

Vaccinurile anticoccidiene - realități și perspective

V. COZMA

Facultatea de Medicină Veterinară Cluj-Napoca

Imunoprofilaxia modernă presupune semnalarea unor aspecte actuale, ca:

1. Asigurarea unor cantități mari de masă antigenică. De exemplu, în unele protozoote multiplicarea agenților patogeni pe culturi de celule sau ouă embrionate asigură o cantitate suficientă de material antigenic.
2. Utilizarea paraziților morți pentru prepararea vaccinurilor. În malarie la om - produsă de *Plasmodium falciparum*, se asigură o protecție parțială sau totală prin injectare de sporozoiți inactivați, dovedită în stări de infestație cu masă virulentă (Moreau, 1986, cit. de Șuteu, 1988).
3. Obținerea unor vaccinuri prin recombinare genetică, utilizând gene clonate. Prin această metodă, în babesioza câinelui s-a obținut un vaccin plecând de la antigene solubile de *B. canis*, cu adjuvant imunogen, care induce formarea anticorpilor specifici, protectori (Moreau, 1986).

Imunoprofilaxia în eimerioze la păsări

Progresele biologiei moleculare au orientat eforturile către dezvoltarea unor vaccinuri constituite din subunitățile paraziților.

Protecția este produsă cel mai frecvent de asocierea unui răspuns imunitar umoral cu unul celular; un vaccin eficient trebuie să inducă un răspuns de lungă durată al celulelor T și B (Soulsby, 1989).

La eimerii, antigenele imunogene sunt stadiile asexuate de dezvoltare endogenă; sporozoiții și schizontii de generația I sunt slab imunogeni, iar schizontii de generația a II-a sunt puternic imunogeni (Euzéby, 1987, cit. de Cozma, 1993).

Imunizarea cu antigene eimeriene izolate

Antigenele eimeriene izolate sunt reprezentate de: lichidul alantoidian de embrioni de pui infectați; supernatantul culturilor celulare infectate cu eimerii. Toate acestea nu sunt, în general, imunogene, cu toate că administrarea lor poate să fie urmată de apariția de anticorpi și de instalarea unei hipersensibilități întârziate. Pe de altă parte, în cazul eimeriozelor aviare, administrarea de țesuturi infectate poate să confere o adevărată rezistență (Euzéby, 1987).

Eimeriile sunt cultivabile *in vitro*, pe embrioni de găină în incubăție (întreținuți la 38°C și infectați în ziua a IX-a de incubăție prin infectarea de sporozoiți în cavitatea alantoidiană) și în culturi celulare, inoculate cu sporozoiți și menținute la 41°C, în atmosferă 5% de CO₂. Dintre eimeriile aviare, singura *E. tenella* a putut fi cultivată în întregime, de la merozoii la oocisturi (Euzéby, 1987).

Culturile eimeriilor *in vitro* permit a se studia metabolismul coccidiilor și activitatea anticoccidiană a diverselor produse cu potențial terapeutic sau chimioprotectiv, precum și prepararea antigenelor, necesare în reacțiile serologice sau în cadrul acțiunilor de imunoprofilaxie.

Pasajul eimeriilor speciilor heteroloage este de asemenea posibil: s-au cultivat eimerii de la pui de găină pe embrioni de curcă sau, mai mult, eimerii de la miel, pe embrioni de găină (Cozma, 1995; Cozma, 1996). Cu toate că eimeriile de la miel sunt heterospecifice față de embrionul de găină, ele sunt viabile și evoluează, până la stadiul de schizont tânăr (Fig. 1 și 2) (Cozma, 1995). Se citează un exemplu asemănător, prin cultivarea *E. tenella* pe ou de curcă (Strout și Schmatz, 1990).

Figura 1

Trofozoid eimerian, cu vizualizarea corpurilor paranucleari (x15.000)
(după Cozma, 1995)

Figura 2

Formațiune schizogonică eimeriană de la miel obținută pe embrion de găină (x30.000)
(după Cozma, 1995)

În general, imunizarea contra coccidiozelor cu preparate antigenice neviabile nu a avut succes. Totuși, extractele cecale de la păsări infectate cu *E. tenella* pot conferi protecție parțială față de infecția de control (Long și colab., 1981, cit. de McKenzie și Long, 1986). Pe de altă parte, prin metode biotehnologice ("inginerie genetică") s-au izolat antigene purificate (antigenul 5401 din *E. tenella*) (Euzéby, 1987).

În ultimii ani, ingineria moleculară a proteinei eimeriene a devenit o realitate. Metoda a necesitat izolarea ARN-ului mesager din oochisturile sporulate purificate. ARN-ul mesager a fost apoi folosit la producerea CADN-ului care conține material genetic necesar pentru a produce proteina eimeriană. CADN-ul a fost inserat în bacteriofagi; ca gazdă bacteriană s-a folosit *E. coli*. S-a elaborat un model în care antigenele produse prin inginerie genetică pot fi apreciate candidați potențiali pentru un vaccin cu subunități. Se impune a izola epitopi antigenici imunogeni la *E. tenella*, în număr cât mai mare, pentru prepararea vaccinurilor plurivalente (Euzéby, 1987).

Imunizarea cu sușe eimeriene atenuate

Atenuarea se realizează prin tratarea oochisturilor sporulate cu agenți fizici: căldura, frigul, ultrasunetele, radiațiile X, γ și ultraviolete (Jungmann și Micke, 1989). Aceste preparate vaccinale nu acționează imunogenetic decât dacă determină o infecție potentă; ele nu produc, în caz contrar, imunitate și, pe de altă parte, dacă atenuarea este insuficientă, "vaccinarea conferă o eimerioză" (Euzéby, 1987).

Atenuarea se mai poate obține prin pasaje în serie pe embrioni de pui. Nakai și Ogimoto

(1987) a pasat succesiv de 51 de ori o sușă de *E. tenella* de origine japoneză. Atenuarea produce diminuarea în talie a schizonților de generația a II-a și localizarea superficială a paraziților în epiteliu. Aceste sușe atenuate sunt imunogene.

Atenuarea eimeriilor mai poate fi legată de "precocitatea" sușelor parazitare, obținute prin dezvoltare endogenă rapidă. Sușele "precoce" rămân imunogene, însă sunt mai puțin patogene și prolifiche decât cele normale și imunogenitatea lor se menține după pasaje pe animale. Sușele de *E. tenella* cu prepatența de 96 ore în loc de 168 ore își pierd puterea patogenă, dar nu și pe cea imunogenă (McDonald și colab., 1985).

Un vaccin cu eimerii precoce - "Paracox" - a fost experimentat de Yvoré și colab. (1993) pe pui, întreținuți la sol. Conține 7 specii: *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. mitis* și *E. praecox* (Tabel 1) (Bednik și colab., 1995). Performanțele productive la puii vaccinați au fost egale sau superioare celor tratați cu Salinomycină. Vaccinul a protejat bine puii față de speciile cecale, mai puțin bine față de *E. acervulina* și *E. maxima*.

Imunizarea cu sușe eimeriene virulente

Sușele eimeriene virulente se administrează pe căi care determină să-și piardă patogenitatea:

- administrări parenterale sau traheale - procedee care nu dau rezultate bune;
- administrare *per os* de doze slabe (1-20 oochisturi/zi), cu reinfecții spontane, continue - procedeu utilizat pentru imunizarea păsărilor.

"Immucox" este un vaccin oral antieimerian pentru pui și curcani, folosit în Canada, din 1985. Conține doze scăzute, uniforme, cu oochisturi vii. Greutatea la livrare și conversia hranei au fost ușor superioare la păsările vaccinate (Lee, 1989).

În SUA s-a preparat un vaccin, "Coccivac", constituit din oochisturi sporulate, nemodificate, dar în număr redus, de *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. hagai*, *E. maxima*, *E. mivati*, *E. necatrix*, *E. praecox*, *E. tenella* (Euzéby, 1987).

Tabel 1
Vaccinuri comerciale din oochisturi vii împotriva coccidiozei la pui
(modificat, după Bedrnik și colab., 1995)

Vaccin	Producător	Antigene	Aplicare	Vârsta puilor la vaccinare (zile)	Prima înregistrare
Coccivac [®]	Sterwin Lab. USA	Amestec de specii de <i>Eimeria</i> virulente	Apă potabilă 1 doză	4-14	1952/USA
Immucox [®]	Vetech Lab. Canada	<i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. tenella</i> , <i>E. necatrix</i> virulente	Apă potabilă 2 doze	4 și 7	1985/Canada
VAC M [®]	Elanco Products Company, USA	<i>E. maxima</i> virulent	Apă potabilă		1989/USA
Paracox [®]	Mallinckrodt Veterinary Ltd.	Linii precoce de <i>E. acervulina</i> , <i>E. brunetti</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. mitis</i> , <i>E. necatrix</i> , <i>E. praecox</i> , <i>E. tenella</i>	Apă potabilă 1 doză	5-9	1992/UK
Livacox [®] D	Biopharm, Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, Czech Republic	Linii atenuate de <i>E. acervulina</i> , <i>E. tenella</i>	Apă potabilă 1 doză	7-10	1992/CR
Livacox [®] T		<i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. tenella</i>	Apă potabilă 1 doză	7-10	1992/CR
Livacox [®] Q		<i>E. tenella</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. acervulina</i> ,	Apă potabilă 1 doză	1-10	

Imunizarea cu sușe eimeriene atenuate în asociere cu sușe virulente

S-au efectuat cercetări în eimeriozele păsărilor prin administrarea unei doze masive cu sușe atenuate (2×10^5) de oochisturi sporulate de *E. tenella*, urmată de una slabă cu oochisturi virulente și de reinfecții spontane continue; această metodă nu s-a dovedit superioară precedentei (Euzéby, 1987).

Chimio-imunizarea în eimerioze

Această metodă este bazată pe imunitatea conferită de o infecție naturală, controlată de administrarea unor medicamente anticoccidiene, care lasă să se dezvolte stadiile imunogene și distrug stadiile patogene. Metoda este irealizabilă cu anticoccidienele care acționează asupra stadiilor endogene foarte precoce: sporozoiți, trofozoiți, schizonți I (Euzéby, 1987).

Cu toată diversitatea metodelor vaccinale din eimerioze, ele nu au putut înlocui, până în prezent, mijloacele chimioprevenției, datorită dificultăților de procurare a masei antigenice în cantitate corespunzătoare, de cultivare a eimeriilor pe culturi celulare, cât și evoluției coccidiozelor cu etiologie polispecifică, necesitând vaccinuri polivalente (Șteu, 1988).

Imunoprofilaxia eimeriană la rumegătoare

Până în prezent, nu există publicații care să semnaleze existența unor vaccinuri antieimeriene înregistrate pentru utilizare la rumegătoare mici. Totuși, există experimentări prin care se încearcă imunizarea artificială a vițelilor, mieilor și ieșilor cu ajutorul oochisturilor sporulate sau sporozoiților (Cozma, 1996).

Ziegler (1982) a preparat un vaccin din oochisturi atenuate prin iradiere și a constatat că vițelii vaccinați au o eliminare mai redusă de oochisturi. Eficacitatea vaccinului a fost de 84% la *E. bovis* și 72,9% la *E. auburnensis* (Eller, 1991).

Imunoprofilaxia eimeriozei mieilor prin utilizarea de oochisturi evolute a fost sugerată de metoda utilizată în imunizarea puilor de găină. Și la aceștia din urmă, administrarea oochisturilor infectante, sub formă de infecție "picătură cu picătură", s-a dovedit superioară infecțiilor unice sau multiple în doze mari.

Experimentările privind imunoprofilaxia la ovine sunt extrem de parcimonioase. Catchpole și colab. (1993) au efectuat imunizarea mieilor utilizând două specii eimeriene: *E. crandallis* și *E. ovinoidalis*, loturile imunizate "picătură cu picătură" fiind mai bine protejate chiar decât martorul neinfestat.

Cercetările noastre, în care s-a folosit ca material antigenic un amestec de specii eimeriene existente și în condiții naturale, în zone din nord-vestul României, au relevat coproeliminări oochistale mai reduse, absența simptomelor și spor în greutate crescut, la mieii infectați "picătură cu picătură" față de animalele martor (Cozma, 1995).

Adaptarea pe scară largă a vaccinării, ca o latură importantă a controlului eimeriozelor la animale, este foarte atractivă. Este o formă de control adecvată, total naturală, fără probleme de reziduuri medicamentoase, toxicitate sau sporirea rezistenței. Asemenea avantaje sunt de o reală valoare în aceste vremuri de presiune și politică internațională ecologistă. Mai mult, folosirea de linii de *Eimeria* atenuate, sensibile la medicamente, va duce la obținerea naturală de organisme ușor controlabile, în detrimentul omologilor lor patogeni, exercitându-se un nou tip de presiune selectivă, în favoarea simbiozei și nu ca parazitism. Pe de altă parte, eliberarea, prin vaccinare, a unor asemenea linii în mediu va prelungi, probabil, viața actualelor medicamente disponibile și va întârzia apariția rezistenței (Parry și colab., 1989).

SUMMARY

Vaccination against Coccidiosis – Actual facts and perspectives

Vaccination against *Eimeria* species is a natural form of total control, without

medicinal residues, without any degree of toxicity or increase of the level of resistance.

Immunoprophylaxy of *Eimeria species* in poultry is performed with isolated antigenes (alantoidian fluid of infected chicken embryos; the upper layer of cell cultures infected with *Eimeria species*), with *Eimeria* attenuated line-cells (by physical agents, by

serial passage in chickens embryos), with virulent *Eimeria* line-cells (1-20 oocysts/day) and by chemoimmunization (natural controlled infection with Coccidiosis).

Eimeria immunoprophylaxy in young ruminants is realized with the help of sporulated oocysts or sporozoytes.

Bibliografie

BEDRNIK, P.; HIEPE, Th.; MIELKE, D.; DRÖSSIGK, U. (1995) - Antigens and immunisation procedures in the development of vaccines against poultry coccidiosis. COST 89/320, Biotechnology. Guidelines on techniques in coccidiosis research. European Commission, Luxembourg.

CATCHPOLE, J.; NORTON, C.C.; GREGORY, M.W. (1993) - Immunisation of lambs against coccidiosis. *Veterinary Record*, 132, 56-59.

COZMA, V. (1993) - Actualități în imunoprofilaxia eimeriozelor la animale. *Buletin USACN-ZMV*, 47, 185-190.

COZMA, V. (1995) - Eimerioza mieilor: cercetări etiopatogenetice, diagnostice și profilactico-terapeutice. Teză pentru obținerea titlului de "Doctor în medicina veterinară", Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca.

COZMA, V. (1996) - Eimerioza mieilor. Edit. Sincron, Cluj-Napoca.

ELLER, G. (1991) - *Eimeria* infectionen bei kälbern: Vorkommen und Verlauf bei unterschiedlichen Haltungsformen. Inaugural Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen.

EUZEBY, J. (1987) - Protozoologie médicale comparée. Vol. 2, Coll. Fond. Marcel Merieux.

JUNGMANN, R.; MIELKE, D. (1989) - Immunoprophylaxy of coccidiosis in poultry with an irradiated *Eimeria tenella* vaccine. *Monatshefte für Veterinar Medizin*, 44(13), 464-466.

LEE, E-H (1989) - Control of coccidiosis in broiler chickens by vaccination. Field trial comparison between "Immucox" (Coccidiosis vaccine) and Halofuginone, Salinomycin program in Texas, USA. *Coccidia and intestinal coccidiomorphs*, V-th International Coccidiosis Conference, Tours (France). Edit. INRA Publ., 49, 661-665.

McDONALD, V.; SHIRLEY, M.W.; CHAPMAN, H.D. (1985) - Attenuation of *Eimeria species*: further characterisation of two lines of *Eimeria mitis*. *Research in Veterinary Science*, 39, 328-332.

McKENZIE, M.E.; LONG, P.L. (1986) - Immunization of chickens against Coccidiosis with extracts of *Eimeria* infected tissues. *Poultry Science*, 65, 892-897.

NAKAI, Y.; OGIMOTO, K. (1987) - Attenuation of *Eimeria tenella* by serial passage in chicken embryos. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 49(2), 245-249.

PARRY, S.; BARRATT, M.E.J.; DAVIS, P.J.; JONES, S. (1989) - Theoretical and practical aspects of vaccination against coccidiosis. *Coccidia and coccidiomorphs*, V-th International Coccidiosis Conference. Tours (France), Edit. INRA Publ., 49, 617-631.

SOULSBY, E.J.L. (1989) - Systeme immunitaire et parasites gastro-intestinaux: quels sont les obstacles à la production des vaccins. *Ann. Méd. Vét.*, 132(3), 227-230.

STROUT, R.G.; SCHMATZ, D.M. (1990) - *In vitro* culture of *Coccidia*/Biochemistry. In: "Coccidiosis of man and domestic animals", Ed. P.L.Long, 221-234, CRC Press.

ȘUTEU, E. (1988) - Boli parazitare la animale. Curs
Tîpo Agronomia, Cluj-Napoca.

YVORE, P.; NACIRI, M.; CONAN, L.;
MANCASSOLA, R. (1993) - Essai du vaccin Paracox
(ND) dans le contrôle de la coccidiose chez le poulet
jaune. *Revue Méd. Vét.*, 144(3), 197-200.