



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41381 (13) C2

(51) 7 A61B10/00, A61K39/012

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ВАКЦИНАЦІЇ ПТИЦІ IN OVO ПРОТИ КОКЦИДІОЗУ

(21) 96062189

(22) 04.06.1996

(24) 17.09.2001

(31) PCT/IB95/00446

(32) 07.06.1995

(33) IB

(46) 17.09.2001, Бюл. № 8, 2001 р.

(72) Еванс Найджел А., US, Фіндлі Р. Крейг, US,
Вебер Фредерік Х., US

(73) ПФАЙЗЕР ІНК., US

(56) EP 0291173, A, 17.11.88.

K.L. Watkins et al. 6, International Coccidiosis Conf.,
Abstract E 1-2, Ontario, Canada, 1993.

US 4639372, A, 27.01.87.

US 5055292, A, 08.10.91.

Шевцов А.А. и др. Паразитология. — М.: Агропром-
издат, 1985. — С. 357-359

(57) 1. Способ вакцинации птицы против кокцидиоза, предусматривающий инъекцию эффективной иммунизирующей дозы вакцины, содержащей иммуноген *Eimeria* in ovo в последней четверти инкубации, **отличающийся** тем, что в качестве иммуногена указанной вакцины используют живые спорозоиты или мерозоиты или их смесь.

2. Способ по п. 1, **отличающийся** тем, что доза содержит от 10^4 до 10^6 , или от 10^3 до 10^6 , или от 10^2 до 10^5 спорозоитов или мерозоитов, или их смесь, в которой общее количество указанных спорозоитов и мерозоитов составляет от 10^4 до 10^6 , или от 10^3 до 10^6 , или от 10^2 до 10^5 .

3. Способ по п. 2, **отличающийся** тем, что указанной птицей является курица.

4. Способ по п. 3, **отличающийся** тем, что доза содержит спорозоиты или мерозоиты, или их смесь, двух или нескольких видов *Eimeria*, выбранных из группы, состоящей из *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. mitis*, *E. precox*, *E. brunetti*.

5. Способ по п. 2, **отличающийся** тем, что дополнительно предусматривают введение in ovo иммуностимулятора в любой момент периода инкубации.

6. Способ по п. 2, **отличающийся** тем, что указанный иммуностимулятор вводят in ovo одновременно с дозой спорозоитов или мерозоитов, или их смеси.

7. Способ по п. 2, **отличающийся** тем, что перед их включением в иммунизирующую дозу, спорозоиты очищают от спороцист и ооцист перед их включением в иммунизирующую дозу.

8. Способ по п. 2, **отличающийся** тем, что указанная птица является индейкой.

9. Способ по п. 8, **отличающийся** тем, что доза содержит спорозоиты или мерозоиты, или их смесь, двух или более видов *Eimeria*, выбранных из группы, состоящей из *E. meleagris-mitis*, *E. adenoeides*, *E. gallapavonis*, *E. dispersa*, *E. meleagridis*, *E. innocua*, *E. subrotunda*.

10. Способ по п. 2, **отличающийся** тем, что птицей является охотничье-промысловая птица, утка или бескилевые.

Настоящее изобретение относится к методу вакцинации домашних птиц против кокцидиоза. В частности, изобретение относится к введению in ovo живых спорозоитов или мерозоитов видов *Eimeria* или их смесей в развивающиеся яйца домашней птицы с целью иммунизации вылупившихся птенцов против кокцидиоза.

Кокцидиоз является кишечным заболеванием домашних птиц, вызванным заражением внутриклеточными простейшими паразитами рода *Eimeria*. Кокцидиоз является паразитарным заболеванием домашних птиц, которое наносит наиболее ощутимый экономический ущерб. Установлено, что лечение кокцидиоза и потери из-за него обхо-

дятся птицеводству в сотни миллионов долларов ежегодно.

Известно, что уже с начала 1950-х годов предпринимались различные попытки вакцинировать домашних птиц против кокцидиоза. Применяющиеся в настоящее время методы вакцинации включают введение живых ооцист *Eimeria* птицам с кормом или водой. Однако, эти методы неудобны и неэффективны, поскольку не все птицы получают предполагаемую дозу ооцист и многие либо остаются защищены вакциной, либо получают патогенное заражение.

В J.M. Sharma и B.R. Burmester, в Avian Dis., 26:134-149, 1981, авторы констатируют, что куры, вакцинированные in ovo вирусом герпеса индейки,

(11) 41381 (13) C2
(19) UA

выработали иммунитет против последующего контрольного заражения вирусом болезни Марека. В европейской патентной публикации № 291173 описывается процесс иммунизации, в котором нереплицирующий иммуноген вводят *in ovo*. Иммуногенами, указанными конкретно в европейском патенте, являются полученный методом генной инженерии антиген *Eimeria* и экстракт ооцисты *Eimeria*. В Европейском патенте подчеркивается, что живые стадии паразита, такие, как те, которые используются в методе вакцинации, заявленном здесь, исключаются.

Предлагаемый метод вакцинации заключается в введении *in ovo* живых спорозоитов или мерозоитов *Eimeria* или их смеси в развивающиеся яйца домашних птиц. В известной литературе по данному вопросу содержится указание, что такой метод вакцинации будет неэффективным *in ovo* и его следует применять после вылупления птенцов. В Т.К. Jeffers и G.E. Wagenbach в J. Parasit. 56/4:656-662, 1970, сообщается, что инъекция *in ovo* спорозоитов *E. tenella* на 10 день инкубации не дала какой-либо значительной иммунологической защиты против последующего контрольного заражения ооцистами *E. tenella*. Фактически, они констатировали, что птенцы, не прошедшие такое лечение, имели лучшие показатели выживания против последующего контрольного заражения ооцистами *E. tenella*, чем птенцы, которым спорозонты вводились *in ovo*. В K.L. Walkins и др., Proc. VI, International Coccidiosis Conf., Abstract: EI-2, Ontario, Canada, 1993, авторы описали инокуляцию *in ovo* живыми спорозонтами и спорулированными ооцистами *E. maxima* и пришли к выводу, что их исследование не дало доказательств того, что введение *in ovo* обеспечивает защиту против последующего кокцидиального контрольного заражения ооцистами *E. maxima* через 10 дней после вылупления.

Watkins и др. сделали вывод, что существенная иммунологическая защита обеспечивается, когда инокуляция делается вскоре после вылупления птенцов, а не *in ovo*. В противоположность этому утверждению метод вакцинации *in ovo* по настоящему изобретению неожиданно обеспечивает иммунитет, который защищает вылупившихся птиц против последующего контрольного заражения кокцидиозом.

Содержание изобретения

Настоящее изобретение, именуемое здесь как "данный метод вакцинации", относится к способу вакцинирования домашней птицы против кокцидиоза, включающему введение *in ovo* во время последней четверти периода инкубации эффективной иммунизирующей дозы живых спорозоитов или мерозоитов *Eimeria* или их смеси.

Термин "домашняя птица (ы)" здесь, если не указано иначе, включает кур, индеек, уток, охотничье-промысловую птицу (включая, (но неограничиваясь) перепелов, фазанов и гусей) и бескилевых (включая (но не ограничиваясь ими) страусов); термин "*in ovo*", здесь, если не указано иначе, означает "в яйцо домашней птицы", содержащее живой развивающийся эмбрион.

Термин "введение *in ovo*" или "*in ovo* введение", здесь, если не указано иначе, означает введение описанной здесь вакцины в яйцо домашней

птицы, содержащее живой развивающийся эмбрион, любым путем проникновения через скорлупу яйца и введения вакцины. Такие способы введения включают, но не ограничены до инъекции вакцины.

Термин "последняя четверть срока инкубации" здесь, если не указано иначе, означает последнюю четверть инкубации развивающегося яйца домашней птицы.

Термин "*Eimeria*" здесь, если не указано иначе, означает один или несколько видов рода *Eimeria*, которые заражают домашних птиц. Такие виды *Eimeria* включают те, которые выявлены у кур, это *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. mitis*, *E. praecox* и *E. brunetti*, те, которые выявлены у индеек, такие как *E. meleagridis*, *E. adenoides*, *E. gallopavonis*, *E. dispersa*, *E. meleagris*, *E. inopinata*, и *E. subrotunda*, а также виды *Eimeria* которые заражают других домашних птиц, упомянутых выше. Термин "*Eimeria*" включает также все штаммы указанных выше видов *Eimeria*, включающие, но не ограниченные до преждевременно развившихся и ослабленных штаммов, которые включают штаммы, подвергшиеся облучению или какой-либо другой обработке, в результате чего они не проходят стадии полного развития. Термин *Eimeria* включает также любые вновь открытые штаммы или виды *Eimeria*, которые заражают домашних птиц, как указывалось выше.

Термины "спорозонты", "спороцисты", "ооцисты", и "мерозонты" здесь, если не указано иначе, означают живых спорозоитов, спорозист, ооцист и мерозоитов *Eimeria*.

Термин "эффективная иммунизирующая доза" здесь, если не указано иначе, означает количество спорозоитов или мерозоитов, или в случае смешивания - количество спорозоитов и мерозоитов, достаточное, чтобы обеспечить иммунологическую защиту у вылупившихся птиц, которая сильнее врожденного иммунитета неиммунизированных птиц. Т.о. здесь термины "иммунизировать" и "вакцинировать" являются синонимами и заменяют друг друга.

Предпочтительная доза, которая вводится в соответствии с методом изобретения, содержит 10^3 - 10^6 спорозоитов или мерозоитов, или их смесь, в которой общее количество указанных спорозоитов и мерозоитов составляет от 10^3 до 10^6 .

Наиболее предпочтительная доза содержит от 10^3 до 10^6 спорозоитов или мерозоитов, или их смесь, в которой общее количество указанных спорозоитов и мерозоитов колеблется от 10^3 до 10^6 .

Другая предпочтительная доза включает 10^2 - 10^5 спорозоитов или мерозоитов, или их смесь, в которой их общее количество составляет от 10^2 до 10^5 .

Метод по изобретению наиболее предпочтителен для вакцинации кур.

Лучше, если доза для введения *in ovo* в яйца кур будет включать спорозоиты или мерозоиты, либо их смесь, двух или нескольких видов *Eimeria* выбранных из группы, состоящей из *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. mitis*, *E. praecox* и *E. brunetti*. Предпочтительно доза включает от 10^3 до 10^6 спорозоитов или мерозоитов или их смесь для каждого вида, который входит в дозу.

Данный метод изобретения также хорош для вакцинации индеек.

Предпочтительная доза для введения *in ovo* в яйца индеек включает спорозоиты или мерозоиты или их смесь, двух или нескольких видов *Eimeria* выбранных из группы, состоящей из *E. meleagridis*, *E. adenoeides*, *E. gallopavonis*, *E. dispersa*, *E. meleagridis*, *E. innocua*, и *E. subrotunda*. Доза предпочтительно включает от 10 до 10^6 спорозоитов или мерозоитов, или их смесь для каждого вида, который входит в дозу.

Другими предпочтительными одомашненными птицами для вакцинации в соответствии с методом изобретения являются охотничье-промысловые птицы, утки и бескилевые.

Метод изобретения включает далее введение *in ovo* иммунного стимулятора в комбинации с методом вакцинации в любое время в течение периода инкубации.

Иммунный стимулятор лучше вводить одновременно с введением *in ovo* дозы спорозоитов или мерозоитов, либо их смеси в последней четверти инкубационного периода.

Подробное описание изобретения

Настоящий метод вакцинации включает введение *in ovo* в последней четверти инкубации живых спорозоитов или мерозоитов, либо их смеси в яйца домашних птиц. Если это куры, введение *in ovo* лучше делать на 15-20 дни инкубации, предпочтительно на 18 день. Если это индейки, введение *in ovo* делают на 21-26 дни периода инкубации.

При этом можно использовать любой приемлемый способ введения *in ovo*. Лучше данную вакцину вводить инъекцией. В соответствии с одним способом инъекции, на большем конце яйца в яичной скорлупе делают отверстие иглой номер 18 с тем, чтобы открыть воздушную полость яйца. Иглу 22 номера длиной 1,0-1,5 дюйма (2,5 – 3,8 см), надетую на шприц соответствующего объема (1-3 мл), можно ввести через отверстие и через мембрану воздушной ячейки. Нужное количество спорозоитов или мерозоитов, либо их соответствующее количество в смеси, суспендируют в подходящем жидком носителе, например, 10-500 мкл физраствора с фосфатным буфером, и затем вводят в яйцо. Нужный объем зависит от размера яйца, естественно, яйца страуса потребуют большего объема, чем яйца кур. Участок инъекции может быть любым участком яйца или эмбриона. Инъекцию лучше делать аксиально через центр большого конца яйца в амнион.

В настоящем методе вакцинации возможно применение автоматизированной системы инъекции яйца. Такие системы описаны в патентах США № 4681063, 4040388, 4469047 и 4593646, которые включены в качестве ссылки. Другие подходящие методы инъекций известны специалистам данной области.

Ооцисты можно получить любым из нескольких методов, известных специалистам. Такие методы включают методы, описанные J.F. Ryley и др., в *Parasitology*, 73:311-326, 1976 и P.L. Long и др., *Folia veterinaria Latina* Y1#3, 201-217, 1976, которые также включены для ссылки. По одному из методов, промышленных бройлерных цыплят возрастом приблизительно в 2 недели, инфицируют

нужными видами *Eimeria* оральным введением соответствующей дозы спорулированных ооцист. Например, типичная доза для *E. tenella* составляет 200,000 спорулированных ооцист/птицу. Затем следуют хорошо известные процедуры сбора и очистки ооцист из инфицированных птиц. Для большинства видов *Eimeria* фекалии от инфицированных птиц собирают на 5-7 дни после заражения, их смешивают и фильтруют для удаления остатков органических веществ, затем подвергают центрифугированию со скоростью достаточной, чтобы получить осадок остающегося фекального материала. Для *E. tenella* используют аналогичную процедуру, за исключением того, что содержимое из слепой кишки берут на 6 день после заражения. Осадок вновь суспендируют в насыщенном солевом растворе, в котором ооцисты всплывают и большую часть примесей органических остатков можно удалить центрифугированием. Затем суспензию ооцист разбавляют до более низкой солевой концентрации. Ооцисты промывают несколько раз, чтобы удалить соль и вновь суспендируют в растворе бихромата калия (2,5% вес/об.). Суспензию ооцист инкубируют при 29°C при встряхивании (например, 140 об/мин) в течение приблизительно 72 часов для индуцирования споруляции ооцист. В другом варианте ооцисты можно обработать гипохлоритом натрия, а затем спорулировать. Число спорулированных ооцист на мл определяют прямым подсчетом, используя гемоцитометр, и культуру хранят до применения желательного на холоде.

Чтобы получить спорозисты, бихромат калия удаляют из суспензии ооцист, описанной выше, повторным промыванием ооцист, которое предполагает сбор ооцист центрифугированием и повторное суспендирование в деионизированной или дистиллированной воде. Когда бихромат удален, о чем можно судить по отсутствию желтовато-оранжевой окраски, суспензию ооцист смешивают с равным объемом гипохлорита натрия (отбеливатель) и инкубируют при комнатной температуре 15 минут. Потом отбеливатель удаляют повторными промываниями и ооцисты вновь суспендируют в физрастворе или деионизированной воде. Для высвобождения спорозист ооцисты разрушают, используя множество известных способов. Например, ооцисты можно разрушить и высвободить спорозисты смешивая ооцисты со стеклянными шариками диаметром 1-4 мм встряхиванием рукой, вихревой мешалкой или встряхиванием инкубатора, либо с применением ручного гомогенизатора. Неразрушенные ооцисты и их оболочки можно отделить от освобожденных спорозист дифференциальным центрифугированием в 50% Percoll (от Pharmacia Biotech) или 1 M сахарозе, как описано у Dulski и др., *Avian Diseases*, 32:235-239, 1988.

Чтобы подготовить спорозоиты или препарат, богатый спорозоитами, для применения в соответствии с изобретением, спорозоиты извлекают (экспистируют) из препарата спорозист, описанного выше. По одной процедуре, спорозисты, полученные как описано выше, осаждают центрифугированием, повторно суспендируют в буфере для экспистирувания (0,5% тауродооксиголевая кислота и 0,25% трипсина в физрастворе с фосфатным

буфером, pH 8,0) и инкубируют со встряхиванием в течение одного часа при 41°C. В пробе полученной суспензии подсчитывают количество спорозоитов, спорозоиты промывают один раз для удаления буфера эксцистирования, и вновь суспендируют в физрастворе с фосфатным буфером с нужной концентрацией для введения *in ovo*. Этот препарат содержит спорозоиты, спороцисты и ооцисты и без дальнейшей очистки может применяться в настоящем методе вакцинации. Очищенные спорозоиты, отделенные от спороцист и ооцист, можно получить анионообменной хроматографией на DE-52, как описано у D.M. Schmatz и др. в J. Protozool., 31:181-183, 1984, которая также включена сюда для ссылки. Доза спорозоитов для применения в данном методе вакцинации будет различна, в зависимости от вида вакцинируемых птиц и применяемых в вакцине видов *Eimeria* в общем, доза может быть в пределах от 10^6 спорозоитов на яйцо. Предпочтительно пределы дозы составляют от 10^4 до 10^5 спорозоитов на яйцо, а еще лучше - от 10^2 до 10^5 спорозоитов на яйцо.

Мерозоиты можно получить различными методами, известными специалистами. По одному из них спорозоитами инфицируют первичные почечные клетки цыпленка (РСК), которые выращивают в культуре в виде агрегатов клеток, с использованием модификации метода, описанного у D. J. Doran, в J. Parasit., 57:891-900, 1971, который приведен здесь для ссылки. РСК клетки выращивают при 40°C в 3% CO₂ в модифицированной RK2 среде - DMEM/F12 (DMEM - модифицированная по способу Дульбекко среда Игла) с L - глутамином и 15 mM HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота), дополненной фетальной околплодной коровьей сывороткой, пенициллином-стрептомицином, 15 mM бикарбоната натрия, 10 нг/мл эпидермального фактора роста, 5 мкг/мл инсулина, 5 мкг/мл трансферрина, 5 нг/мл селенистой кислоты и 0,01 μ M гидрокортизона в HCl, как описано у S. D. Chung и др. в J. Cell Biol., 95:118-126, 1982. Первичные почечные клетки готовят из почек 2-3^х недельных цыплят измельчением почки и затем обработкой ткани при 37°C 0,02 мг/мл коллагеназы (от Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ.) в физрастворе с фосфатным буфером в несколько циклов. Клеточные агрегаты в надстадном слое промывают, вновь суспендируют в модифицированной RK2 среде, содержащей 5% фетальную коровью сыворотку, и применяют для высевания тканевых культур с плотностью 10^5 агрегатов на см². Клетки РСК инкубируют 18 часов при 40°C в 3% CO₂, а потом инфицируют 4×10^5 спорозоитов/см². Инфицированные культуры выращивают в модифицированной RK2 среде, содержащей 2% фетальную коровью сыворотку. После 24 часов инкубации, времени, достаточного для инвазии, неинвазированные спорозоиты удаляют взбалтыванием колбы и удалением среды культуры. Клеточный слой один раз промывают модифицированной RK2 средой, содержащей 2% фетальную коровью сыворотку, и культуральную среду вновь удаляют. Добавляют свежую RK2 среду и культуры инкубируют еще 48-54 часа до тех пор, пока мерозоиты не высвободятся в культуральную среду.

Очистку мерозоитов с целью удаления остатков клеток хозяина можно провести любыми известными специалистам методами. В соответствии с одним из них, как описано у J.A. Olson, Antimicrob. Agents Chemother., 34:1435-1439, 1990, культуральную среду, содержащую высвобожденные мерозоиты, собирают и вращают при 450 оборотах в мин 10 минут для концентрирования мерозоитов. Пластинки осадка содержащего мерозоиты и органические остатки клеток хозяина, суспендируют в 0,1 M NaCl - 0,05 M KCl - 20% альбумине коровьей сыворотки и подают на анионообменную колонну DE-52, уравновешенную 75 mM Трис-40 mM NaH₂PO₄-86 mM NaCl-100 mM глюкозы при pH 8,2. Мерозоиты протекают через колонну. Собранные из колонны мерозоиты можно проверить на чистоту электронной микроскопией, как описано у A. Kilejian, в J. Biol. Chem., 249:4650-4655, 1974. В общем, доза мерозоитов может составлять от 10^4 до 10^6 мерозоитов на яйцо. Предпочтительно она колеблется от 10^4 до 10^5 мерозоитов на яйцо, а лучше, если она составляет 10^2 - 10^5 мерозоитов на яйцо. Если спорозоиты и мерозоиты смешивают, в общем, доза, включающая общее количество мерозоитов и спорозоитов, может составлять от 10^4 до 10^6 на яйцо. Лучше, если доза включает от 10^4 до 10^5 мерозоитов и спорозоитов на яйцо, а еще лучше - от 10^2 до 10^5 мерозоитов и спорозоитов на яйцо.

Спорозоиты или мерозоиты, либо их смесь можно ввести *in ovo* в любой физиологически приемлемой среде. Их желательно суспендировать в физиологически сбалансированном физрастворе, таком, как физраствор с фосфатным буфером. Выбранная среда может включать один или несколько суспендирующих агентов из ряда физиологически приемлемых гелей, желатинов, гидрозолей, целлюлоз или полисахаридных смол.

В настоящем методе вакцинации спорозоиты или мерозоиты, либо их смесь двух или нескольких видов *Eimeria* лучше вводить *in ovo* одновременно. При этом методе вакцинации спорозоиты или мерозоиты, либо их смесь, всех идентифицированных видов *Eimeria*, которые заражают конкретную домашнюю птицу, такую, как курица, можно ввести *in ovo* одновременно или серийно, с тем, чтобы обеспечить иммунологическую защиту против всех видов.

В методе вакцинации настоящего изобретения можно использовать иммунные стимуляторы. Подходящие иммунные стимуляторы включают, но не ограничиваются следующими: цитокины факторы роста, химокины, надосадочные слои клеточных культур лимфоцитов, моноцитов, или клеток от лимфоидных органов, клеточных препаратов или клеточных экстрактов (*Staphylococcus aureus* или препаратов липополисахарида), митогены или адьюванты, включающие низкомолекулярные фармацевтические средства. Иммунный стимулятор можно вводить *in ovo* в любое время в период инкубации. Иммунный стимулятор желательно вводить *in ovo* в среде, содержащей дозу спорозоитов или мерозоитов *Eimeria* или их смесь.

Эффективность настоящего изобретения в вакцинации против кокцидиоза иллюстрируется в следующих примерах. Каждую дозу вводили инъекцией *in ovo* в физиологически приемлемом рас-

творе соли как описано выше. Эффективность конкретного препарата определяли наблюдая его действие на показателе выведения птенцов и вес вылупившихся птенцов, и после контрольного заражения - образование ооцист, привес и патогенность (показатель поражения). Определения показателя поражения производили по протоколу, описанному у J.K. Johnson и W.M. Reid в *Exp. Parasitol.*, 28:30-36, 1970, в соответствии с которым величина 0 соответствует отсутствию заболевания и величина 4 представляет максимальную патологию.

Пример 1

На 18-й день инкубации в яйца кур делали инъекцию препарата, содержащего 10^5 спорозоитов *E. tenella* на яйцо. Препарат не был очищен от спороцист и ооцист. В каждой дозе содержалось приблизительно 10^4 *E. tenella* спороцист и около 10^4 ооцист *E. tenella*. В качестве контроля служили яйца, в которые делали инъекции только физраствора с фосфатным буфером. В популяции птиц, обработанных спорозоитами, средний выход ооцист на 7 день после выведения цыплят составил 1.1×10^6 ооцист/птицу. Неиммунизированных птиц и птиц, обработанных спорозоитами, подвергали контрольному заражению различными дозами спорулированных ооцист *E. tenella* введенных орально, на 7, 14 или 21 дни после выведения. Данные представлены в табл. 1.

Данные в табл. 1 ясно показывают, что иммунизированные птицы были менее подвержены заражению, чем их неиммунизированные выведенные сородичи, как указывают сниженные показатели поражений и улучшенные привесы у иммунизированных птиц. Данные также демонстрируют, что метод изобретения обеспечивает иммунитет цыплятам в относительно раннем возрасте (до семи дней после выведения). Кроме того, данные показывают, что иммунитет сохраняется с ростом и развитием цыплят. Получение иммунитета цыплятами в раннем возрасте обеспечивает существенное преимущество для промышленности

бройлерных цыплят, поскольку бройлеры, как правило, поступают в продажу по достижении 6 недель.

Пример 2

На 18 день инкубации в яйца кур делали инъекцию физраствора (контроль) или препаратов, содержащих различные дозы спорозоитов *E. tenella*, как указано в табл. 2, в которой представлены результаты, предвещающие контрольное заражение. Примененный препарат спорозоитов содержал на каждую дозу 62% спорозоитов, 9% спороцист и 29% ооцист. Каждая доза, содержащая 10^5 спорозоитов, включала в целом 1.6×10^5 различных стадий паразита (спорозоитов, спороцист и ооцист).

Данные в табл. 2 показывают, что цыплята, выведенные из яиц, в которые вводили живые спорозоиты, по своим показателям выведения и веса были фактически идентичны своим неиммунизированным сородичам. На 14 день после выведения цыплят подвергали контрольному заражению 1.25×10^4 спорулированных ооцист *E. Tenella* на птицу оральным введением. Результаты ответной реакции на контрольное заражение представлены в табл. 3.

Данные в табл. 3 показывают, что по каждому параметру (привес, показатель поражения, выход ооцист) цыплята, выведенные из яиц, в которые вводили различные дозы препарата спорозоитов, показали наличие иммунитета. В сравнении с контрольными птицами, которые обрабатывались только физраствором и которых подвергали контрольному заражению, птицы, иммунизированные препаратом спорозоитов, показали больший привес и сниженный показатель поражения. Кроме того, птицы, иммунизированные *in ovo* препаратом спорозоитов, имели меньший выход ооцист, чем контрольные птицы после контрольного заражения, указывая на то, что у иммунизированных птиц заражение было менее значительным.

Таблица 1

Иммунизированные птицы в сравнении с неиммунизированными:

Ответная реакция на различные дозы контрольного заражения в различные сроки после выведения

		Показатель поражения на 6 день после контрольного заражения		Привес в г на птицу за шестидневный период после контрольного заражения	
Группа ¹	Доза контрольного заражения (спорилизован ооцисты на птицу)	Неиммунизированные	Иммунизированные in ovo 10 ⁵ спорозоитами на 18 день инкубации	Неиммунизированные	Иммунизированные in ovo 10 ⁵ спорозоитами на 18 день инкубации
Контрольное заражение на 7 день после выведения	0	0	0	188	167
	2,5×10 ³	3,0	0,3 ^x	154	153
	5×10 ³	3,1	1,2 ^x	153	167
	1×10 ⁴	3,7	1,4 ^x	123	165 ^x
Контрольное заражение на 14 день после выведения	0	0	0	266	278
	2,5×10 ³	2,4	0,4 ^x	260	269
	5×10 ³	2,8	1,1 ^x	244	265
	1×10 ⁴	3,3	1,6 ^x	235	259
Контрольное заражение на 21 день после выведения	0	0,1	0	361	357
	2,5×10 ³	2,3	0,7 ^x	375	358
	5×10 ³	2,1	0,8 ^x	332	344
	1×10 ⁴	2,8	1,4 ^x	337	395 ^x

¹ Каждую группу подвергали одному контрольному заражению на 7, 14 или 21 дни после выведения, например, птиц, подвергнутых заражению на 21 день не заражали на 7 и 14 дни.

^xЗначительно отличается от неиммунизированных птиц (P<0.05, ANOVA)

Таблица 2

Влияние вакцинации in ovo на показатели выведения и вес

Количество спорозоитов на яйцо, введенное на 18 день инкубации	Показатель выведения (%)	Вес после выведения (в граммах)
0	94	48,2
0	94	48,0
10 ³	100	49,4
10 ⁴	97	47,0
10 ⁵	94	49,1

Таблица 3

Количество спорозоитов на яйцо, введенное на 18 день инкубации	Привес на птицу в течение шести дневного срока после контрольного заражения	Показатель поражения на шестой день после контрольного заражения	Выход ооцист на птицу (×10 ⁶) на 6 день после контрольного заражения
0	278	3,2	12,3
0	321	0	0,003 ^x
(Контроль, не подвергнутый контрольному заражению)			
10 ³	289	2,6 ^x	11,2
10 ⁴	291	2,7	12,2
10 ⁵	304 ^x	1,4 ^x	1,4 ^x

^x Значительно отличаются от неиммунизированной группы (получали физраствор), которая была подвергнута контрольному заражению (p<0,05 ANOVA).

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2002 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
