



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



„Projekt finansowany w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego dla Województwa Pomorskiego na lata 2007-2013”

WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOGENNE SZCZEPIONKI DO ZWALCZANIA SALMONELLOZ U KUR.

I. Odpowiedź serologiczna u kur szczepionych *per os* preparatem zawierającym zabite bakterie *Salmonella* i przeciwciała królicze.

RENATA GŁOŚNICKA*, ALEKSANDRA KOŚCIUK*, PIOTR BUGAJAK**, ANETA PUŁTORAK*, MONIKA MARCZAK***

* Zakład Badawczo-Wdrożeniowy Ośrodka Salmonella IMMUNOLAB Sp. z o.o., Al. Zwycięstwa 96/98, 81-451 Gdynia

** Prywatna Praktyka Weterynaryjna, Puławy.

*** Doradztwo Farmaceutyczne, Błonie

Przeprowadzone badania były dofinansowane z funduszy Unii Europejskiej w ramach **Działania/Poddziałania 1.2 Rozwiązania innowacyjne w MŚP Osi Priorytetowej 1 Regionalnego Programu Operacyjnego dla Województwa Pomorskiego na lata 2007 - 2013 pt. : „Opracowanie technologii wytwarzania nowej, na rynku Polskim szczepionki weterynaryjnej dla wybranych gatunków zwierząt, skierowanej przeciw określonym patogenom odzwierzęcym.”**

“The benefits of developing effective killed or subunit vaccines over the use of live vaccines are enormous” (Barrow & Wallis 2000).

„Korzyści płynące z pracy nad skutecznymi szczepionkami zabitymi albo podjednostkowymi są nie do przecenienia w porównaniu ze stosowaniem szczepionek żywych” (Barrow & Wallis 2000).

Salmonellozy są chorobami odzwierzęcymi, które mogą być przenoszone bezpośrednio lub pośrednio między zwierzętami i ludźmi. Bakterie *Salmonella* są dość powszechnie spotykane w jelitach zdrowych ptaków i ssaków, w żywności, a najczęściej znajdują się w jajach i surowym mięsie indyków, kurcząt i świń. Choroba może rozprzestrzeniać się na ludzi za pośrednictwem skażonej żywności. Wzrastające zapotrzebowanie na żywność, gwałtowny rozwój ferm wielkotowarowych i produkcja żywności na skalę przemysłową w ubiegłym stuleciu były bezpośrednią przyczyną powstania pandemii salmonelloz na całym świecie.

Problem „walki” z salmonellozami jest niezwykle skomplikowany. Z jednej strony mamy do czynienia ze zjawiskiem różnorodności serologicznej tych bakterii, a z drugiej z ogromnym rozpowszechnieniem bakterii *Salmonella* w przyrodzie. Są one odporne na większość ze znanych antybiotyków, a próby ich eliminacji

w warunkach hodowlanych za pomocą immunizacji wiążą się z koniecznością opracowania szczepionki dla każdego z serowarów o „szczególnym znaczeniu dla zdrowia publicznego” (Barrow, P. A., 2007).

Szczepionki są najpotężniejszymi czynnikami biologicznymi, które modulowały życie gospodarcze, społeczne i kulturalne ludzi. Niektóre choroby zakaźne udało się zwalczyć za pomocą szczepionek. Jednak, niektóre zakażenia, takie jak salmonellozy, mogą dziś powodować pandemie. Istnieje ponad 2500 serotypów *Salmonella*, a szczepionki wykonane z jakiegokolwiek serotypu nie dają krzyżowej ochrony przeciwko drugiemu z nich, bez względu na to jak duże podobieństwo antygenowe istnieje między nimi (Segall T., Lindberg A. A., 1993). Szczepy *Salmonella* mogą powodować choroby ludzi i różnych rodzajów zwierząt. Do kontroli salmonelloz są używane trzy główne rodzaje szczepionek: z inaktywowanych (zabitych) bakterii, szczepionki żywe atenuowane i podjednostki szczepów. Problem staje się coraz bardziej złożony, ponieważ wzrósł międzynarodowy handel i podróże, co pomogło szczepom *Salmonella* przekroczyć granice kontynentu. Wydaje się mało prawdopodobne, że będziemy mogli wytworzyć w najbliższej przyszłości skuteczną szczepionkę, która będzie w stanie kontrolować wszystkie formy salmonellozy, nawet u jednego gatunku zwierząt (Singh B.R., 2009). Korzyści płynące z pracy nad skutecznymi szczepionkami zabitymi albo podjednostkowymi są nie do przecenienia w porównaniu ze stosowaniem szczepionek żywych (Barrow & Wallis, 2000).

Bakterie *Salmonella* należą do rodziny *Enterobacteriaceae*. Na podstawie cech genetycznych i właściwości biochemicznych podzielono bakterie *Salmonella* na dwa gatunki *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori*. W obrębie *Salmonella enterica* wyróżnia się następujące podgatunki: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* i *indica* (Grimont, P.A.D. & Weill F-X, 2007). W obrębie rodzaju *Salmonella* opisano do tej pory 2579 typów serologicznych bakterii *Salmonella*. Zostały one sklasyfikowane na podstawie obecności na ich powierzchni antygenów somatycznych (O), otoczkowych (Vi) i rzęskowych (H). Schemat ten, zwany schematem Kauffmanna-White'a, przedstawia usystematyzowane struktury antygenowe serowarów *Salmonella*, obejmując 46 grup serologicznych. Powszechnie występuje raczej ograniczona liczba serowarów *Salmonella*. Podstawy klasyfikacji bakterii *Salmonella* zostały opracowane przez Kauffmann F. w 1975 roku.

Lipopolisacharyd (antygen O, endotoksyna) pełni ważną rolę w komórce bakteryjnej. Jest on jednym z czynników warunkujących chorobotwórczość dla ludzi i zwierząt. Lipopolisacharyd jest heteropolimerem złożonym z trzech odmiennych pod względem struktury regionów: lipidu A, rdzenia oligosacharydowego i O-swoistego łańcucha wielocukrowego. Łańcuch O-swoisty (OPS) stanowi dystalną część lipopolisacharydu. Jest on najbardziej zmiennym fragmentem i tą częścią endotoksyny, która stymuluje wytwarzanie przeciwciał. Lipopolisacharyd nazywany jest endotoksyną, ponieważ wywołuje groźne powikłania w przypadku zakażeń bakteryjnych, czego objawami są posocznica i wstrząs septyczny. Badania prowadzone przez wiele lat pozwoliły nam na uzyskanie niezwykle ważnych informacji o podstawowych właściwościach immunogennych wybranych struktur tych antygenów (J. Gajdus, R. Głońska, J. Szafranek, 2006; Szafranek J. i wsp., 2006; Szafranek J. i wsp., 2003; Dziadziuszko i wsp., 1998; J. Szafranek i wsp., 1998). Były one podstawą kompozycji nowej, poliwalentnej, wieloskładnikowej szczepionki do zwalczania salmonelloz.

Antygen rzęskowy H, jest antygenem powierzchniowym i jest związany z obecnością rzęsek na powierzchni bakterii *Salmonella*. Występują one szczególnie obficie w hodowli bulionowej i na podłożu

Garda. Antygeny rzęskowe bakterii *Salmonella* są zwykle dwufazowe. Większość bakterii z rodzaju *Salmonella* porusza się przy pomocy rzęsek.

Antygen Vi zlokalizowany jest w otoczce bakteryjnej. Zbudowany jest z wielocukru, kwasu poli-N-acetyloaminogalakturonowego. Antygen Vi jest wytwarzany przez nieliczne szczepy *Salmonella*.

Serowary (serotypy) *Salmonella* należące do podgatunku *enterica* stanowią grupę patogenów zróżnicowaną pod względem preferencji gospodarza, u którego mogą wywoływać chorobę. Preferencje te dotyczyć mogą niewielkiej ilości gospodarzy, jak w przypadku zakażeń *S. Typhi* powodujących chorobę jedynie u ludzi i naczelnych lub mogą obejmować szersze spektrum (w tym ludzi i wiele gatunków zwierząt), jak w przypadku infekcji wywoływanych przez *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis i pozostałe serotypy.

Zdecydowana większość chorobotwórczych serowarów związanych z zakażeniami u ludzi należy do *Salmonella* sp. *enteric* ssp. *enterica*. W latach 2006 – 2009 wśród najczęściej występujących serowarów u ludzi w Europie zarejestrowano: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Bovismorbificans*, *S. Hadar*, *S. Virchow*, *S. Derby*, *S. Newport*, *S. Stanley*, *S. Agona*, *S. Kentucky* i *S. Saintpaul*. W ostatnich czasach pojawił się jednofazowy wariant szczepów *S. Typhimurium* (np. 1, 4, [5], 12 : i : -) u świń, bydła, zwierząt domowych i ludzi stanowiąc nowe zagrożenie dla środowiska i związane z tym ryzyko zanieczyszczenia składników paszowych, co zwiększa możliwość naruszenia bezpieczeństwa biologicznego (EFSA Journal 2011;9(7):2106).

W ramach europejskiego systemu nadzoru (EFSA i ECDC, 2011) w 2009 r. odnotowano 108.614 potwierdzonych przypadków salmonellozy u ludzi w 27 państwach członkowskich UE. Wskaźnik zapadalności wynosił 23,7 przypadku na 100.000 ludności (od 2,1 w Portugalii, 22,3 w Polsce do 100,1 w Czechach) (European Centre for Disease Prevention and Control, Annual Epidemiological Report, 2011). Podobnie jak w poprzednich latach *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* były najczęściej zgłaszanymi serowarami (75,6% wszystkich zgłoszonych serowarów). EFSA szacuje, że całkowite obciążenie ekonomiczne związane z salmonellozami u ludzi może wynosić do 3 mld euro rocznie. W 2011 roku zanotowano nieznaczny spadek liczb potwierdzonych zakażeń do 95.548 (EFSA Journal, 2013).

W Polsce, według danych Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH, w latach 2009 – 2012 najczęściej wykrywane były serotypy: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow* i *S. Hadar*. Zakażenia serotypami: *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* stwierdzono w ok. 70% u osób chorych. Serotypy *S. Infantis*, *S. Virchow* i *S. Hadar* były przyczyną zachorowań u ok. 50%. (Serotypy pałeczek *Salmonella* najczęściej wykrywane u osób chorych i zdrowych w Polsce, dane Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH, Choroby Zakaźne i Zatrucia w Polsce w 2012 roku).

Zakażenia stad kur w 26 krajach UE wynosiły średnio 26%. Najwięcej zakażonych stad znajdowało się w Portugalii – 79,5%. Polska znajdowała się na drugim miejscu - 76,2% zakażonych stad kur. Dalsze miejsca zajmowały Hiszpania, Republika Czech i Grecja, w tych krajach zakażenia kur stanowiły ponad 50% (EFSA Journal, 2007).

Szczepienia ochronne są jedynym dopuszczalnym sposobem ograniczenia i/lub likwidacji zakażeń *Salmonella* u ptaków hodowlanych. Zgodnie z dyrektywami Unii Europejskiej obowiązkiem zwalczania zostało

objętych 5 serowarów (*Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Virchow i *Salmonella* Infantis). Szczepienia ochronne przeciw bakteriom *Salmonella* są obecnie niezwykle rozpowszechnione. Stosowane są zarówno szczepionki z bakterii inaktywowanych jak i żywych genetycznie zmodyfikowanych szczepów *Salmonella*.

Szczepionki zawierające bakterie inaktywowane (zabite).

W badaniach eksperymentalnych i terenowych stosowano różne rodzaje inaktywowanych szczepionek. Mogą one zawierać bakterie inaktywowane formaldehydem, acetonem, glutaraldehydem lub temperaturą. W niektórych szczepionkach używano adiuwanty olejowej, wodorotlenek glinu i inne związki stymulujące układ odpornościowy. Szczepionki zawierające bakterie zabite stosowane w iniekcjach podskórnych lub domięśniowych mają zdolność do wywoływania silnej odpowiedzi immunologicznej, ale wytwarzają słabe lub dyskusyjne działanie ochronne na naturalne zakażenia, które następują zwykle przez przewód pokarmowy (Barrow P.A., 2007). Szczepionki te zawierają zwykle jeden lub dwa serowary np.: *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* i są podawane między 4 a 6 tygodniem życia. Zalecane też jest dwukrotne podawanie tych szczepionek. Szczepionka S.E.T.- VAC (Kobiałka M., 2007), stymulowała powstawanie wysokiego poziomu przeciwciał u kur szczepionych iniekcyjnie. Obecność przeciwciał wykrywanych w jajkach kur po podaniu w iniekcji szczepionki Selenvac T zostały opisane przez Sheehan T. B. i Van Orot R., 2006.

W Polsce wyprodukowano wieloskładnikową szczepionkę o nazwie „Immunovac”. Składała się z kompleksów zinaktywowanych szczepów *Salmonella* i przeciwciał króliczych. Była ona przeznaczona dla kur niosek i stad rodzicielskich do stosowania w profilaktyce salmonelloz. Preparat w postaci zawiesiny składał się z kompleksu 8 szczepów *Salmonella*: *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Choleraesuis*, *S. Kentucky* i *S. Senftenberg*. Bakterie były inaktywowane działaniem formaldehydu i zostały związane z przeciwciałami uzyskanymi z surowic królików uodpornionych antygenami bakterii *Salmonella*. Szczepionka była przystosowana do podawania „per os” w wodzie pitnej. Zalecano 4 - krotne stosowanie (w odstępach tygodniowych) od 1-szej doby od wylęgu ptaków. Przeprowadzone badania wykazały w 100% skuteczność dla myszy zakażonych zjadliwym szczepem *S. Enteritidis* „per os”. U kur zakażonych domięśniowo dużą dawką bakterii *S. Gallinarum* stwierdzono ochronne działanie w 80%. Szczepionka posiadała zdolność wywoływania podobnej odpowiedzi humoralnej po podaniu doustnym jak i dożylnym. Wykazano także zdolność szczepionki Immunovac do stymulowania odpowiedzi komórkowej (Głońska R. i wsp., 2005).

Szczepionki zawierające bakterie żywe.

Obecnie stosowane szczepionki mogą zawierać żywe, atenuowane lub zmodyfikowane genetycznie komórki bakterii. Szczepionki te zawierają zwykle jeden szczep *Salmonella*. Są wykonane z bakterii *S. Enteritidis* lub *S. Typhimurium*. Doustne stosowanie szczepionek przeciw salmonellozom zawierających żywe, genetycznie zmodyfikowane bakterie stymuluje lokalną odporność jelitową, a także przyczynia się do zmniejszenia wydalania bakterii przez immunizowane zwierzęta. Stosowanie tych szczepionek podlega pewnym ograniczeniom (ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 1177/2006). Podawanie zwierzętom żywych bakterii w szczepionce wiąże się z silną reakcją na endotoksynę. Zdarzały się przypadki zachorowań i śmierci zwierząt. Nie mogą one być stosowane w przypadku ostrej infekcji w stadzie. Nie uzyskuje się też odporności

u bardzo młodych zwierząt. Podanie genetycznie zmodyfikowanej szczepionki w pierwszej dobie życia nie ochroniło kurcząt od zasiedlenia wątroby i śledziony zakaźnym szczepem (Van Immerseel, 2002; Van Immersel i wsp., 2005). Zjawisko to tłumaczy się niedojrzałością układu immunologicznego u ptaków. Dojrzewanie układu immunologicznego u ptaków odbywa się ciągu 3 tygodni od wylęgu (Rumińska E. i wsp., 2008). Wszystkie znane szczepionki są stosowane od 3 do 4 tygodnia życia. Producenci zalecają też 2- lub 3-krotne szczepienia.

Od wielu lat znane są właściwości bakteriobójcze i protekcyjne surowic odpornościowych i przeciwciał uzyskanych z żółtek jaj ptaków (kur lub kaczek) immunizowanych bakteriami lub wirusami. (Chalghoumi R. i wsp. 2009, Stefaniak T. i wsp. 2004; Taylor P. W., 1998; Yokoyama H. i wsp., 1998; Peltra C. i wsp., 1994).

Niestety, jak wynika z badań epizootologicznych i epidemiologicznych przeprowadzonych w latach 2010 i 2011 nie udało się uzyskać zakładanych wyników zmniejszenia liczb zakażeń na fermach hodowlanych kur w odniesieniu do serowarów *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium (EFSA Journal, 2013).

Fundusze pozyskane z UE w ramach **Działania/Poddziałania 1.2 Rozwiązania innowacyjne w MŚP Osi Priorytetowej 1 Regionalnego Programu Operacyjnego dla Województwa Pomorskiego na lata 2007 – 2013** pozwoliły nam na opracowanie nowej szczepionki do zwalczania salmonelloz.

Opracowana obecnie szczepionka, nazwana „Sal-ETHVI”, składa się z 5 najczęściej występujących serotypów bakterii *Salmonella*: Enteritidis, Typhimurium, Hadar, Virchow i Infantis. Do bakterii przyłączono izolowane immunoglobuliny królicze. Jest ona przygotowana do stosowania *per os* w wodzie pitnej. Opierając się na wszechstronnych wynikach badań szczepionki „Immunovac” (Głońska R. i wsp., 2005), zakładamy, że skonstruowana w podobny sposób nowa szczepionka będzie stanowić ochronę bierną dla piskląt przed zakażeniem, a jednocześnie stymulować powstawanie odporności czynnej.

W celu udokumentowania właściwości immunogennych szczepionki Sal-ETHVI przeprowadzono badania laboratoryjne zdolności stymulowania odpowiedzi immunologicznej u kur. Preparat podano w wodzie pitnej 4-krotnie w tygodniowych odstępach czasu.

W niniejszej publikacji opisujemy wyniki badań serologicznych surowic kur szczepionych *per os* preparatem wytworzonym na skalę laboratoryjną. Ponadto opisane zostały wyniki badań poziomu przeciwciał w jajkach kur szczepionych preparatem Sal-ETHVI.

Materiały i metody

Szczepionka Sal-ETHVI jest zawiesiną inaktywowanych szczepów *Salmonella* i immunoglobulin króliczych. Szczepionka jest przeznaczona dla kur niosek i stad rodzicielskich do stosowania w profilaktyce salmonelloz. Preparat, w postaci zawiesiny, składa się z kompleksu 5 szczepów *Salmonella* związanych ze swoistymi przeciwciałami. Bakterie są inaktywowane działaniem formaldehydu i zawieszane w chlorku sodowym ($8,5 \text{ g/dm}^3$) zawierającym 0,02% formaldehydu. Jeden mililitr zawiesiny zawiera 5×10^{11} Najbardziej Prawdopodobnej Liczby bakterii (NPL). Zawiesiny bakterii są mieszane w następujących proporcjach: *S. Enteritidis* – 2×10^{11} , *S. Typhimurium* – 1×10^{11} , *S. Hadar* – 1×10^{11} , *S. Virchow* – $0,5 \times 10^{11}$ i *S. Infantis* – $0,5 \times 10^{11}$ NPL. Do bakterii zostały przyłączone poliklonalne przeciwciała: IgG i IgM wyizolowane z surowic

królików. Szczegółowy opis metody wytwarzania szczepionki Sal-ETHVI jest przedmiotem patentu (Nr PCT/IB2013/061054).

Przeprowadzono badania laboratoryjne zdolności stymulowania odpowiedzi immunologicznej. W ramach badań laboratoryjnych zaszczepiono 2 grupy kur (*Gallus gallus*). Jedną grupę stanowiły brojlery, drugą grupę stanowiły kury nioski. Szczepionkę podawano w wodzie pitnej, 4-krotnie w tygodniowych odstępach czasu, rano po zmieszaniu z wodą w następujących ilościach w przeliczeniu na 10 tys. sztuk:

I tydzień: 30 ml rozcieńczono w 30 litrach wody,

II tydzień: 60 ml rozcieńczono w 60 litrach wody,

III tydzień: 120 ml rozcieńczono w 100 litrach wody,

IV tydzień: 250 ml rozcieńczono w 100 litrach wody.

Kurczęta hodowane w warunkach naturalnych były karmione i pojęne standardowo.

Od 24 ptaków wybranych losowo z każdej hodowli pobierano po 4 ml krwi z żyły łokciowej i przeprowadzono badania poziomu przeciwciał w surowicach z zastosowaniem testów ELISA. Od brojlerów pobierano krew w 4-tym i 9-tym tygodniu życia. Krew od kur niosek pobierano w 7-m i 17-tym tygodniu życia.

Ponadto od kur niosek, szczepionych jak powyżej, pobrano 60 jajek w 28-m tygodniu życia ptaków. Badania poziomu przeciwciał w zawartości jajek przeprowadzono z zastosowaniem testu immunoenzymatycznego ELISA.

Badania poziomu przeciwciał w surowicach kur przeprowadzono testem ELISA z zastosowaniem przeciwciał kozich znakowanych peroksydazą skierowanych przeciw przeciwciałom kurzym. Płytki (Kartell) opłaszczono inaktywowanymi antygenami *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Hadar, Virchow i Infantis, po 150 µl każdego z 5 antygenów do studzienek i inkubowano przez noc w temp. 4°C. Surowice badane rozcieńczano w roztworze PBS w stosunku 1:10 i umieszczano po 100 µl każdej próby w 96 dołkowej płytce. Inkubację prowadzono przez 1,5 godz. w temp. 37°C. Każdą próbę badano w 3 powtórzeniach. Po przeprowadzeniu przemywania naniesiono po 100 µl koniugatu - przeciwciał kozich (rozcieńczonych buforem PBS w stosunku 1:10.000) i inkubowano 1 godz. w temp. 37°C. Do każdej studzienki dodawano po 100 µl roztworu substratu OPD (ortofenylo-dwuaminy z dodatkiem H₂O₂) i inkubowano do 30 min. w temp. pokojowej. Do zahamowania reakcji dodawano do każdej studzienki po 50 µl 3 M kwasu siarkowego. Kontrolę stanowiły antygeny bez surowic kurzych badane jak wyżej. Pomiar absorbancji przeprowadzono przy odczycie ekstynkcji dla λ=492 nm za pomocą spektrofotometru EPOCH 3 firmy BioTek.

Badania poziomu przeciwciał w jajkach kurzych przeprowadzono na płytkach (NUNC, MaxiSorp), opłaszczonych inaktywowanymi antygenami 5 szczepów bakterii *Salmonella* według metody opisanej powyżej.

Jajka zebrane od 60 zaszczepionych kur podzielono losowo na 6 grup - po 10 jajek w każdej grupie. Zawartość jajek wymieszano i po rozcieńczeniu w stosunku 1:25 w buforze węglanowym nanoszono do studzienek po 50 µl w 3 powtórzeniach. Inkubację prowadzono przez 1,5 godz. w temp. 37°C. Po przeprowadzeniu przemywania naniesiono po 50 µl koniugatu – przeciwciał kozich znakowanych peroksydazą skierowanych przeciw przeciwciałom kurzym w rozcieńczeniu: 1:20.000 i inkubowano 1 godz. w temp. 37°C. Do każdej studzienki dodawano po 100 µl roztworu substratu (OPD + H₂O₂) i inkubowano

do 30 min. w temp. pokojowej. Zahamowanie reakcji wykonywano przez dodanie 3 M kwasu siarkowego. Pomiar absorbancji przeprowadzono przy odczycie ekstynkcji dla $\lambda=492$ nm za pomocą spektrofotometru EPOCH 3 firmy BioTek.

Wyniki i omówienie

Przeprowadzono badania laboratoryjne zdolności stymulowania odpowiedzi humoralnej u kur, którym podano szczepionkę wytworzoną na skalę laboratoryjną. Preparat, który zastosowano w 2 grupach ptaków, zawierał 5 serotypów inaktywowanych bakterii *Salmonella* i przeciwciała królicze. Szczepionkę podawano w wodzie pitnej 4-krotnie w tygodniowych odstępach czasu, rano po zmieszaniu z wodą. Jedną grupę stanowiły brojlery, a w drugiej grupie szczepiono kury nioski. Do badania wybierano losowo po 48 ptaków z każdej grupy.

Ze stada brojlerów pobierano krew od 24 ptaków w 4 tygodniu życia (1 tydzień po 3 szczepieniach) i od 24 ptaków w 9 tygodniu życia (3 tygodnie po pełnym cyklu szczepień). Wyniki badań w postaci wykresów z obliczeniami średnich danych uzyskanych z 3 badań każdej surowicy przedstawiają Fig 1 i Fig. 2.

Fig. 1

Zestawienie wyników badania surowic brojlerów szczepionych 3-krotnie preparatem „Sal-ETHVI”.

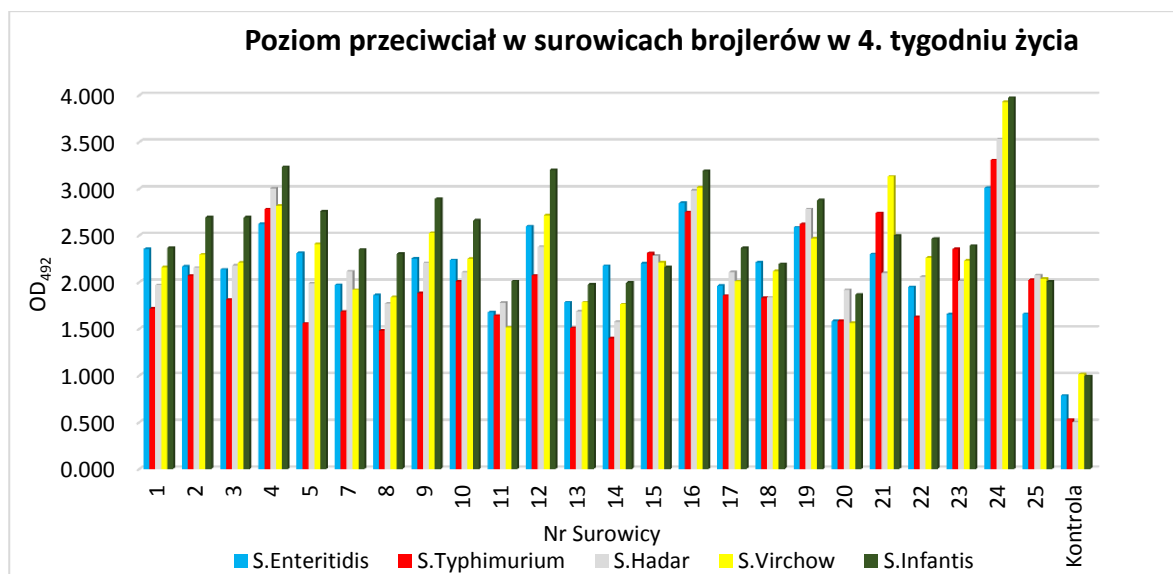
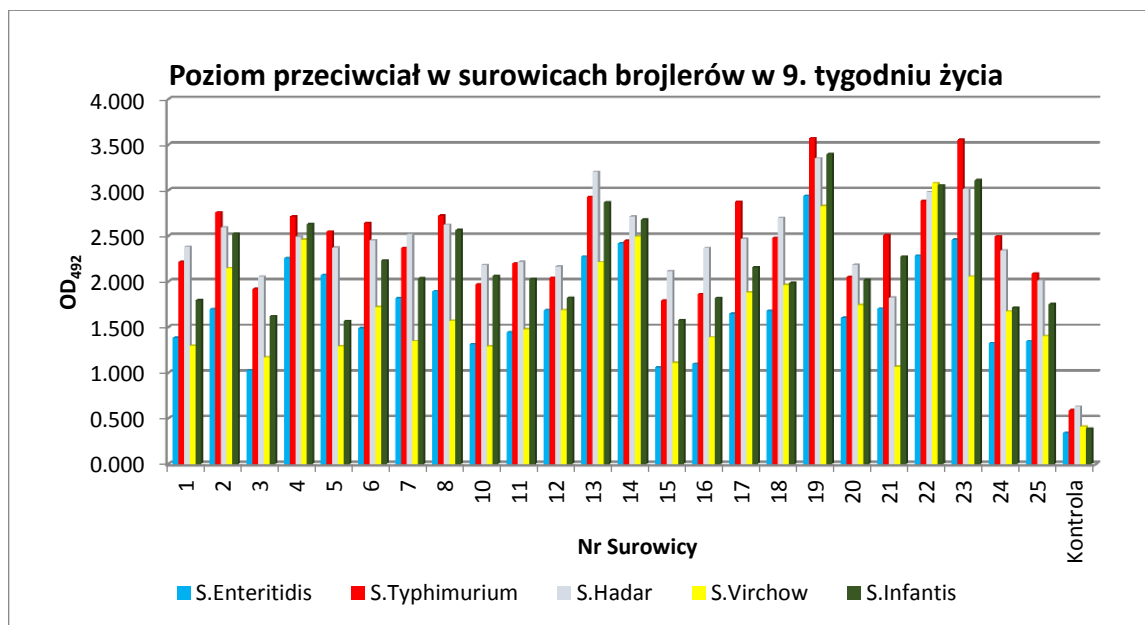


Fig. 2

Zestawienie wyników badania surowic brojlerów szczepionych 4-krotnie preparatem „Sal-ETHVI”.



Badania odpowiedzi humoralnej u kur po 4-krotnym podaniu szczepionki Sal-ETHVI w wodzie pitnej wykonano z zastosowaniem metody immunoenzymatycznej ELISA. Surowice kur rozcieńczono 10-krotnie i wykonano badanie z zastosowaniem inaktywowanych bakterii *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Hadar, Virchow i Infantis jako antygenów. Wszystkie badania przeprowadzono w 3-krotnych powtórzeniach. Wartości obliczonych średnich z uzyskanych wyników przedstawiono na wykresach.

Badania brojlerów zostały przedstawione na wykresach - Fig. 1 (ptaki szczepione 3-krotnie) i Fig. 2 (brojlery szczepione 4-krotnie). Diagramy ilustrują poziom przeciwciał w surowicach ptaków szczepionych preparatem Sal-ETHVI w postaci wartości liczbowych uzyskanych z pomiarów OD₄₉₂. Wyniki gęstości optycznej wykazują wysokie poziomy dla wszystkich 5 szczepów. Wyraźnie widoczne są różnice ilości przeciwciał w surowicach poszczególnych osobników jak i dla każdego z 5 serotypów znajdujących się w szczepionce. Najwyższe poziomy przeciwciał uzyskano dla antygenów *S. Enteritidis* i *S. Infantis*, wartości OD były w granicach od 2,200 do 3,975. Najniższe wartości OD wahały się w granicach od 1,399 – 1,868. Najwyższe wartości OD mieściło się w granicach 3,204 – 3,554. Poziom przeciwciał w surowicach nr 11, 13, 20 i 25 (Fig.1) był niższy dla wszystkich 5 antygenów. Podanie 4-tej dawki szczepionki nie miało istotnego znaczenia dla wyników badań serologicznych brojlerów. Poziom przeciwciał w surowicach pojedynczych ptaków był nawet nieznacznie niższy (w granicach 1,027 – 1,568) i nie przekraczał wartości 3,500. Jest to widoczne na zbiorczym zestawieniu wyników badań brojlerów i niosek (Fig.5).

Z grupy kur niosek pobierano krew od 24 ptaków w 7 tygodniu życia i od 24 ptaków w 17 tygodniu życia. Badania surowic przeprowadzono z zastosowaniem testu ELISA. Wyniki badań serologicznych kur niosek przedstawione na wykresach Fig. 3 i Fig. 4 ilustrują poziom przeciwciał w surowicach w postaci wartości liczbowych uzyskanych z pomiarów OD₄₉₂. Uśrednione wyniki oznaczania gęstości optycznej wykazują zróżnicowane poziomy dla wszystkich 5 szczepów. Wyraźnie widoczne są różnice w surowicach poszczególnych osobników jak i dla każdego z 5 serotypów (antygenów).

Fig. 3

Zestawienie wyników badania surowic kur niosek szczepionych 4-krotnie preparatem „Sal-ETHVI”.

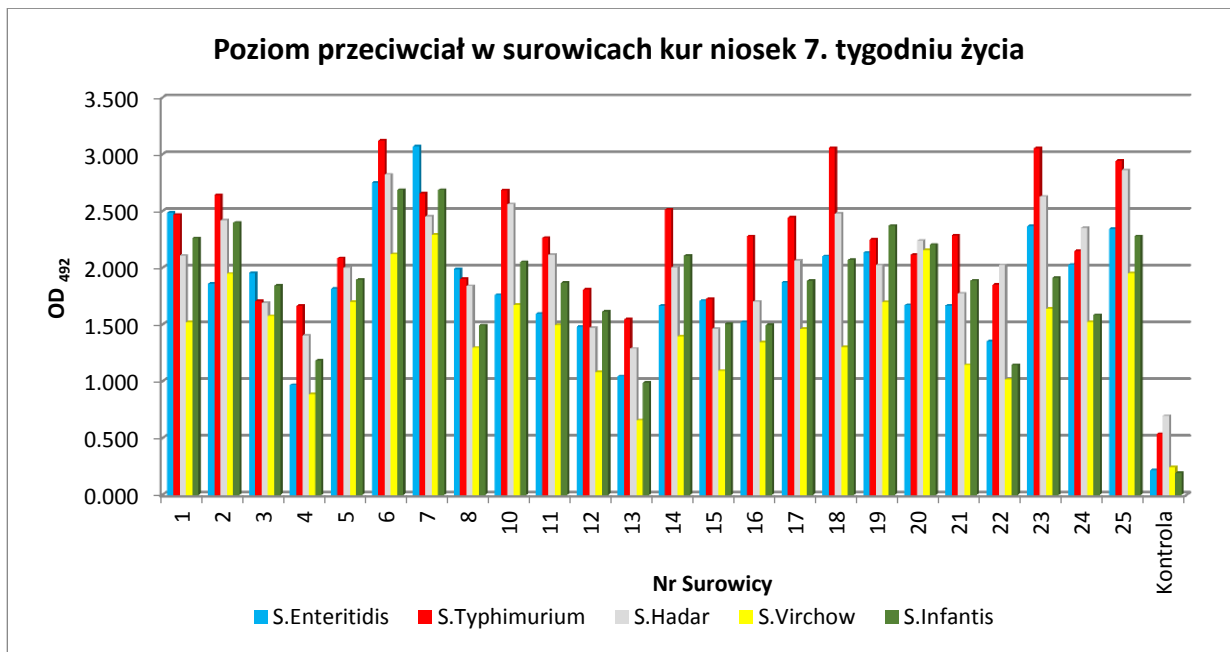
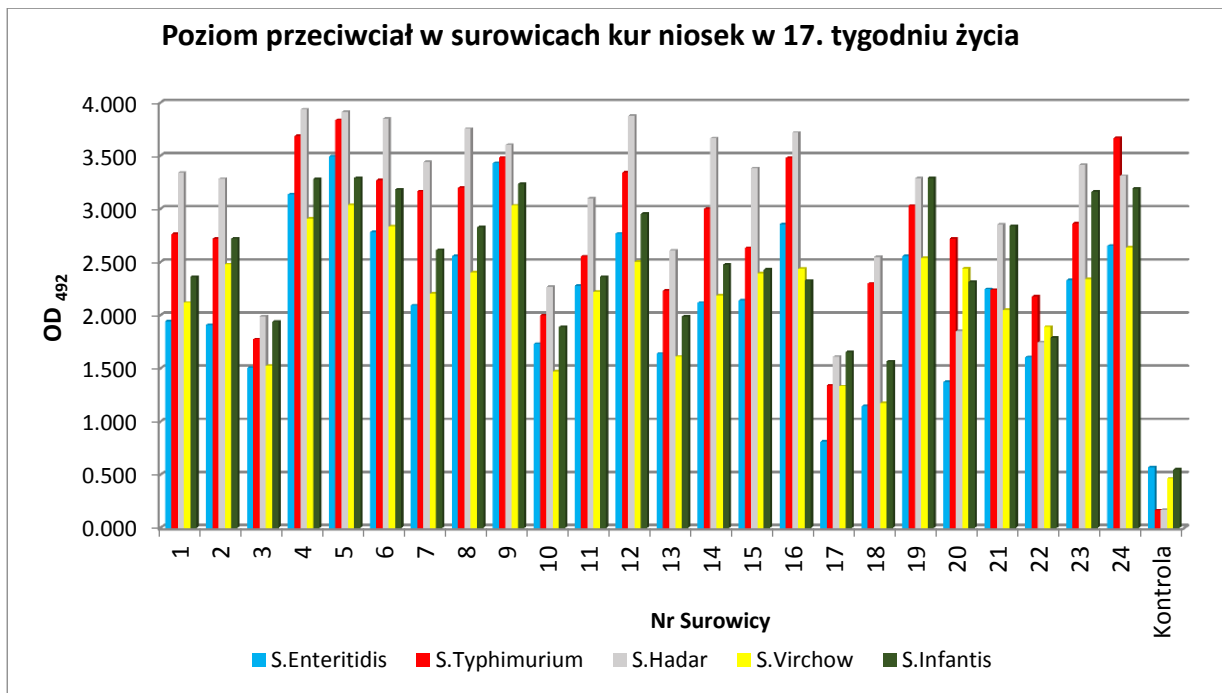


Fig. 4

Zestawienie wyników badania surowic niosek szczepionych 4-krotnie preparatem „Sal-ETHVI”.

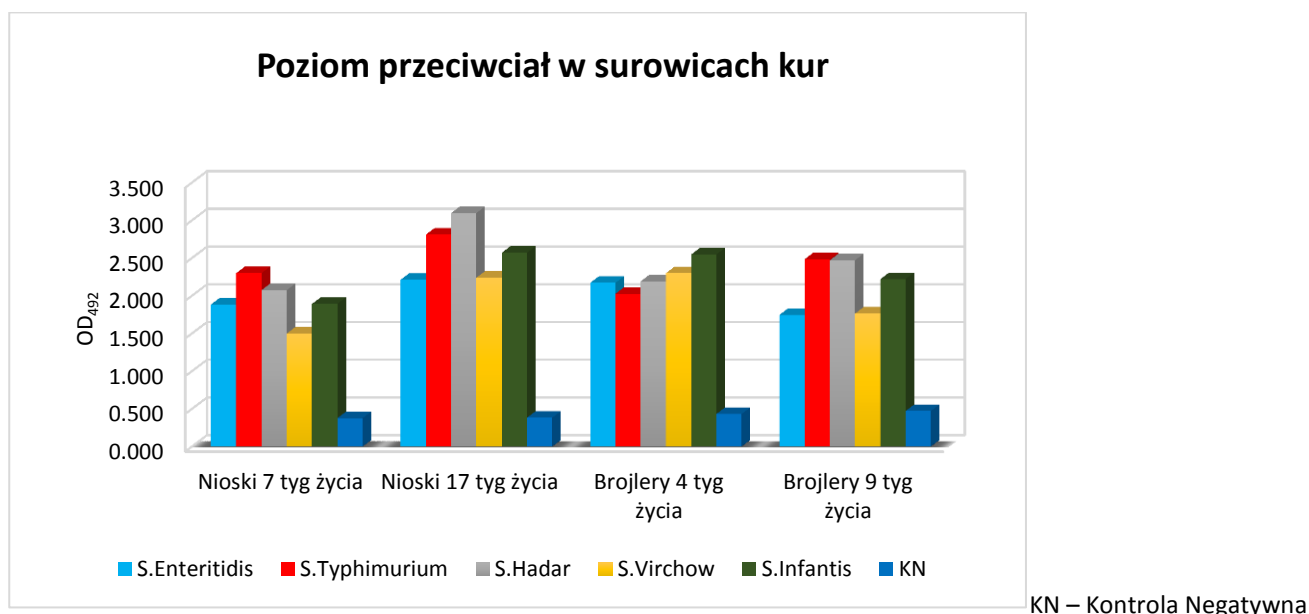


W surowicach kur badanych w 7. tygodniu życia, to jest 3 tygodnie po pełnym cyklu szczepień (Fig. 3) poziom przeciwciał wahał się w granicach 0,656 – 3,000. Najwyższe wartości OD wynosiły 2,158, 2,861 i 3,121. Wyraźnie widoczne są niskie poziomy przeciwciał u 3 ptaków (surowice Nr 4, 13 i 22). Najwyższe poziomy przeciwciał uzyskano dla antygenów *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*, dla których wartości OD były w granicach od 2,000 do 3,000. Najniższe wartości OD wahały się w granicach od 0,656 i 0,887 – 1,708 dla różnych antygenów. Najwyższe wartości OD wahały się w granicach 2,300 – 3,120.

Wyniki badań surowic kur niosek badanych w 17 tygodniu życia (Fig. 4) wykazywał znaczące tendencje wzrostu poziomu przeciwciał dla wszystkich 5 serotypów wchodzących w skład preparatu w porównaniu z poziomem przeciwciał w surowicach kur badanych w 7 tyg. życia. Najniższe wartości OD od 0,812 – 1,655 dla wszystkich 5 antygenów stwierdzono u jednego ptaka (surowica nr 17). W surowicach pozostałych 23 ptaków poziom przeciwciał był niezwykle wysoki OD mieściło się w granicach około 1,505 – 3,936. W surowicy nr 5 stwierdzono wysoką aktywność 5 badanych antygenów (OD 3,038 – 3,912). Najwyższą aktywność wykazano dla antygeny S. Hadar, dla którego wartości OD najczęściej przekraczały 3,500. Na drugim miejscu był antygen S. Typhimurium. Antygen S. Enteritidis wykazywał umiarkowaną aktywność serologiczną. Wyraźnie widoczna jest także różnica osobnicza w odpowiedzi serologicznej.

Różnice poziomu przeciwciał w surowicach brojlerów oraz kur niosek badanych w różnych okresach życia zilustrowano w zbiorczym zestawieniu na wykresie Fig. 5.

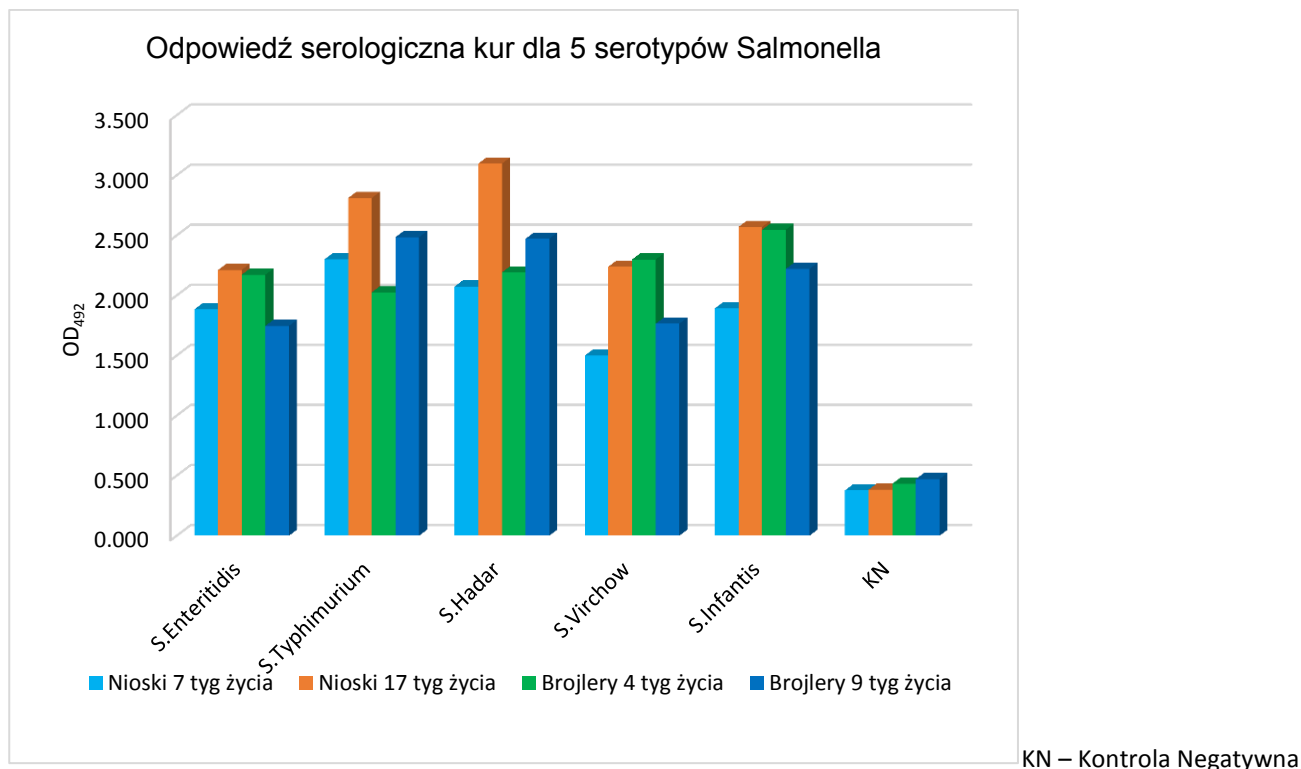
Fig. 5 Średni poziom przeciwciał w surowicach kur szczepionych Sal-ETHVI



Wyniki oznaczania gęstości optycznej wykazują wysokie poziomy przeciwciał dla wszystkich 5 szczepów zawartych w szczepionce. Wyraźnie widoczne są różnice dla 5 serotypów (antygenów). Poziom przeciwciał w 7 tygodniu życia kur niosek (3 tygodnie po szczepieniu) był znacznie niższy u wszystkich badanych ptaków tej grupy. Stwierdzono wyraźny wzrost poziomu przeciwciał u niosek badanych w 17 tygodniu życia (13 tygodni po szczepieniu). Średni poziom przeciwciał w surowicach brojlerów po podaniu 3-ciej dawki szczepionki był wyższy niż u kur w 7 tyg. życia szczepionych czterokrotnie. Podanie 4-tej dawki szczepionki nie miało istotnego znaczenia dla wyników badań serologicznych brojlerów. Poziom przeciwciał w surowicach pojedynczych ptaków był nawet nieznacznie niższy. Najprawdopodobniej tendencja wzrostu poziomu przeciwciał jest spowodowana znacząco lepszym odżywianiem kur niosek w porównaniu do brojlerów.

Różnice w odpowiedzi serologicznej kur na poszczególne serotypy *Salmonella* przedstawiono na wykresie (Fig. 6).

Fig. 6 Średnie wartości ekstynkcji w surowicach kur dla 5 serotypów *Salmonella*



Najwyższą aktywność wykazano dla antygeny S. Hadar, dla którego wartości OD najczęściej przekraczały 3,500. Na drugim miejscu był antygen S. Typhimurium, a na trzecim S. Infantis. Nieco niższe wartości ekstynkcji wykazały antygeny S. Enteritidis jak również S. Virchow.

Zdolność wywoływania odpowiedzi humoralnej u kur immunizowanych drogą pokarmową z zastosowaniem szczepionki zawierającej bakterie inaktywowane na ogół nie była potwierdzana w publikacjach. Jak podaje Barrow (Barrow P.A., 2000), niektóre z inaktywowanych szczepionek po podaniu doustnym były zdolne do wywołania odpowiedzi immunologicznej na powierzchni błony śluzowej. Baljer i wsp. (Baljer i wsp., 1986 cyt. za Barrow P.A., 2000) wykazali, że cielęta były chronione przed zakażeniem po zastosowaniu doustnego szczepienia powtarzanymi dawkami zawiesiny inaktywowanych bakterii *Salmonella*. Skuteczność szczepienia *per os* inaktywowaną zawiesiną bakterii została jednak udokumentowana w badaniach nad szczepionką Immunovac (Głońska R. i wsp., 2005). Wyniki uzyskane w ramach tej pracy wykazały zdolności pobudzania układu immunologicznego ptaków po kilkakrotnym podaniu inaktywowanej szczepionki w wodzie pitnej. Szczepionka Immunovac w 100% chroniła myszy przed zakażeniem zjadliwym szczepem S. Enteritidis oraz stanowiła w 80% ochronę kur przed zakażeniem dużą dawką bakterii S. Gallinarum podanymi w iniekcji domięśniowej. W splenocytach szczepionych myszy stwierdzono obecność swoistych receptorów immunoglobulinowych. Wykazano także obecność przeciwciał w surowicach kur szczepionych 4-krotnie szczepionką Immunovac, dla których poziom przeciwciał (OD_{492}) wynosił dla kur niosek w 11 tygodniu życia: **0,665**, a w 16 tygodniu życia: **0,729**. W porównaniu z wynikami

uzyskanymi dla surowic kur szczepionych preparatem Sal-ETHVI są one znacząco niższe. Różnice te mogą wynikać między innymi ze stosowania innych metod przygotowania antygenów do testu ELISA. Do badania surowic kur szczepionych Immunovac zastosowano lisat z 8 szczepów, odpowiadających serotypom znajdującym się w szczepionce. Badania surowic ptaków szczepionych Sal-ETHVI przeprowadzono z zastosowaniem inaktywowanych bakterii użytych do wytworzenia preparatu.

Szczepionki zawierające bakterie zabite stosowane w iniekcjach podskórnych lub domięśniowych mają zdolność do wywoływania silnej odpowiedzi immunologicznej, ale wytwarzają słabe lub dyskusyjne działanie ochronne na naturalne zakażenia, które następują zwykle przez przewód pokarmowy (Barrow P.A., 2007). Szczepionki te zawierają zwykle jeden lub dwa serowary np.: *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* i są podawane między 4 a 6 tygodniem życia. Zalecane też jest dwukrotnie podawanie tych szczepionek. Szczepionka S.E.T.- VAC (Kobiałka M., 2007) stymulowała powstawanie wysokiego poziomu przeciwciał u kur szczepionych iniekcyjnie.

Przeprowadzono również badania poziomu przeciwciał w jajkach kur szczepionych 4-krotnie preparatem Sal-ETHVI. Jajka zebrane od 60 kur podzielono losowo na 6 grup, po 10 jajek w każdej grupie. Zawartość jajek (białka i żółtka) wymieszano i po rozcieńczeniu w stosunku 1:25 w buforze węglanowym nanoszono (po 50 μ l) do studzienek opłaszczonych antygenami *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Hadar, Virchow i Infantis. Wyniki badań w postaci wykresu z obliczeniami średnich danych uzyskanych z 3 badań każdej próby przedstawia Fig 7. Diagram ilustruje poziom przeciwciał w jajkach ptaków w postaci wartości liczbowych uzyskanych z pomiarów OD₄₉₂. Wyniki gęstości optycznej wykazują wysokie poziomy dla wszystkich 5 szczepów. Wyraźnie widoczne są różnice ilości przeciwciał dla poszczególnych antygenów i badanych jajek. Różnice w wartościach OD dla badanych surowic i jajek wynikają ze stopnia ich rozcieńczenia. Surowice kur były rozcieńczone 10-krotnie, zawartość jajek rozcieńczono 25-krotnie. Najwyższą wartość ekstynkcji uzyskano dla antygeny *S. Enteritidis*, najniższe wartości wykazały antygeny *S. Hadar* i *S. Infantis*.

Fig. 7 Wyniki badania obecności przeciwciał w jajkach kur szczepionych Sal-ETHVI.

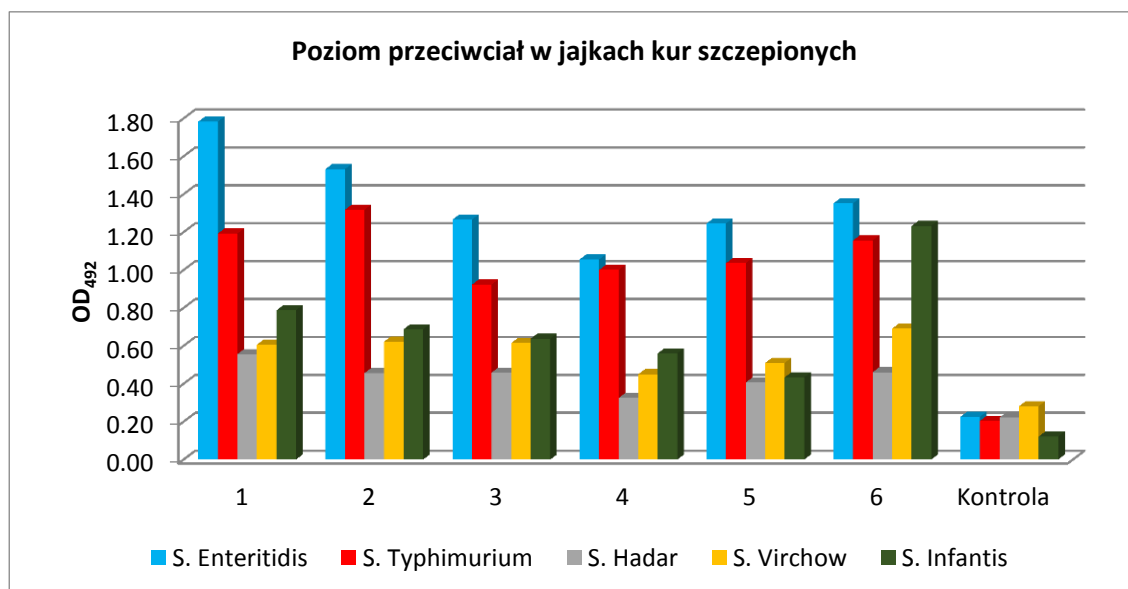
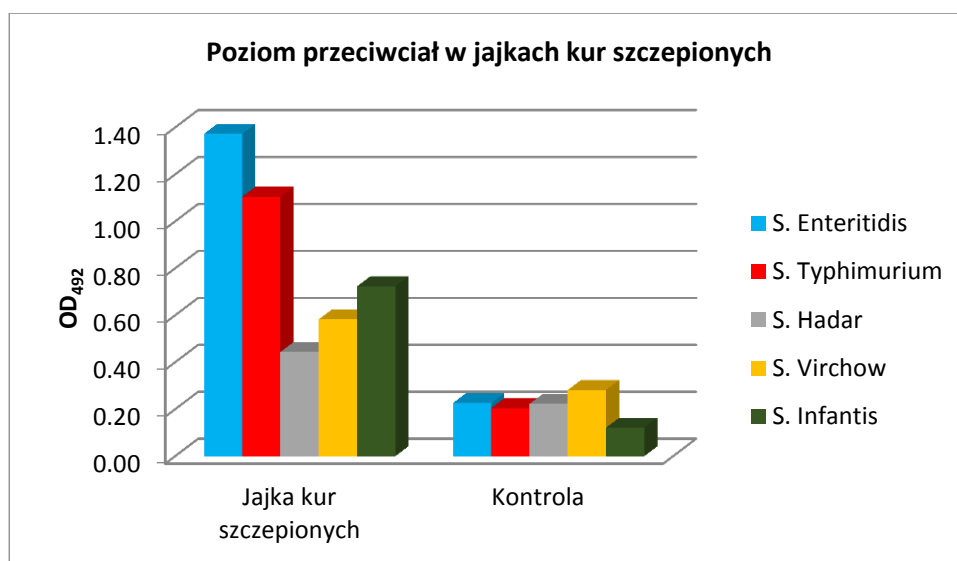
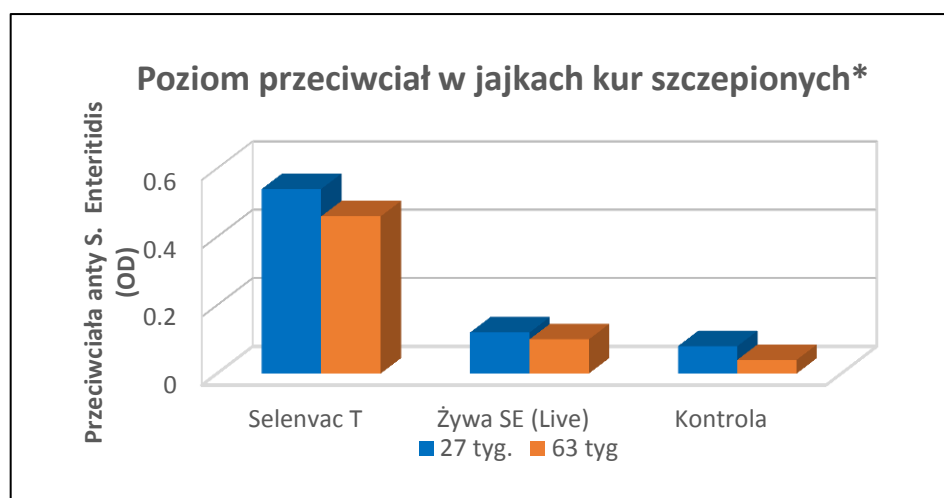


Fig. 8 Średni poziom przeciwciał w jajkach kur szczepionych ETHVI



Sheehan B. i Van Oort R. przeprowadzili badania obecności przeciwciał anti-S. Enteritidis w jajkach kur. Zbadali oni poziom przeciwciał w jajkach kur szczepionych żywym atenuowanym szczepem *per os* (nazwa szczepionki nie została podana w publikacji) i szczepionką Selenvac T podaną w iniekcji. Wyniki tych badań wykazały niski poziom przeciwciał (OD – 0,1) nieznacznie przekraczający kontrolę w jajkach kur szczepionych żywymi bakteriami. Podanie szczepionki w iniekcji wykazało obecność przeciwciał anti-Se (*Salmonella* Enteritidis) w jajkach w 27 i 63 tygodniu po szczepieniu. Poziom przeciwciał opisany w Fig. 1. tej publikacji wyniósł odpowiednio powyżej 0,5 i 0,4 (OD dla *S. Enteritidis*). Przedstawiamy wykres (Fig. 9) odtworzony z publikacji dla porównania wyników uzyskanych po zastosowaniu inaktywowanej szczepionki Sal-ETHVI podanej kurom w wodzie pitnej.

Fig. 9 Wyniki badań przeciwciał w jajkach kur szczepionych inaktywowanym preparatem SelenvacT i komercyjnie dostępną żywą szczepionką.



* Salmonella control: protecting eggs and people. Brian Sheehan and Rick van Oort, World Poultry – vol. 22 No 9. 2006. WP www.World/Poultry.net 42.

Uzyskane wyniki naszych badań wskazują że, poziom przeciwciał w jajkach kur szczepionych był znacznie wyższy niż w surowicach tych kur. Wyniki gęstości optycznej OD₄₉₂ wynosiły: dla *S. Enteritidis* - 1,37; *S. Typhimurium* – 1,10; *S. Hadar* – 0,44; *S. Virchow* – 0,58; *S. Infantis* – 0,72. Wprawdzie porównanie wartości OD przedstawione w Fig. 1-4 dla surowic kur są wyższe, ale jest to związane z 25-krotnym rozcieńczeniem zawartości jajek i 10-cio krotnym rozcieńczeniem surowic kurzych.

W badaniach poliwalentnej szczepionki Sal-ETHVI po 4-krotnym podaniu *per os* preparatu zawierającego inaktywowane bakterie i przeciwciała stwierdziliśmy wysokie poziomy przeciwciał w jajkach przeciw 5 szczepom znajdującym się w szczepionce (Fig. 7 i Fig. 8), co wskazuje, że szczepionka ma zdolność do indukowania przeciwciał w jajkach kur i może przyczynić się do ochrony potomstwa kur szczepionych.

Stwierdzenie to jest niezwykle ważne, ponieważ nie znaleziono dotychczas publikacji, która potwierdzałaby zdolność indukowania znaczącej odpowiedzi immunologicznej po zastosowaniu *per os* inaktywowanych bakterii do immunizacji. Na szczególną uwagę zasługuje fakt wykrycia przeciwciał w jajkach kur szczepionych nowym preparatem. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być reakcja układu immunologicznego na wielokrotne podawanie szczepionki.

Podstawy prawne:

1. ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 1177/2006

z dnia 1 sierpnia 2006 r. w sprawie wykonania rozporządzenia (WE) nr 2160/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do wymogów dotyczących stosowania szczególnych metod kontroli w ramach krajowych programów zwalczania salmonelli u drobiu.

2. Dz. U. z dnia 25 maja 2009 r.

Na podstawie art. 57 ust. 7 ustawy z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (Dz. U. z 2008 r. Nr 213, poz. 1342) zarządza się, co następuje:

§ 1. Wprowadza się na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej:

- 1) "Krajowy program zwalczania niektórych serotypów Salmonelli w stadach brojlerów gatunku kura (*Gallus gallus*)" na 2009 r., stanowiący załącznik nr 1 do rozporządzenia;
- 2) "Krajowy program zwalczania niektórych serotypów Salmonelli w stadach niosek gatunku kura (*Gallus gallus*)" na 2009 r., stanowiący załącznik nr 2 do rozporządzenia.

Publikacje

Barrow, P. A., Salmonella infections: immune and non-immune protection with vaccines Avian Pathology, 2007, 36(1):1-13

Barrow, P. A. and T. S. Wallis, Vaccination against Salmonella infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application. Salmonella in Domestic Animals, C. Wray and A. Wray, New York, 2000, CABI: 323-340

Berndt, A., Wilhelm, A., Jugert, Ch., Pieper, J., Sachse, K., and Methner, U., Chicken Cecum Immune Response to SALMONELLA ENTERICA Serovars of Different Levels of Invasiveness, 2007, Infect Immun. 75(12):5993-6007.

Cerquetti, M. C., Gherardi, M. M., Orally administered attenuated Salmonella Enteritidis reduces chicken cecal carriage of virulent Salmonella challenge organisms, 2000, Vet. Microbiol. 76:185-192.

Chalghoumi R., Beckers Y., Portetelle D. and Théwis A., Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review, 2009, Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 13(2):295-308

Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce. Opr. Państwowy Zakład Higieny, Instytut Naukowo-Badawczy - Zakład Epidemiologii, Główny Inspektor Sanitarny - Departament Przeciwdemiczny, roczniki 1982-2004.

Di Rienzo, J. M., Nakamura, K., Inouye, M., The outer membrane proteins of Gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly and functions, 1978, Annu Rev. Biochem 47:481-532.

Dziadziuszko, H., Kunikowska, D., Głościcka, R., Gajdus, J., Kaczyński, Z., Szafranek, J., Immunological and chemical studies of Salmonella haerlem somatic antigen epitopes. II. Serological investigations, 1998, FEMS Immunol Med Microbiol. 21(4):253-259.

EFSA Journal 2007, 98:1-85

EFSA Journal 2011, 9(7):2106

EFSA Journal 2013, 11(4):3129

European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2011

Gajdus, J., Głościcka R., Szafranek J., I-Rzędowa struktura antygenów O bakterii Salmonella, 2006, Wiadomości Chemiczne, 60:9-10

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, 1989, Microbiol Immunol. 33(6):479-488.

Głościcka, R., Dziadziuszko, H., Kunikowska, D., Lis, M., Wicha, M., Heleski, M., Pietrzak-Tokarska, E., Strzałkowski, L., Bugajak, P., IMMUNOVAC- poliwalentna szcepienka przeciwko salmonellozom kur, 2005, Medycyna Wet. 61(10):1105-1109.

Grimont, P.A.D. & Weill F-X, Antigenic formulae of the Salmonella serovars, 2007, wydanie 9-te, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella

Van Immerseel, F., Early protection against Salmonella infection in chickens by modification of the initial host-pathogen interactions; 2002, Rozprawa doktorska, str. 76.

- Van immerseel, F., Methner, U., Rychlik, I., Nagy B., Velge, P., Martin, G., Foster, N., r. Ducatelle, N. and Barrow, P.A., Vaccination and early protection against non-host-specific Salmonella serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity, 2005, *Epidemiol. Infect.*, 1–20.
- Kauffmann, F., The classification of Salmonella species. W: *Classification of Bacteria*, 1961, Wyd.: Scandinavian University Book, Munksgaard, Copenhagen, str. 15-128.
- Kobińska M., Supplement – Choroby Ptaków, 2007, *Med. Wet.*, str. 71-72
- Kunikowska, D., Naturalne i syntetyczne antygeny bakterii i wirusów, 2006, *Ann Acad Med. Gedaniensis*, T. XXXVI, Supplement 4, str. 9 – 122.
- Meldunek roczny o zachorowaniach na choroby zakaźne i zatruciach związkami chemicznymi zgłoszonych w 2012 r., 2012, Państwowy Zakład Higieny, Główny Inspektorat Sanitarny, Departament Epidemiczny
- Meyer, H., Barrow, P., Pardon, P., Salmonella immunization in animals. Symposium "Salmonella and Salmonellosis" Ploufragan/Saint-Brieuc, France 1992, str. 345.
- Peltra, R. C., Yokoama, H., Ikemori, Y., Kuroki, M., Kodama, Y., Passive immunization against experimental salmonellosis in mice by orally administered hen egg-yolk antibodies specific for 14-kDa fimbriae of Salmonella Enteritidis., 1994, *J. Med. Microbiol.* 41:29-35.
- Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zähringer, U., Seydel, U., Di Padova, F., Schreier, M., Brade, H., Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function., 1994, *FASEB J.* 8:217-225.
- Rumińska E., Konwicki A., Stenzel T., Budowa i funkcjonowanie układu odpornościowego u ptaków, 2008, *Medycyna Wet.*, 64(3):265.
- Sheehan T. B. i Van Orot R., 2006, *World Poultry* vol. 22, nr 9., www.World/Poultry. Net 42
- Segall, T., Lindberg A.A., Oral vaccination of calves with an aromatic-dependent Salmonella dublin (O9,12) hybrid expressing O4,12 protects against S. dublin (O9,12) but not against Salmonella typhimurium (O4,5,12), 1993, *Infect Immun.* 61(4):1222-1231.
- Singh B.R., Salmonella Vaccines for Animals and Birds and Their Future Perspective, 2009, *The Open Vaccine Journal*, 2:100-112.
- Serotypy pałeczek Salmonella najczęściej wykrywane u osób chorych i zdrowych w Polsce, dane Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH, Choroby Zakaźne i Zatrucia w Polsce w 2012 roku
- 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, 2004, *Medycyna Wet.* 60:432-436.
- Szafranek, J., Gajdus, J., Kaczynski, Z., Dziadziuszko, H., Kunikowska, D., Głosnicka, R., Yoshida, T., Vihanto, J., Pihlaja, K., Immunological and chemical studies of Salmonella haarlem somatic antigen epitopes. I. Structural studies of O-antigen., 1998, *FEMS Immunol Med Microbiol.* 21(4):243-252.
- Szafranek, J., Kumirska, J., Czerwicka, M., Kunikowski, D., Dziadziuszko, H., Głosnicka, R., Structure and heterogeneity of the O-antigen chain of Salmonella Agona lipopolysaccharide, 2006, *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 48: 223-236
- Szafranek J., Kaczyńska M., Kaczyński J., Gajdus J., Czerwicka M., Dziadziuszko H., Głosnicka R., Structure of the polycacharide O-Antigen of Salmonella Aberdeen (O:11), 2003, *Polish J. Chem.*, 77:1135-1140

Taylor, P. W., Bactericidal and bacteriolitic activity of serum against Gram-negative bacteria, 1998, *Microbiol. Rev.* 47:46-83.

Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S. Leori, G., Bernard, S., Casadesus, J., Platt, D. J., Olsen, J. E., Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*, 2000, *Epidemiol. Infect.* 125(2):229-255.

Yokoama, H., Peltra, R. C., Umeda, K., Haski, 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., 1998, *Am. J. Vet. Res.* 59:416-42.

Adres do korespondencji: www.immunolab.com.pl