

## PROTECTION OF BREEDER FLOCKS AGAINST INFECTIOUS BURSAL DISEASE IN FIELD CONDITIONS BY AN INACTIVATED WATER-IN-OIL-IN-WATER VACCINE

Stanislav CAJAVEC<sup>1</sup>, Zdenko BIDIN<sup>2</sup> and Biserka POKRIC<sup>3</sup>

<sup>1</sup>PLIVA d.d., Animal Health, 10 000 Zagreb, Ul. grada Vukovara 49, Croatia

<sup>2</sup>Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Heinzelova 55, Croatia

<sup>3</sup>Ruder Bošković Institute, 10002 Zagreb, p.p. 180, Croatia, e-mail: [pokric@rudjer.irb.hr](mailto:pokric@rudjer.irb.hr)

## ЗАШТИТА НА РОДИТЕЛСКИТЕ ЈАТА ПРОТИВ ИНФЕКТИВЕН БУРЗИТИС ВО ТЕРЕНСКИ УСЛОВИ СО ИНАКТИВИРАНА ВОДА-ВО-МАСЛО-ВО-ВОДА ВАКЦИНА

Станислав ЧАЈАВЕЦ<sup>1</sup>, Зденко БИДИН<sup>2</sup> и Бисерка ПОКРИК<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ПЛИВА а.д., Ветерина, 10 000 Загреб, Ул. града Вуковара 49, Хрватска

<sup>2</sup>Ветеринарен факултет, Загребски универзитет, 10000 Загреб, Хензелова 55, Хрватска

<sup>3</sup>Институт Ружер Бошковић, 10002 Загреб, п.п. 180, Хрватска, е-маил: [pokric@rudjer.irb.hr](mailto:pokric@rudjer.irb.hr)

### INTRODUCTION

The incidence of vvIBDV in Croatia by 1995 and later seems to be a consequence of the global spread and resulted in up to 60% and 20% mortality of layers and broilers, respectively. Vaccination of parent stock with a live vaccine and revaccination with an inactivated vaccine prior to the point of lay was proposed as a prophylactic measure in order to ensure transfer of maternal antibodies (MN-Abs) to progeny. For this purpose an inactivated vaccine, adjuvanted by a multiple, stable water-in-oil-in-water emulsion (WOWE) of low viscosity, was designed. IBDV-WOWE vaccine was tested in order to determine its ability to elicit a level of specific antibodies in parents which should result in improved progeny protection.

### MATERIALS AND METHODS

IBD viruses, Winterfield 2512 strain, were propagated in chicken eggs. Viruses were inactivated with 0.1% v/v formalin. Safety testing, carried out on embryonated eggs, proved that the inactivation completely abrogated the infectivity. The amount of viral material incorporated in a vaccine dose, corresponding to non-inactivated viruses amounted to between 0.5 x 10<sup>6.5</sup> and 2.0 x 10<sup>6.5</sup> EID<sub>50</sub>. Vaccine was prepared in the form of a WOWE (Bidin et al., 1998; Čajavec et al., 1996; 1997) so that one volume part of stock vaccine was mixed with three volume parts of WOWE. The WOWE contained Tween 80 (polysorbate 80) and Arlacel 83 (sorbitan sesquioleate) as the aque-

### ВОВЕД

Појавата на високо вирулентниот вирус на инфективен бурзитис (ввВИБ) во Хрватска во 1995 и подоцна се чини дека е последица на глобалното ширење и резултираше со 60% морталитет кај несилките и 20% кај бројлерите. Вакцинацијата на родителската живина со жива вакцина и ревакцинацијата со инактивирана вакцина пред моментот на носење беше предложено како профилатичка мерка за да се осигура пренесувањето на мајчинските антитела (MN-Abs) на потомството. За оваа цел беше креирана инактивирана вакцина со повеќекратна, стабилна вода-во-масло-во-вода емулзија (ВМВЕ) со ниска вискозност како адјуванс. ВИБ-ВМВЕ вакцината беше тестирана за да се одреди нејзината способност да изнуди одредено ниво на специфични антитела кај родителите што треба да резултира во подобрена заштита на потомството.

### МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Вирусите на ИБ, видот Винтерфилд 2512, беа размножувани во оплодени јајца. Вирусите беа инактивирани со 0.1% v/v формалин. Сигурносно-то тестирање извршено на ембрионални јајца покажа дека инактивацијата целосно ја онеспособи инфективноста. Количината на вирусен материјал; инкорпориран во една доза вакцина кој одговара со неинактивираниот вирус изнесува помеѓу



ous- and oil-phase surfactant, respectively. WOVE vaccine characterised low content (30% v/v) of light mineral oil Bayol and high aqueous/oil ratio (2/1). It contained 3.3% w/v of both aqueous- and oil-phase surfactants. The integrity of the emulsion was controlled by a drop test in a manner described elsewhere (Herbert, 1978).

The primary vaccination of both flocks of 4500 light ISA Brown SSL layers and 2400 heavy Hybro breeders was carried out in field conditions at chicken age of 10 days. Chickens received a live IBDV vaccine (Gumbokal, Pliva, Zagreb, Croatia) in drinking water. At the age of 19 and 18 weeks light and heavy pullets, respectively, were both divided in three equal groups and vaccinated with inactivated IBDV-WOVE vaccine. Vaccine was i.m. administered and vaccinal doses amounted to 0.25, 0.5 or 1.0 ml vaccine/bird.

Serological response was monitored during whole laying period. Blood samples for serological testing were taken by brachial vein puncture. In order to take serum samples always from the same birds, 30 birds from each of the flocks were wing-banded prior to blood collection. The separation and inactivation of blood sera were described in detail elsewhere (Pokrić et al., 1993). The levels of anti-IBDV antibodies were determined by ELISA test (FlockCheck<sup>®</sup>, IDEXX, Portland, ME, USA) and the ELISA-titers were calculated according to the manufacturer's instruction (FlockCheck Production Guide, 1991).

Egg records were maintained daily during the period of lay. Egg yolks, taken for the determination of anti-IBDV ELISA-titers were separated from the eggs collected 31 weeks after breeder vaccination. Fifteen eggs were taken for each analysis. Yolks were diluted four times by phosphate-buffered saline (PBS) and analysed according to the protocols for serum analyses. Each serum and egg yolk sample was analysed twice.

Eggs, collected 31 weeks after vaccination of dams, were hatched. Sera from 3- and 10-day-old hatched chickens were analysed for the presence of maternal antibodies. Hens were observed for gross changes at the injection site. Morbidity and mortality were recorded daily. The dead birds were necropsied and organs were submitted for pathological analysis.

## RESULTS

WOVE contributes to the stability, low viscosity ( $\eta = 3.45$ ), high hydrophile-lipophile balance (HLB = 9.35) and injectability of IBDV. The lack of separation of the oil phase provided evidence that the vaccine was stable for at least 18 months of storage at 2-8 °C.

The levels of specific anti-IBDV antibodies in sera of light layers and heavy breeders vaccinated with the inactivated IBDV-WOVE vaccine were presented in Figure 1 and 2, respectively. Each experimental point in

0,5 x 106,5 и 2,0 x 106,5 EID<sub>50</sub>. Вакцината беше подготвена во форма на ВМВЕ (Биџин и други, 1998; Чајавец и други, 1996; 1997) така што еден волуменски дел од обична вакцина беше измешан со три волуменски делови од ВМВЕ. ВМВЕ содржеше Твин 80 (полисорбат 80) и арлацел 83 (сорбитан сесквиолеат) кои се последователно сурфактанти во водената и маслената фаза. ВМВЕ вакцината е карактеризирана со низок процент (30% v/v) на лесно минерално масло Бајол и висок однос водено/маслено (2/1). Таа содржеше 3.3% w/v на сурфактанти од водената и маслената фаза. Интегритетот на емулзијата беше контролиран со капка тест на начин опишан на друго место (Хербарт, 1978).

Примарната вакцинација на двете јата составени од 4500 лесни ISA Brown SSL несилки и 2400 тешки Хибро родители беше извршено во теренски услови на возраст на пилињата од 10 дена. Пилињата примија жива ВИБ вакцина (Гумбокал, Плива, Загреб, Хрватска) во водата за пиење. На возраст од 19 и 18 недели лесните и тешките пилиња беа последователно поделени во три еднакви групи и вакцинирани со инактивирана ВИБ-ВМВЕ вакцина. Вакцината беше применета интрамускуларно и вакциналните дози изнесуваа 0,25, 0,5 или 1,0 ml вакцина/птица.

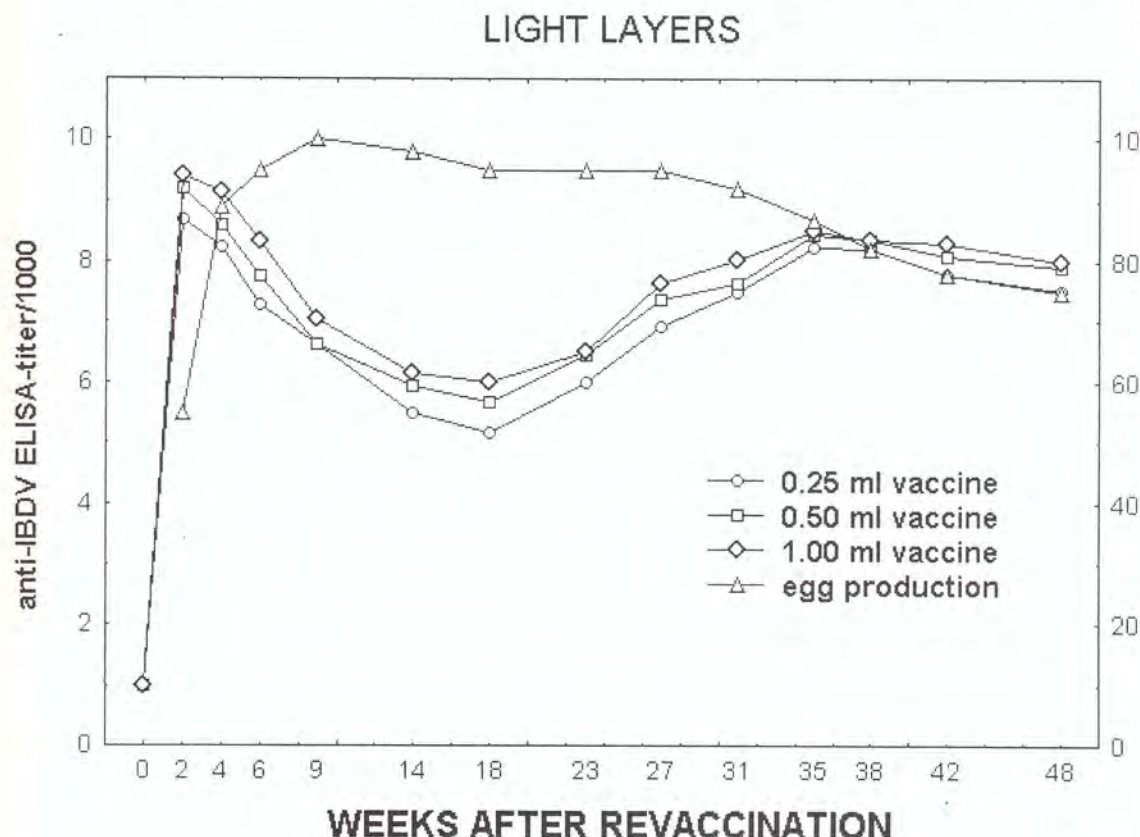
Серолошката реакција беше следена за време на целиот период на носењето. Примероци крв за серолошко тестирање беа земани со пункција на брахијалната вена. За да се земат примероци од серумот секогаш од истите птици, на 30 птици од секое јато им беше ставено ознака на крилото пред земањето на крв. Сепарацијата и инактивацијата на крвните серуми беа детално опишани на друго место (Покриќ и други, 1993). Нивоата на анти-ВИБ антитела беа одредени со ELISA тест (Flock Check<sup>®</sup>, IDEXX, Портланд, МЕ, САД) и ELISA-титрите беа пресметани според упатствата дадени од страна на производителите. Flock Check Водич за производството, 1991).

Се водеше дневна евиденција за јајцата за време на периодот на носење. Жолчките од јајцата, кои беа земени за одредување на анти-ВИБ ELISA-титрите, беа одвоени од јајцата собрани 31 недела по вакцинацијата на родителите. 15 јајца беа земени за секоја анализа. Жолчките беа 4 пати разредувани со фосфатно пуферизиран солен раствор (ФПЦР) и анализирани според протоколите за анализа на серум. Секој примерок од серум и жолчка од јајце беше анализиран два пати.

Јајцата, собрани 31 недела по вакцинацијата на женките, беа инкубирани. Серумите од три и десет дена старите испилени пилиња беа анализирани за да се открие присуство на мајчински ан-



**Figure 1.** Serological response (ELISA-titer) of light layer revaccinated with 0.25, 0.5 or 1.0 ml IBDV-WOWE vaccine/bird prior to the period of lay.  
The egg production during the period after revaccination of layers with IBDV-WOWE vaccine.



Figures 1 and 2, representing the serological response (ELISA-titer), is an arithmetic mean of titers determined in duplicate in serum samples taken from 30 birds.

The vaccination of hens with inactivated IBDV-WOWE vaccine generated a progressive increase in antibody production which declined after reaching a maximum level (Figures 1 and 2). Minimum antibody production was observed in the post-vaccination period between 14 and 23 weeks in light layers and between 9 and 18 weeks post-vaccination in heavy breeders. Afterwards, antibody levels increased again. The second antibody level peak was reached in light hens between 35 and 38 weeks post-vaccination and between 23 and 27 weeks post-vaccination in heavy hens. Serological response in both light and heavy hens were directly related to the doses of the vaccine administered, but only a small variability between the magnitude of the serological responses of flocks vaccinated with 1.0, 0.5 or 0.25 ml vaccine/bird was found.

The egg production was not affected by the vaccination (Figures 1 and 2). The levels of specific anti-IBDV antibodies in egg yolks were at least twice higher than those in the sera of vaccinated dams (Figure 3). Anti-IBDV

титела. Кокошките беа набљудувани за видливи промени на местото на инјектирање. Морбидитетот и смртноста беа дневно евидентирани. Врз мртвите птици беше извршена некропсија и органите беа дадени на патолошка анализа.

## РЕЗУЛТАТИ

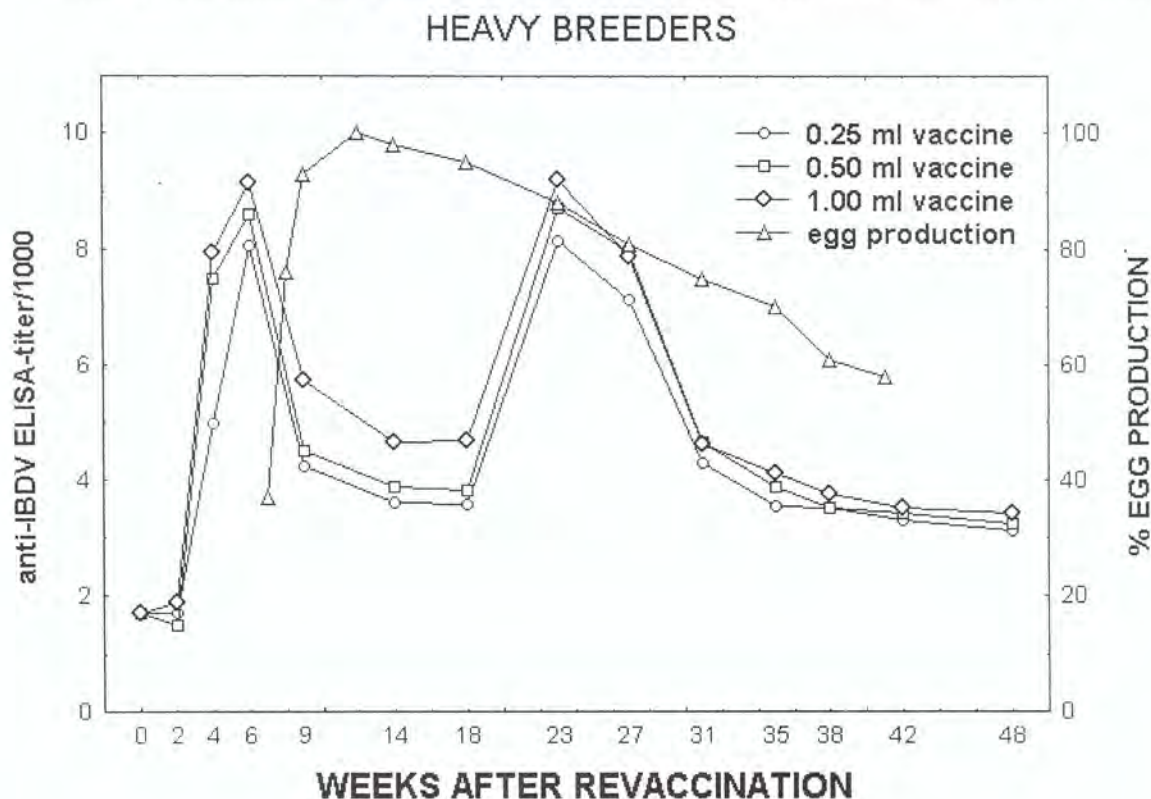
ВМВЕ допринесува за стабилност, ниска вискозност ( $h = 3.45$ ), висока хидрофилна - лиофилна рамнотежа ( $HLB = 9.35$ ) инјектабилност на ВИБ. Недостатокот на одвојување на маслената фаза претставуваше доказ дека вакцината е стабилна барем 18 месеци складирана на температура  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

Нивоата на специфични анти-ВИБ антители во серумите на лесните несилки и тешките родители вакцинирани со инактивирана ВИБ-ВМВЕ вакцина беа презентирани последователно на Сликата 1 и 2. Секоја експериментална точка во Сликите 1 и 2, што ја претставува серолошкиот одговор (ELISA-титар), е аритметичка средина на титрите кои се одредени во дупликат во примероците на серум земени од 30 птици.



Figure 2. Serological response (ELISA-titer) of heavy breeders revaccinated with 0.25, 0.5 or 1.0 ml IBDV-WOWE vaccine/bird prior to the period of lay.

The egg production during the period after revaccination of layers with IBDV-WOWE vaccine.



antibodies were transferred to progeny. ELISA-titer of maternal antibodies in sera of 3-day-old offspring was about 2800 and declined till the 10th day of life (Figure 3).

None of the side effects that accompany the use of oil-adjuvanted vaccines, such as tissue lesions (Yamanaka et al., 1993), were detected at the place of vaccine inoculation. Clinical and pathological examinations proved that neither morbidity nor mortality could be attributed to IBDV.

## DISCUSSION AND CONCLUSION

The purpose of vaccination against IBDV is not the protection of breeders. Generally, older birds are not exposed to IBDV. The vaccine should generate a uniform levels of antibodies which, upon transfer to the progeny, could ensure passive protection during the first days of life (van den Berg & Meulemans, 1991; Lasher & Shane, 1994). Our vaccine was prepared in the form of WOWE, since double WOWEs have proven to be as antigenic as single oil-in-water or water-in-oil emulsions, while being much less viscous and more stable for inoculation (Droual et al., 1990). The low content of mineral oil and the appropriate ratio of oil- and water-surfactants in our WOWE

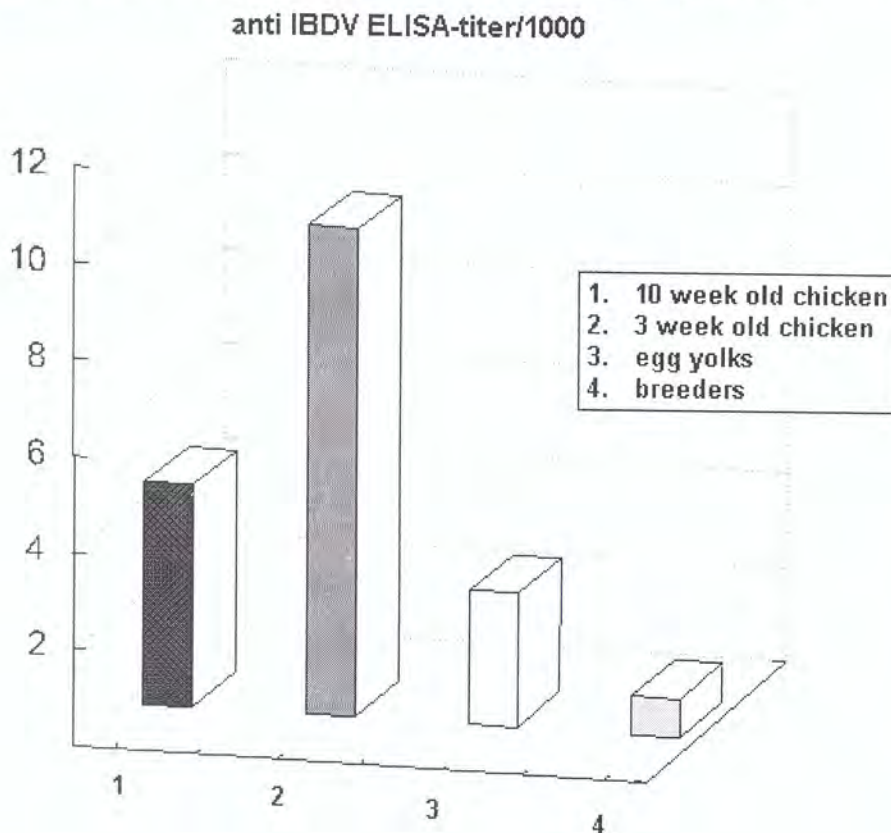
Вакцинацијата на кокошките со инактивирана ВИБ-ВМВЕ вакцина генерираше прогресивен пораст на производство на антитела кое потоа почна да опаѓа кога го достигна максималното ниво (Слики 1 и 2). Минималното производство на антитела беше забележано во поствакцинацискиот период меѓу 14 и 23 недели кај лесните несилки и меѓу 9 и 18 недели по вакцинацијата кај тешките родители. Потоа, нивоата на антителата повторно се зголемија. Вториот врв на нивото на антитела беше достигнато кај лесните кокошки меѓу 35 и 38 недели по вакцинацијата и меѓу 23 и 27 недели по вакцинацијата кај тешките кокошки. Серолошкиот одговор и кај лесните и кај тешките кокошки беше директно поврзан со дозите на применетите вакцини, но беше најдена само мала варијабилност помеѓу големината на серолошките одговори во јатата вакцинирани со 1.0, 0.5 или 2.5 ml вакцина/птица.

Производството на јајца не беше погодено од вакцинацијата (Слики 1 и 2). Нивоата на специфични анти-ВИБ антитела во жолчките од јајцата беа барем два пати повисоки од тие во серумите на вакцинираните женки (Слика 3). Анти



Figure 3. Anti-IBDV antibody levels (ELISA-titer) in sera of heavy breeders determined 31 weeks post-vaccination with IBDV-WOVE vaccine and anti-IBDV antibody ELISA-titer in yolks of eggs hatched 31 weeks post-vaccination.

Levels of maternally derived anti-IBDV antibodies (ELISA-titer) in sera of 3- and 10-week-old chickens hatched from heavy breeder eggs collected 31 weeks post-vaccination.



contributed to the low viscosity of the vaccine. Accordingly, the vaccine has been found to be very suitable for injection without undesirable side effects that accompany oil vaccines. The WOVE formulation could also account for the second rise of specific antibody levels seen at a later stage of the laying period (Figures 1 and 2). The phenomenon of the second antibody level enhancement could be explained by a continuous and increased rate of the release of viral antigens from water droplets dispersed in oil (Pokriæ, 1999; Stone, 1988; Stone et al., 1983). This may have the same effects as repetitive boosting and elicit the repeated increase in serological immune response. So far, the presence of Tween 80 in the vaccine stabilizes emulsion and contributes to a high HLB value resulting in increased dispersability of the water-in-oil emulsion (Ott et al., 1995; Stone, 1988; Stone et al., 1983).

Differences between the serological responses profiles observed in light and heavy hens (Figures 1 and 2) are probably due to genetic factors linked to the reactivity

ВИБ антителата беа пренесени на потомството. ЕЛИСА-титарот на мајчинските антитела во серумите на пилињата стари 3 дена беше околу 2800 и опаѓаше до 10-иот ден на старост. (Слика 3).

Ниедна од нуспојавите кои ја придружува употребата на вакцини со маслен адјуванс, како што се лезиите на ткивото (Јаманака и други, 1993) не беше забележана на местото на примената на вакцината. Клиничките и патолошките испитувања покажаа дека ниту морбидноста ниту смртноста може да се припишат на ВИБ.

## ДИСКУСИЈА И ЗАКЛУЧОК

Целта на вакцинацијата против ВИБ не е заштитата на родителите. Општо гледано, постарите птици не се изложени на ВИБ. Вакцината треба да генерира воедначени нивоа на антитела кои по преносот на потомството треба да осигураат

of the immune system that modifies humoral immune response (Samina et al., 1992). From the cost-benefit point of view, a single revaccination of replacement flocks with our vaccine before the laying period generated a level of maternal antibodies which was sufficient to protect infection-exposed progeny against field challenge (FlockCheck Production Guide, 1991). No additional vaccination, which could influence the egg production, are required.

Acknowledgement: This work was supported by the Ministry of Science and Technology of the Republic of Croatia, Grant Nos. 00981108 and 053006.

гураат пасивна заштита за време на првите денови на живот (Ван ден Берг и Мејлеманс, 1991; Лашер и Шејн, 1994).

Нашата вакцина беше подготвена во форма на ВМВЕ, бидејќи дуплите ВМВЕ покажаа исто толкав антигенски потенцијал како и поединечна масло-во-вода или вода-во-масло емулзија, а во исто време е помалку вискозна и постабилна за вакцинација (Друал и други, 1990). Нискиот процент на минерално масло и соодветниот однос на масло-и вода-сурфактанти во нашата ВМВЕ допринесе за ниската вискозност на вакцината. Соодветно на ова, вакцината се покажа многу погодна за инјектирање без несаканите нуспојави што ги придружуваат маслените вакцини. ВМВЕ формулацијата може исто така да биде причина и за вториот пораст на нивоата на специфичните антитела кои беа забележани во втората фаза на носењето (Слики 1 и 2). Феноменот на второто зголемување на нивоата на антитела може да се објасни со постојаната и зголемена стапка на испуштање на вирусни антигени од малите водени капки распрснати во маслото (Покриќ, 1999; Стоун, 1988; Стоун и други, 1983). Ова може да ги има истите ефекти како и репетитивното засилување и да го овозможи повторниот пораст во серолошката имунолошка реакција. До сега, присуството на Твин 80 во вакцината ја стабилизира емулзијата и допринесува за високата НЛВ вредност што резултира со зголемена распрснатост на вода-во-масло емулзија (От и други, 1995; Стоун, 1998; Стоун и други, 1983).

Разликите помеѓу профилите на серолошките реакции забележани кај лесните и тешките кокошки (Слики 1 и 2) најверојатно се должат на генетските фактори кои се поврзани со реактивноста на имунолошкиот систем која ја модифицира хуморалната имунолошка реакција (Самина и други, 1992). Од економска гледна точка, една ревакцинација на јатата за замена со нашата вакцина пред периодот на носење генерираше ниво на мајчински антитела кој беше доволен да го заштити потомството кое е изложено на зарази од предизвиците на теренот (Flock Check Водич за производство, 1991). Никаква додатна вакцинација која би можела да влијае врз производството на јајцата не е потребна.

Благодарност: Ова дело беше помогнато од страна на Министерството за наука и технологија на Република Хрватска, Грант бр. 00981108 и 053006.



## REFERENCES

---

1. BIĐIN Z., ČAJAVEC S., SLADIĆ D., ERGOTIĆ N., CIZELJ A., POKRIĆ B. (1998) Protection of broiler breeders by an inactivated combined water-in-oil-water viral vaccine. *Acta Vet. Hung.* **46**: 25-34.
  2. ČAJAVEC S., BIĐIN Z., SLADIĆ D., POKRIĆ B. (1996) Tween 80-solubilized Newcastle virus prepared as a water-in-oil-water vaccine. *Avian Dis.* **40**: 193-201.
  3. ČAJAVEC S., SAVIĆ G., CIZELJ A., BIĐIN Z., POKRIĆ B. (1997) The primary chicken vaccination against Newcastle disease with antigenic virus subunits prepared in a water-in-oil-in-water emulsion. *Period. Biol.* **99**: 39-44.
  4. DROUAL R., BICKFORD A.A., CHARLTON B.R., KUNLY D.R. (1990) Investigation of problems associated with intramuscular breast injection of oil-adjuvanted killed vaccines in chickens. *Avian Dis.* **34**: 473-478.
  5. *Flock Check Production Guide* (1991) Protection levels. Flock Check, IDEXX Corp., Portland, ME, USA.
  6. HERBERT W.J. (1978) Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animals. In: Weir M.D. (ed.) *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. A3.1-A3.13.
  7. LASHER H.N., SHANE S.M. (1994) Infectious bursal disease. *World's Poult. Sci. J.* **50**: 134-166.
  8. OTT G., BARCHFELD G.L., VAN NEST G. (1995) Enhancement of humoral response against influenza vaccine with the simple submicron oil/water emulsion. *Vaccine* **13**: 1557-1562.
  9. POKRIĆ B. (1999) Adjuvant emulsions. *Period. Biol.* **101**: 283-302.
  10. POKRIĆ B., SLADIĆ D., JUROŠ S., ČAJAVEC S. (1993) Application of immune complex for immune protection against viral disease. *Vaccine* **11**: 655-659.
  11. SAMINA I., BRENNER J., PELEG (1992) Differences in protection between heavy and light breeders of chickens following vaccination with Newcastle disease vaccine. – A survey of data, 1971 to 1990. *Avian Pathol.* **21**: 693-697.
  12. STONE H.D. (1988) Optimization of hydrophilic-lipophilic balance for improved efficacy of Newcastle disease and avian influenza oil-emulsion vaccines. *Avian Dis.* **32**: 68-70.
  13. STONE H.D., BRUGH M., BEARD W.C. (1983) Influence of formulation on the efficacy of experimental oil-emulsion Newcastle disease vaccines. *Avian Dis.* **27**: 688-697.
  14. VAN DEN BERG T.P., MEULEMANS G. (1991) Acute infectious bursal disease in poultry: Protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. *Avian Pathol.* **20**: 409-421.
  15. YAMANAKA M., OKABE T., NAKAI M., GOTO N. (1993) Local pathological reactions and immune response of chickens to ISA-70 and other adjuvants containing Newcastle disease virus antigen. *Avian Dis.* **37**: 459-466.
-