC. Vet. Immunol. Immunopathol. 2003, 95, 145-153.

### a) 3.-7. dzień życia



### b) 10. dzień życia



**Ryc. 2. Wykrywanie DNA wirusa HVT FC 126 w narządach wewnętrznych ptaków szczepionych w pierwszym dniu życia – rozdział elektroforetyczny produktów PCR**

Ścieżki: 1 – krew, 2 – wątroba, 3 – śledziona, 4 – płuca, 5 – serce, 6 – nerki, 7 – torba Fabrycjusza, 8 – krew, 9 – wątroba, 10 – śledziona, 11 – płuca, 12 – serce, 13 – nerki, 14 – torba Fabrycjusza

6. Islam A. F. M., Waldken-Brown S. W., Wong C. W., Groves P. J., Burgess S. K., Arzey K. E., Young P. L.: Influence of vaccine deposition site on post-vaccinal viraemia and vaccine efficacy in broiler chickens following *in ovo* vaccination against Marek's disease. Avian Pathol. 2001, 30, 525-533.
7. Miles A. M., Williams C. J., Womack C. L., Murray D. L., Gildersleeve R. P.: Commercial broilers studies of Marek's disease vaccination *in ovo*. Proc. of the XIX World's Congress, Amsterdam, September 20-24, 1992, s. 320-322.
8. Samorek-Salamonowicz E.: Choroba Mareka, [w:] Mazurkiewicz M. (red.): Choroby drobiu. Wyd. AR Wrocław 2005, s. 425.
9. Sarma G., Greer W., Gildersleeve R. P., Murray D. L., Miles A. M.: Field safety and efficacy of *in ovo* administration of HVT + SB 1 bivalent Marek's disease vaccine in commercial broilers. Avian Dis. 1995, 39, 211-217.
10. Schat K. A., Markovski-Grimsrud C. J.: Immune responses to Marek's disease virus infection. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2001, 255, 91-120.
11. Sharma J. M., Burmester B. R.: Resistance to Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. Avian Dis. 1982, 26, 134-149.
12. Walkden-Brown S. W., Islam A. F. M. F., Wong C. W., Burgess S. K., Groves P. J., Azrey E.: Vaccine deposition site influences the timing of post-vaccinal viremia following *in ovo* vaccination against Marek's disease (MD) in commercial broiler chickens. Proc. 6<sup>th</sup> Int. Symp. Marek's disease, Montreal, Canada, August 20-23, 2000, s. 22-24.
13. Zhang Y., Sharma J. M.: Immunological tolerance in chickens hatching from eggs injected with cell-associated herpesvirus of turkey (HVT). Dev. Comp. Immunol. 2003, 27, 431-438.

Adres autora: prof. dr hab. Elżbieta Samorek-Salamonowicz, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: elsam@piwet.pulawy.pl