

## Broylelerde İn Ovo Teknik ve Ticari Uygulamaları

Arzu ÜÇTEPE YİĞİT

Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Isparta  
Sorumlu yazar: arzuuctepe@sdu.edu.tr

Geliş tarihi: 2016.02.08, Yayına kabul tarihi: 2016.04.11

**Özet:** Son otuz yıl boyunca broyler embriyolarında in ovo tekniğın kullanıldığı birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Araştırmalarda çeşitli aşı antikorları, besin maddeleri, hormonlar ve bir takım uyarıcı solüsyonlar uygulanmıştır. Araştırmalar, yumurtadan yeni çıkmış civcivler ve ilerleyen yaşlardaki broylerlerde iskelet, kas, sindirim, endokrin sistemleri ve performans özellikleri üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla yürütülmüştür. Araştırmalar sonucunda, in ovo tekniğın çıkış gücü, vücut ve organ ağırlıklarını artırması, hastalık ve ölüm oranını düşürmesi, yemden yararlanma oranını iyileştirmesi, iskelet, kas ve bağırsak gelişimini desteklemesi ve cinsiyet değıştirme üzerindeki etkileri gibi avantajları ortaya konmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Broyler, in ovo teknik, aşı, besin maddeleri, hormon

### In Ovo Method and Its Commercial Applications in Broilers

**Abstract:** Over the past three decades, many studies that used in ovo method have been made in broiler embryos. Various vaccine antibodies, nutrients, hormones and some stimulating solutions were applied in these studies. The studies have been conducted to investigate effects on skeletal, muscular, digestive and endocrine systems in hatchlings and their older ages in broilers. As a result of studies, some advantages of in ovo method have been revealed as incresing hatchability of fertile eggs, body and organ weights, decreasing morbidity and mortality, improving feed intake and feed efficiency, supporting skeletal muscle and intestine development and sex reversal effects.

**Key words:** Broiler, in ovo method, vaccine, nutrients, hormone

### Giriş

İn ovo teknik, kuluçka döneminde veya kuluçkadan hemen önceki dönemde kanatlı yumurtalarına çeşitli besin maddeleri, aşı, hormon, uyarıcı ve sıvı solüsyonların enjeksiyonu esasına dayanan biyoteknolojik bir uygulamadır.

Sert bir kabukla çevrelenen kanatlı yumurtaları, normal koşullarda dış çevreden herhangi bir besin maddesi alamamakta ve aynı zamanda çevreye hiçbir atık madde verememektedir. Dolayısıyla embriyo gelişimi için gerekli enerji kaynaklarını oluşturacak maddelerin yumurtanın oluşum aşamasında yumurta içerisinde birikmesi gerekmektedir (Palmer and Guilette Jr, 1991; Richards, 1997; Vieira, 2007). Bu birikim, başka bir ifadeyle besin madde içerikleri her yumurtada farklı olmaktadır.

Bu farklılık da civcivlerin ve dolayısıyla ileriki dönem yaşlarda sürülerin yaşam ve verim parametrelerini etkilemektedir. Sözü edilen parametreleri iyileştirmek ve daha üniform hale getirmek için kanatlı yumurtalarına kuluçka döneminde veya kuluçkadan hemen önceki dönemde in ovo tekniğı ile bir takım besin takviyeleri uygulanmaktadır (Ricks et al., 2003; Kadam et al., 2013). Bu incelemelerin yanı sıra daha embriyo aşamasındaki yumurtalara ileriki dönemlerde ciddi sorunlar oluşturabilecek hastalık aşularının enjeksiyon uygulamaları araştırılmaktadır (Sarma et al., 1995; Weber et al., 2004; Hassanzadeh et al., 2006). Ayrıca hormonal sisteme ve cinsiyet gelişimine direkt etki eden maddelerin enjeksiyon çalışmaları da yürütülmüştür.

(Henry and Burke, 1999; Zhao et al., 2007; Fazli et al., 2015). Bu derlemede bahsi geçen çalışmalar ve bu çalışmalarda kullanılan in ovo teknik irdelenecektir.

#### *İn ovo teknik uygulamalarının başlangıcı*

Kanatlı sektöründe genetik seleksiyon, besleme, hastalık kontrolü ve manejman uygulamalarını kolaylaştıran ve işten tasarruf sağlayan in ovo tekniğin patenti ilk olarak 1985 yılında Embrex (günümüzde Pfizer Animal Health Global Poultry'nin bir kolu) tarafından alınmıştır (Sharma and Burmester 1984; Johnston et al. 1997). Bundan on yıl sonra yine Embrex tarafından otomatik olarak yumurta enjeksiyonu yapabilen Inovoject® sistemi geliştirilmiştir. Embrex aynı zamanda bu sistemle yeni biyolojik yaklaşımları karşılaştırmak amacıyla araştırma programları başlatmıştır (Johnston et al. 1997). Olumlu sonuçlar alınan birçok çalışma neticesinde in ovo uygulamaları 1991 yılında ilk kez ticari olarak kullanılmış, ilk bilimsel araştırma ise Sharma and Burmester (1982)'in, Beyaz Leghornlar'da Marek hastalığına karşı in ovo aşılama tekniğini kullandıkları çalışmaları olmuştur (Sharma, 2014). 1995 yılının ortalarında Kuzey Amerika'da broyler embriyolarının % 55'i Marek hastalığına karşı inovoject sistemi ile aşılanmıştır. Yaklaşık olarak, aylık 400 milyon üzerinde, yıllık ise yaklaşık 5 milyar broyler yumurtası in ovo tekniğiyle aşılanmıştır (Johnston et al. 1997). 2006 yılının sonlarında, Amerika'da broylerlerin % 80'inden fazlası Marek'e karşı in ovo teknik ile aşılanmıştır (Toro et al. 2007). İn ovo aşı uygulamaları 2009 yılında % 85'inden fazlası Amerika olmak üzere Japonya, Avustralya ve Avrupa'da 34 farklı ülkede kullanım alanı bulmuştur (Williams ve Hopkins, 2011).

İn ovo uygulamaları en yaygın olarak aşı programlarında kullanılmaktadır. Pfizer Animal Health'in lisanslı in ovo aşıları: MDV (Marek aşısı 3 serotip), IBDV (Gumboro), Fowl Pox (poxvirüs), AAC (IBDV), Eimeria spp. (coccidia), FP vektör LT, HVT vektör IBDV ve ND (Newcastle)'dir. Günümüzde, ticari anlamda en çok kullanılanları ise başta Marek hastalığı Serotip 1 (CVI 988 suş, Rispens),

Serotip 2 (SB-1), Serotip 3 (FC126 suş, HVT) olmak üzere, IBDV 2512 antikör-virüs kompleksi (Bursaplex) ve az oranda Poxvirüs'tür (Islam et al. 2001). Bunların dışında yakın gelecekte kullanım olanağı bulunabilecek Reovirus ve Eimeria aşıları üzerine çalışmalar sürdürülmektedir. İn ovo teknolojisinin ticari platformda gelişmesiyle birkaç aşı antijeni –multivalent in ovo aşı: HVT, CVI988, SB1-MDV, BII-IBDV, RPF-NDV- saatte 50 binden fazla yumurtaya eş zamanlı olarak enjekte edilebilmektedir (Williams and Zedek, 2010). Bunlardan HVT (Marek) ve Gumboro (Bursaplex) aşıları ülkemizde de ruhsatlı olarak kullanım olanağı bulmuştur.

#### *İn ovo enjeksiyon bölgeleri*

Kuluçkanın geç döneminde özellikle aşı uygulamaları için kullanılmakta olan embriyoyu çevreleyen yapıları ifade eden allantoik kese, amniyotik kese ve yumurta sarısı kesesi (ekstra-embriyonik alan), embriyo / embriyo gövdesi (intra-embriyonik alan) ve hava boşluğu olmak üzere beş temel in ovo bölgesi bulunmaktadır. İn ovo teknikte ırk, yumurtaların depolama yaşı, enjeksiyon bölgesi, iğne tipi, gauge (iğne kalınlık değeri), enjeksiyon iğnesinin uzunluğu (ticari uygulamalarda çoğunlukla 16- 23 gaugelik iğne ve 2,0-3,2 mm derinlik kullanılmaktadır), embriyonun gelişim aşaması ve hatta küçük etkiye sahip olsa da yumurtanın şekil ve büyüklüğü enjekte edilen maddelerin etkinliği açısından önem arz etmektedir (Islam et al. 2003; Moreira de Souza, 2008; Williams, 2008; Islam et al., 2001). Her bir bölge embriyoya giden belli bir yolu temsil etmektedir. Dolayısıyla belirli tip aşı ve antijenler, besin madde, hormon ve solüsyonlar embriyo tarafından absorpsiyonu göz önüne alınarak farklı bölgelerden enjekte edilmektedir. Dahası, embriyo çoğunlukla in ovo enjeksiyon için kabul gören 18-19 günlük embriyo yaşı döneminde çok hızlı değişmektedir. İn ovo bölgeleri ve içerdikleri sıvılar farklı işlev ve içerikte olduğundan embriyonun yanıtını değiştirebilmekte ya da kısıtlayabilmektedir. Atık ve besin maddelerinin ayrımı kuluçka boyunca embriyonun hayatta kalması için kritik rol oynamaktadır. Dolayısıyla bu

bağlamda enjeksiyon maddesinin etkinliği doğru bölgeye uygulanması ile gerçekleşebilmektedir (Williams, 2008). Wakenell et al. (2002), Marek aşısının hava boşluğu ve allantoik keseye uygulandığında hastalıktan korunmada etkili olmadığını ancak amniyotik sıvıya ve embriyoya uygulandığında civcivlerin yüksek korunma indeksine sahip olduklarını belirtmişlerdir.

İn ovo aşı uygulaması manuel veya otomatik sistemler aracılığı ile yapılabilmektedir. Broiler embriyolarında HVT aşısının manuel olarak ekstra ve intra embriyonik alanlara uygulama etkinliğinin araştırıldığı çalışmada, ekstra embriyonik alana enjeksiyonun, virüslerin kana geçişini geciktirdiği ve Marek hastalık virüsüne karşı çok düşük koruma gösterdiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, bu bulguların tersi olarak intra embriyonik enjeksiyon uygulanan civcivlerde virüslerin kana geçişinin daha erken olduğu ve hastalıktan korunma düzeyinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Islam et al., 2001). İki ticari in ovo sistemi olan İnoject (Pfizer Animal Health) ile İntelligent (Avitech)'in kıyaslandığı çalışmada Marek aşısı 18 ve 19 günlük yaştaki broiler embriyolarına enjekte edilmiştir. 18. gündeki enjeksiyonun İnoject'de İntelligent'a göre çıkış gücünün % 2,32 arttığı, geç dönem embriyo ölümlerinin düştüğü ancak 19. gündeki enjeksiyonun çıkış gücü ve geç dönem embriyo ölümlerinin her iki sistemde de benzer olduğu bildirilmiştir (Williams and Zedek, 2010).

Optimum enjeksiyon zamanı yumurta sarısı kesesinin abdomene çekilmesinin başlaması ve başın external kabuk kırılmasına kadar kanadın altına kırılması arasındaki fizyolojik gelişim döneminde gerçekleşmektedir. Bu durumda, in ovo zamanı için en düşük sınır kuluçkanın 17,5. günü en yüksek sınır ise 19,2. günü olarak kabul edilmektedir (Moreira de Souza, 2008; Williams, 2008). Kuluçkanın 17. gününün

ilk saatlerinde yapılan uygulamanın 18. günle kıyaslandığında çıkışta % 1-2 oranında düşüşe sebep olduğu bildirilmiştir (Williams, 2008). En iyi in ovo zamanının belirlenmesinin amaçlandığı çalışmada kuluçkanın 421, 429, 437 (17,5-18 günlük embriyonik yaş), 445, 453 ve 461. (18,5-19,2 günlük embriyonik yaş) saatlerinde broiler embriyolarının amniyonuna % 0,9'luk sodyum klorit solüsyonu (salin) enjekte edilmiş ve farklı saat gruplarının çıkış gücü ve organ ağırlıkları parametreleri açısından kıyaslanması için enjeksiyon uygulanmayan kontrol grubu kullanılmıştır. Çalışma sonucunda çıkış gücü ve civciv çıkış uzunluğu, kontrol grubu ve 453. saat enjeksiyon uygulanan grupta yüksek, eksternal kabuk kırılması 461. saat enjeksiyon uygulanan grupta yüksek bulunmuştur. Ayrıca tüm enjeksiyon saatlerinin karaciğer, kalp, bağırsak ve ince bağırsak ağırlıkları üzerinde etkili olmadığı ancak 429. ve 461. saatlerdeki enjeksiyonların göğüs ve but ağırlığını artırdığı saptanmıştır (Moosanezhad et al., 2011).

Enjeksiyon iğneleri tarafından yumurtadan yumurtaya taşınabilecek, çevre ve ekipmanlardan bulaşabilecek bakteri, protozoa, özellikle Aspergillus (Williams and Brake, 2000) gibi funguslar ve hatta kabuğun kendi üzerindeki mikroplara karşı dezenfeksiyon yapılması gerekmektedir. Bu amaçla in ovo teknikle hem sistem ekipmanlarının dezenfeksiyonunda hem de direkt enjekte edilen aşının içerisinde kullanılabilen, embriyo tarafından tolere edilebilen, kabukta artık kimyasal bırakmayan ve savunma düzeyi yüksek olduğundan dolayı en çok kullanılan dezenfektan % 0,5'lik aktif klorin solüsyonudur (Williams, 2002).

İn ovo teknik ile hastalık aşıları, besin takviyeleri ve hormon uygulamalarını içeren çalışmalar Çizelge 1'de gösterilmektedir.

Çizelge 1: İn ovo uygulama alanları  
Table 1: In ovo application areas

Yayın <i>Publication</i>	İN ovo maddesi <i>In ovo matter</i>	İN ovo bölgesi <i>In ovo site</i>	Embriyo yaşı (gün) <i>Embryo age, day</i>
<i>Hastalıktan korunma/Prophylaxis</i>			
Sharma and Burmester (1982)*	HVT ve Marek aşıları	Allantoik kese, amniyotik kese, yumurta sarısı kesesi, embriyo	11; 17; 18
Sarma et al. (1995)	Bivalent Marek aşısı	Amniyotik kese, embriyo	17,5; 18,5
Guo et al. (2003)	Reovirüs aşısı, reovirus+antikör		18
Islam et al. (2003)	HVT aşısı	Allantoik kese, amniyotik kese, yumurta sarısı kesesi	17,5; 18,5
Weber and Evanst (2003)	Eimeria tenella sporozoit, sporositi ve oositi	Amniyotik sıvı	18
Ding et al. (2004)	3-IE, interleukinler, IFN- $\gamma$	Amniyotik kese	18
Weber et al. (2004)	Eimeria oositleri	Amniyotik sıvı	18
Hassanzadeh et al. (2006)	IBDV, Newcastle aşıları	Embriyo	18
Toro et al. (2007)*	İnsan Ad5 avian influenza aşısı	Embriyo	10; 18
MacKinnon et al. (2009)	CpG#17	Amniyon	18
Islam et al. (2001)	HVT ve Marek aşıları	Allantoik kese, amniyotik kese, yumurta sarısı kesesi, embriyo	17,5; 18,5; 19,5
Mashchenko et al. (2013)	ILTV (Laryngotracheitis virüs) aşısı	Allantoik boşluk, amniyotik sıvı	18
<i>Besleme/Feeding</i>			
Wu et al. (2000)	Monoklonal antikörler	Allantoik kese	15
Ohta and Kidd (2001)	Amino asitler	Yumurta sarısı, extra-embriyonik boşluk, koriyo-allantoik zar	7
Ohta et al. (2001)	Amino asitler	Yumurta sarısı	7
Sawosz et al. (2012)	AgNano, glutemin		1
Ipek et al. (2003)	Askorbik asit		13
Bhanja et al. (2004)	A, E, C, B1, B6 vitaminleri		14
Tako et al. (2004)	Maltöz, sükröz, dekstrin, $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metillbütirat, NaCl	Amniyotik sıvı	17,5
Uni et al. (2005)	Maltöz, sükröz, dekstrin, $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metillbütirat	Amniyon	17,5
Kim et al. (2006)	mAb-c134	Yumurta sarısı, albümin	3
Zhao et al. (2007)	Dehidroepiandrosteron		0
Kornasio et al. (2011)	Dekstrin, $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metillbütirat, NaCl	Amniyotik sıvı	18
McGruder et al. (2011a)	Kafein, teofilin, kreatin, fosfokreatin	Amniyon	16
McGruder et al. (2011b)	Karbonhidrat-elektrolit, tripotasyum, kreatin, teofilin	Amniyon	18
Salahi et al. (2011)	Bütirik asit	Amniyotik sıvı	18,8
Jafari Ahangari et al. (2013)	Arı sütü	Albümin	7
Salmanzadeh (2012)	Glikoz	Albümin	7
Nowaczewski et al. (2012)	Askorbik asit		13; 15; 17
Pineda et al. (2012a)	AgNano		1
Pineda et al. (2012b)	AgNano	Albümin	1
<i>Hormonlar/(Hormones)</i>			
Abinawanto et al. (1996)*	Aromataz inhibitörü, östradiol 17 $\beta$		5
Dewil et al. (1997)	Vorozol		6
Nakabayashi et al. (1998)*	Östradiol 17 $\beta$		5-14
Shimada (1998)*	Fadrozol		5
Burke ve Henry (1999)	Fadrozol		0
Coles et al. (1999)	Peptit YY		18
Henry and Burke (1999)	Testesteron, flutamid	Albümin	0, 8
Kocamis et al. (1999)	Büyüme hormonu	Albümin	1; 4; 7-18
Matsushita et al. (2006)*	Atrazin, imazalil		0
Fazli et al., (2015)	Aromataz inhibitörleri klomifen sitrat, tomoksifen, sarımsak ve domates ekstraktları	Albümin	5

\*Broyler ve broyler damızlıkları dışındaki tavuk ırk veya hatlarını içeren yayınlar

### Hastalıktan Korunma

Aşıların içme suyuna katılması veya sprey şeklinde uygulanması civcivlerin yeterli dozda aşıya ulaşamamasına veya hiçbir şekilde aşılanmamasına sebep olabileceğinden civcivlere istenilen seviyede bağışıklık sağlayamamaktadır. Her civcive aşı uygulamasının garanti altına alınabileceği göz damlası veya enseden aşı yöntemlerinde ise işgücü masrafları artmaktadır. Bilindiği gibi maternal antikörlerin % 70-80'i yumurtaya aktarılmaktadır ancak her yumurta aynı düzeyde antikör içermemektedir. Ayrıca, farklı sürülerden kaynaklanan maternal antikör miktarında üniformite sağlanamadığından aşı zamanını belirlemek zor olmaktadır (Hassanzadeh et al., 2006). Yumurtadan yeni çıkmış civcivlerde yüksek düzeyde maternal antikör düzeyinden dolayı uygulanan aşı, antikörler tarafından nötralize edileceğinden ve diğer taraftan aşının geç uygulanması civcivleri hastalığa karşı korunmasız kılacağından aşının en uygun zamanını belirlemek pratikte önem arz etmektedir. İn ovo aşı uygulamalarının iki temel amacı bulunmaktadır. Bunlardan ilki: aşılama ve çıkış sonrası virüs, bakteri veya protozoalarla temas süresini uzatarak civcivlerin yeterli düzeyde bağışıklık geliştirmelerini sağlamak; ikincisi ise: çıkıştan sonraki civciv müdahalelerini ve çıkış ile eşzamanlı aşı uygulama masraflarını azaltmaktır. Embriyonal aşılama tüm civcivlere eşit miktarda aşı enjeksiyonu sağlamakla birlikte civcivlerin çevreyle temasından önce daha uzun bir bağışıklık kazanım süresi sağlamaktadır (Sarma et al., 1995; Islam et al., 2001). Van den Wijngaard (2002) in ovo bivalent Marek aşısı enjeksiyonu ile geleneksel yöntemler arasında çıkış gücü ve bir günlük civciv kalitesi açısından bir fark olmadığını bildirmiştir. Gumboro (IBDV immun kompleks aşısı) ve Newcastle aşılarının kuluçkanın 18. gününde ticari broyler yumurtalarına ve günlük yaştaki civcivlere uygulandığında çıkış gücü uygulama dönemlerinde sırasıyla % 84,5 ve 84,8 olarak belirlenmiş ve uygulamalar arasında çıkış gücü açısından bir fark olmadığı belirtilmiştir (Hassanzadeh et al., 2006).

Broyler ve damızlık sürülerinde viral

arthritis, emilim bozukluğu sendromu ve kronik solunum hastalığı gibi birçok hastalığa sebep olan reovirüslere karşı korunmada 18 günlük yaştaki broyler embriyolarına reovirüs ve aşı-antikör kompleksi enjeksiyonunun çıkış gücü, hastalık ve ölüm oranı üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir (Guo et al. (2003). Sarma et al. (1995), 17,5 - 18,5 günlük yaştaki ticari broyler embriyolarına ve günlük yaştaki civcivlere bivalent Marek aşısını uyguladıkları çalışmalarında günlük yaşta aşılananlara göre in ovo aşısı uygulananlarda çıkış gücünü düşük, yaşama gücü ve yem etkinliğinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Hastalıktan korunma oranlarını ise in ovo uygulamasında % 89,58 ve günlük aşılama ise % 93,25 oranında tespit etmişlerdir.

Hindi herpes virüsü ve Marek aşılarının farklı dozlarının, farklı embriyonik yaşlardaki (kuluçkanın 17,5, 18,5 ve 19,5.'i günü) ve farklı ağırlıktaki yumurtalara ekstra embriyonik (embriyoyu çevreleyen keseler) ve intra embriyonik (embriyo gövdesi) bölgelere aşılama sonucunda, embriyo yaşının bahsi geçen aşılama bölgeleri üzerinde etkili olduğu, yumurta ağırlığının ise aşılama bölgeleri üzerinde etkili olmadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, 5 haftalık yaştaki broylerlerde yem etkinliği, canlı ağırlık, yemden yararlanma oranı üzerine aşı bölgesinin etkisinin olmadığı ancak 56 günlük yaşta intra embriyonik aşılananların daha yüksek canlı ağırlığa sahip oldukları tespit edilmiştir. Marek hastalığından koruma düzeyi intra embriyonik bölge uygulamasında doz ve güne paralel olarak artmış (% 68-84), ekstra embriyonik bölge uygulamasında ise ya hiç koruma sağlanmamış ya da düşük (% 0-27) oranda koruma sağlanmıştır (Islam et al., 2001).

Koksidiyozis'e karşı broyler embriyolarına *Eimeria tenella* sporozoit, sporositi ve oositi aşılama sonucunda hastalık lezyon skorunu düşürdüğü ve *E. Tenella*'ya karşı bağışıklık kazandırdığı bildirilmiştir (Weber and Evanst, 2003). Weber et al. (2004) da 5 tür *Eimeria* oositinin (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. Praecox*, *E. brunetti*) birlikte enjeksiyonunun hastalık lezyon skorunu düşürdüğünü ve canlı ağırlık kazancını artırdığını belirtmişlerdir.

Kuluçkanın 10 ve 18. günündeki broyler embriyolarına insan adenovirüs serotip 5 (H5HA) vektörlü avian influenza aşı uygulamasının, broylerlerde avian influenza H5HA'ya karşı kuvvetli bir bağışık yanıt sağladığı bildirilmiştir (Toro et al., 2007).

#### Besleme

Besin maddelerinin ve doğal biyoaktif bileşenlerin in ovo enjeksiyonu embriyo gelişimini teşvik etmek, çıkış gücünü artırmak, yumurtadan çıkıştan sonra broyler civcivlerinin gelişim dönemlerine olumlu katkılar sağlamak amacıyla (Jafari Ahangari et al., 2013) çoğunlukla kuluçkanın ilk haftasında yapılmaktadır. Damızlık broyler yumurtalarında fazla miktarda yağ ve su bulunmasına karşın, protein ve karbonhidrat içeriği az olabilmektedir (McGruder et al., 2011a).

İki ticari broyler hattında (Cobb ve Ross) 17,5 günlük yaştaki embriyolara ayrı ayrı üç farklı karbonhidrat (maltoz, sükröz ve dekstrin solüsyonları) ve  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metilbutirat enjeksiyonunun çıkış ağırlığını % 5-6 artırdığı, karaciğer glikojen depolarını % 2-5 geliştirdiğini ve göğüs kası oranını % 6-8 yükselttiği saptanmıştır (Uni et al., 2005). Tako et al., (2004) da 17,5 günlük yaştaki broyler embriyolarına maltoz, sükröz, dekstrin ile NaCl (Karbonhidratlar),  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metilbutirat ile NaCl ( $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metilbutirat) ve Karbonhidratlar +  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metilbutirat + NaCl enjeksiyonlarının bağırsak villus uzunluğunu artırdığını, bu artışa bağlı olarak disakkaridaz enzim aktivitesinin yükseldiğini ve vücut ağırlığının arttığını ifade etmişlerdir. Salmanzadeh (2012), broyler embriyolarına uygulanan farklı glikoz çözeltilerinin (0,5 ml'lik % 15, 20 ve 25 glikoz) çıkış gücünü olumsuz etkilemesine karşın çıkış ağırlığı ve 42 günlük yaşa kadar yem tüketimi, vücut ağırlığı ve yemden yararlanma oranı üzerinde olumlu etkisinin olduğunu bildirmiştir.

Kuluçkanın 7. gününde yumurta sarılarına amino asit uygulamasının kuluçkanın 19. gününde embriyo, yumurta sarısı, albümin, amniyotik ve allantoyik sıvıların bileşenlerinin amino asit miktarlarını artırdığı belirtilmiştir (Ohta et al., 2001). Salahi et al. (2011), bütirik asit in

ovo enjeksiyonunun çıkış gücü ve civciv çıkış ağırlığı üzerinde etkisini önemsiz, civciv çıkış uzunluğu, kuluçka süresi, yumurta sarısız vücut ağırlığı, duodenum ağırlığı, ince bağırsak ve jejunum uzunluğu üzerinde etkisini önemli bulmuşlardır. İntestinal anlamda buldukları olumlu etkinin civcivlerde yem tüketimini ve absorpsiyonu artırdığından dolayı enjeksiyonun 10 günlük yaştaki civcivlerin canlı ağırlıklarını etkilediğini belirtmişlerdir. Ayrıca, uygulamanın 7 günlük yaştaki civcivlerin göğüs ağırlığını etkilemediğini, karaciğer, kalp ve but ağırlığını artırdığını bildirmişlerdir.

Ipek et al. (2003) kuluçkanın geç döneminde embriyoda metabolik sıcaklığın artmasından kaynaklanan stresin giderilmesi için anti stres ajanı olarak askorbik asit kullandıkları çalışmalarında 13 günlük yaştaki damızlık broyler embriyolarına farklı dozlarda (1, 3, 5 ve 7 mg) enjeksiyon uygulamışlardır. Çalışma sonucunda 3 mg'lık in ovo enjeksiyonunun geç dönem (kuluçkanın 18-21. günleri) embriyo ölüm oranını azalttığını ve çıkış gücünü artırdığını saptamışlardır. Nowaczewski et al. (2012) ise 13, 15 ve 17 günlük yaştaki damızlık broyler embriyolarına 3 ve 6 mg'lık askorbik asit enjeksiyonunun çıkış gücü üzerinde etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Damızlık broylerlerin 14 günlük yaştaki embriyolarına ayrı ayrı A, E, C, B1 ve B6 vitamini enjeksiyonunun çıkış gücü, günlük ve 14 günlük yaştaki ağırlık üzerinde etkili olmadığını, 28 günlük yaşta ise sadece B1 vitamin enjeksiyonunun canlı ağırlığı artırdığı saptanmıştır (Bhanja et al. 2004). Broilerlerin 3 günlük yaştaki embriyolarına mAb-c134 hibridoma klonu yumurta sarısı enjeksiyonunun, vücut ağırlığı (% 4,2) ve kas kütlelerini (%5) artırdığı, ancak bunun aksine albümin enjeksiyonunun vücut ağırlığı ve kas kütleleri üzerinde etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Kim et al., 2006). Antimikrobiyal özellikte ve oksijen taşınımı ve tüketiminde etkili olan gümüş nanopartiküllerinin (AgNano) farklı dozlarının (0,3 mg'lık 50, 75 ve 100 mg /kg) yumurtacı ve broyler hattı yumurtalarına enjeksiyonunun her iki hatta da yumurtadan yeni çıkmış civcivlerde oransal karaciğer, bağırsak ve kalp ağırlıkları bakımından bir

fark oluşturmadığı, ancak broylerde kuluçka boyunca 50 ve 100 mg'lık uygulanan dozların metabolizma hızını (O<sub>2</sub> tüketimi, CO<sub>2</sub> ve ısı üretimi) yavaşlattığı bildirilmiştir. Ayrıca iki hatta da AgNano enjeksiyonlarının tüm dozlarının yumurta sarısı kesesi ağırlığını artırdığı ve 50 ve 100 mg'lık dozlardaki enjeksiyonların kalan yumurta sarısı kesesinin yağ içeriğini yükselttiği belirtilmiştir (Pineda et al., 2012a). Kuluçkanın 1. gününde broyler embriolarına gümüş nanopartikülleri (10 ve 20 mg'lık 0,5 ml çözelti) enjeksiyonu ve çıkış sonrasında aynı oranlarda içme suyunun birlikte uygulandığı çalışmada da AgNano'nun embriyo gelişimi, çıkış gücü ve civciv çıkış ağırlığı üzerinde etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte uygulamaların ileumdaki bakteri popülasyonunu etkilemediği ancak kör bağırsaktaki laktoz-negatif enterobakterleri ve laktik asit bakterilerini azalttığı, asetik asit konsantrasyonunu ise artırdığı belirlenmiştir (Pineda et al., 2012b). Sawosz et al. (2012) da 1 günlük yaştaki broyler embriolarına AgNano ile birlikte glutemin enjeksiyonunun embriyo gelişimini etkilemediğini ve yumurtadan yeni çıkmış civcivlerde kas gelişimini olumlu etkileyerek kas kütlesini artırdığını saptamışlardır.

Ayrı ayrı kafein, teofilin+kreatin+fosfokreatin ve teofilin+kreatin+L-arginin enjeksiyonlarının yumurta sarısı absorpsiyonunu ve kullanımını hızlandırmadığı ve embriyo vücut ağırlığı ve yumurta sarısı kesesi ağırlığı üzerinde etkili olmadığı ancak yüksek dozlarda kafein enjeksiyonunun embriyonik ölümleri artırdığı belirtilmiştir (McGruder et al. 2011a). McGruder et al. (2011b) de karbonhidrat-elektrolit besleme solüsyonu, tripotasyum, kreatin ve teofilinin ayrı şekilde broyler embriyo enjeksiyonlarının civciv çıkış ağırlığı, 3 günlük yaştaki civciv ağırlığı, yumurta sarısı kesesi ağırlığı, yumurta sarısı kesesi nem oranı ve ölüm oranı üzerinde etkili olmadığını belirtmişlerdir. Arı sütü ile in ovo beslenen civcivlerde gelişimin ilk aşamalarında büyüme performansının ve yem alımının olumlu etkilendiği bildirilmiştir (Jafari Ahangari et al. 2013).

Zhao et al. (2007) dehidroepiandrosteron enjeksiyonunun karaciğer örneklerindeki asetil CoA karboksilaz mRNA düzeyi, yağ asitleri sentezi, malik enzim, apolipoprotein B100 ve protein-1c analiz düzeylerine dayanarak embriyonik gelişim boyunca adipoz dokudaki yağ birikimini azalttığından hepatik lipogenetik gen ekspresyonunu azalttığını ve trigliserol taşınımını baskıladığını saptamışlardır.

#### *Hormonlar*

Broylerde in ovo teknik kullanılarak bir takım hormon, büyüme uyarıcıları ve prohormon uygulamalarının iskelet, kas, endokrin gelişimi, vücut ve organ ağırlıkları ile vücut dokuları üzerine etkilerini değerlendiren çalışmalar mevcuttur (Kocamis et al., 1998; Coles et al., 1999; Kocamis et al., 1999; Zhao et al., 2007). Erkek broylerlerin dişilere kıyasla, daha hızlı büyümesi, daha iyi yemden yararlanma oranına ve karkas ağırlığına sahip olması, daha az yağlı olması ve vücutlarına oranla daha az gübre üretmesi erkek broylerlerin önemini artırmaktadır (Dewil et al.,1997). Bu nedenle, özellikle broylerde önem taşıyabilecek kuluçka esnasında cinsiyet gelişimini değiştirmeye yönelik aromataz inhibitörleri ve testosteron kullanımına dayalı uygulamalar yürütülmüştür (Burke and Henry, 1999; Henry and Burke, 1999; Fazli et al., 2015). Cinsiyet kromozomları bakımından dişi (genetik dişi; ZW) broylerler, bahsi geçen uygulamalar sonucunda erkeklere ait birincil ve ikincil cinsiyet karakterleri geliştirerek erkek fenotipine sahip olmaktadır (Dewil et al., 1997).

Tavuk büyüme hormonu (cGH) in ovo enjeksiyonunun 42 günlük yaştaki broylerde toplam yem tüketimini artırdığı, iskelet ve kas gelişimi, kalp ve but ağırlıklarında ise etkisiz olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, erkeklere 1 günlük, dişilerde 15 ve 16 günlük embriyolara cGH enjeksiyonu canlı ağırlıkta artış sağlamıştır. Dişi broylerlerin 15 ve 16 günlük yaştaki embriolarına cGH enjeksiyonunun göğüs ağırlığını, dişilerin 1 ve 15 günlük yaştaki erkeklerin ise 11 günlük yaştaki embriyo enjeksiyonunun karaciğer ağırlığını artırdığı saptanmıştır (Kocamis et al.,1999). İnce

bağırsak lümenindeki serbest yağ asitlerini yükselten gastrointestinal bir hormon olan peptit YY enjeksiyonunun 7, 21 ve 42 günlük yaştaki broylerde vücut ağırlığı, yem alınımları ve yemden yararlanma oranını etkilemediği bildirilmiştir (Coles et al., 1999).

Broyler damızlık yumurtalarına kuluçkadan önce testesteron enjeksiyonunun 12, 15 ve 18 günlük hem dişi hem de erkek embriyolarda testesteron seviyesini artırdığı, 12, 16 ve 18 günlük erkek embriyolarda ağırlık ve göğüs kas gelişimi üzerinde etkili olmadığı ancak 12 günlük dişi embriyo ağırlığını azalttığı ve 16 günlük dişi embriyo göğüs kasında protein içeriğini ve konsantrasyonunu düşürdüğü saptanmıştır. Aynı çalışmada kuluçkadan önce ve kuluçkanın 8. günü flutamid enjeksiyonunun ise 20 günlük yaştaki dişi embriyolarda göğüs kası protein içeriği ve konsantrasyonunu yükselttiği, erkek embriyolar üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Henry and Burke 1999).

Tavukların 5 günlük embriyolarına fadrozol uygulanması sonucunda, androjenlerin östrojene çevriminin engellendiği ve özellikle sağ yumurtalıktaki P4450 aromataz mRNA ekspresyonunun azaldığından dolayı genetik dişilerden fenotipik erkeklerin oluştuğu bildirilmiştir. Genetik dişiler 10 aylık yaşta, normal horozlar gibi çiftleşme davranışları göstermiştir. Tavuklarla çiftleşen genetik dişilerde spermatogenezde herhangi bir anormallik bulunmazken, sperm miktarı düşük bulunmuş ve bu da yumurtalarda dölsüzlük problemlerine sebep olmuştur (Shimada, 1998). Burke ve Henry (1999)'nin broyler yumurtalarına kuluçkadan önce farklı dozlarda (50, 150, 450 µg) fadrozol uyguladıkları çalışmalarında genetik dişilerde genetik erkeklerle kıyaslandığında daha küçük testis ve ibik gelişimi saptanmıştır. Fadrozolün 50, 150, 450 µg uygulamaları testis görünümünü sırayla % 58, 97, 96 oranında etkilemiş ve 6 haftalık yaşa kadar genetik dişi gonadlarının yumurta foliküllerinde artış gözlenmiştir.

Beyaz Leghorn'ların 5 günlük embriyolarına ayrı ayrı aromataz inhibitörü, östradiol 17β ve aromataz inhibitörü ile

birlikte östradiol uygulanan çalışmada, aromataz inhibitörünün genetik dişilerde P450<sub>arom</sub> mRNA ekspresyonunu baskılayarak % 50 oranında cinsiyet değiştirici özellikte olduğu ancak erkeklerde etkili olmadığını tespit edilmiştir. Östradiol 17β uygulamasının genetik erkekleri fenotipik dişilere çevirmede başarısız olduğu ancak aromataz inhibitörü ile birlikte uygulandığında P450<sub>arom</sub> mRNA düzeyinin baskılandığını ve bunun sonucunda da genetik dişi fenotipik erkek bireylerin arttığı bildirilmiştir (Abinawanto et al. 1996). Nakabayashi et al. (1998) ise 5-14 günlük Beyaz Leghorn embriyolarına östradiol 17β uyguladıkları çalışmalarında, östrojen reseptör geninin yalnızca sol gonad epitelyumundaki ekspresyonundan dolayı sol gonadın geliştiğini belirtmişler ve in ovo östradiol 17β uygulamasının genetik erkek embriyolarında sol ovotestis gelişimini tetiklediğini bildirmişlerdir. Dewil et al. (1997) 6 günlük broyler embriyolarına vorozol uyguladıkları çalışmalarında 4 haftalık yaştaki broylerde dişiler üzerinde daha etkili olmak üzere abdominal yağ oranının düştüğünü bildirmişlerdir. Bununla birlikte triiodotironin, östradiol, testesteron ve büyüme hormonu konsantrasyonlarını artırdığını tiroksin konsantrasyonunu düşürdüğünü, cinsiyet oranını ise değiştirmede ifade etmişlerdir.

### Sonuç

İn ovo aşı enjeksiyonu civcivlerde erken dönem immün yanıt oluşturmalarının yanında embriyo gelişimini desteklemesi ve çıkış sonrasında performans özelliklerini iyileştirmesinden dolayı geniş kullanım alanına sahiptir. İn ovo teknik ile amino asit, karbonhidrat, vitamin, hormon ve uyarıcı solüsyonlar gibi besin maddeleri ve metabolik bileşenlerin etkileri hala araştırılmakta olup, halihazırda istenilen doğrultuda alınan olumlu sonuçlar uygulamaların yakın gelecekte artacağına işaret etmektedir. Teknik, pratikte kullanım kolaylığı ve kuluçkahanelerde çıkıştan sonra civciv müdahalelerinden kaynaklanan masraf, zaman ve işgücünü azaltması



nedeniyle ileriki dönemlerde rutin kuluçkahane uygulamaları arasında yer alabilecektir.

### Kaynaklar

- Abinawanto, A., Shimada, K., Yoshida, K. and Saito, N., 1996. Effects of Aromatase Inhibitor on Sex and Levels of P450(17alpha) and P450arom Messenger Ribonucleic Acid of Gonads in Chicken Embryos. *General Comp. Endocr.* 102:241–246.
- Bhanja, S. K., Mandal, A. B., Majumdar, S., Mehra, M. and Goel, A., 2004. Effect of In Ovo Injection of Vitamins on The Chick Weight and Post-Hatch Growth Performance in Broiler Chickens. *Indian J. Poultry Sci.* 47:3;306-310.
- Burke, W. H. and Henry, M. H., 1999. Gonadal Development and Growth of Chickens and Turkeys Hatched from Eggs Injected with an Aromatase Inhibitor. *Poultry Sci.* 78: 1019–1033.
- Coles, B. A., Croombrake, W. J., Daniel, L. R., Christensen, V. L., Phelps, C. P., Gore, A. and Taylor, I. L. 1999. In Ovo Peptide YY Administration Improves Growth and Feed Conversion Ratios in Week-Old Broiler Chicks. *Poultry Sci.* 78:1320–1322.
- Dewil, E., Buyse, J., Veldhuis, J.D., Mast, J., De Coster, R. and Decuyper, E., 1997. In Ovo Treatment with an Aromatase Inhibitor Masculinizes Postnatal Hormone Levels, Abdominal Fat Pad Content, and Gh Pulsatility in Broiler Chickens. *Domest. Anim. Endocrin.* 152:115-127.
- Ding, X., Lillehoj, H. S., Quiroz, M. A., Bevenssee, E. and Lillehoj E. P., 2004. Protective Immunity against *Eimeria acervulina* following In Ovo Immunization with a Recombinant Subunit Vaccine and Cytokine Genes. *Infect. Immun.* 72:12, 6939–6944.
- Fazli N., Hassanabadi A., Mottaghtalab M. and Hajati H., 2015. Manipulation of Broiler Chickens Sex Differentiation by In Ovo Injection of Aromatase Inhibitors and Garlic and Tomato Extracts. *Poultry Sci.* 94:11;2778-83.
- Guo, Z. Y., Giambrone, J. J., Dormitorio T. V. and Hongzhuan, W., 2003. Safety and Efficacy of In ovo Administration Of An Experimental Reovirus Vaccine In Commercial Broiler Chickens. *J. Anim. Vet. Adv.* 2:7;400-403.
- Hassanzadeh, M., Fard, B. M. H. and Tooluo A., 2006. Evaluation of the Immunogenicity of Immune Complex Infectious Bursal Vaccine Delivered In Ovo Embryonated Eggs or Subcutaneously to Day-Old Chickens. *Int. J. Poultry Sci.* 5:1; 70-74.
- Henry, M. H. and Burke W. H., 1999. The Effects of In Ovo Administration of Testosterone or an Antiandrogen on Growth of Chick Embryos and Embryonic Muscle Characteristics. *Poultry Sci.* 78:1006–1013.
- Ipek, A., Sahan U. and Yılmaz, B., 2003. The Effect of In Ovo Ascorbic Acid and Glucose Injection in Broiler Breeder Eggs on Hatchability and Chick Weight. *Arch. Geflügelk.* 68:3;132 – 135.
- Islam, A. M. F., Walkden-Brown, S. W., Wong, C. W., Groves, P. J., Burgess, S. K., Arzey, K. E. and Young, P. L., 2001. Influence of Vaccine Deposition Site on Post-Vaccinal Viraemia and Vaccine Efficacy in Broiler Chickens Following In Ovo Vaccination Against Marek's Disease. *Avian Pathology* 30, 525– 533.
- Islam, A. M. F., Groves, P. J., Walkden-Brown, S. W., Arzey, K. E. and Burgess, S. K., 2003. Comparison of Protective Efficacy of Manual and Automated In Ovo Vaccination Against Marek's Disease in Broiler Chickens. *Proc. Aust. Poult. Sci. Sym. Book*, 197-201p.
- Jafari Ahangari, Y., Hashemi, S.R., Akhlaghi, A., Atashi, H., Esmaili, Z., Ghorbani, M., Mastani, R., Azadegan A. and Davoodi, H., 2013. Effect of In Ovo Injection of Royal Jelly on Post-

- Hatch Growth Performance and Immune Response in Broiler Chickens Challenged with Newcastle Disease Virus. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.*, 3:1;201-206.
- Johnston, P. A., Liu, H., O'Connell, T., Phelps, P. Bland, M., Tyczkowski, J., Kemper, A., Harding, T., Avakian, A., Haddad, E., Whitfill, C., Gildersleeve, R. and Ricks C. A., 1997. Applications in In Ovo Technology. *Poultry Sci.* 76:165–178.
- Kadam, M. M., Barekatin, M. R., Bhanja, S. K. and Iji. P. A., 2013. Prospects of In Ovo Feeding and Nutrient Supplementation for Poultry: The Science and Commercial Applications-A Review. *J. Sci. Food Agric.* 93:3654-3661.
- Kim, Y. S., Bobbili, N. K., Paek, K. S. and Jin H. J., 2006. Production of a Monoclonal Anti-Myostatin Antibody and the Effects of In Ovo Administration of the Antibody on Posthatch Broiler Growth and Muscle Mass. *Poultry Sci.* 85:1062—1071.
- Kocamis, H., Kirkpatrick-Keller, D. C., Klandorf, H. and Killefer, J., 1998. In Ovo Administration of Recombinant Human Insulin-Like Growth Factor-I Alters Postnatal Growth and Development of the Broiler Chicken. *Poultry Sci.* 77:1913–1919.
- Kocamis, H., Yeni, Y. N., Kirkpatrick-Keller, D. C. and Killefer, J., 1999. Postnatal Growth of Broilers in Response to In Ovo Administration of Chicken Growth Hormone. *Poultry Sci.* 78:1219–122.
- Kornasio, R., Halevy, O., Kedar, O. and Uni Z., 2011. Effect of In Ovo Feeding and its Interaction with Timing of First Feed on Glycogen Reserves, Muscle Growth, and Body Weight. 2011 *Poultry Sci.* 90:1467–1477.
- MacKinnon, K. M., He, H., Swaggerty, C. L., McReynolds, J. L., Genovese, K. J., Duke, S. E., Nerren, J. R. and Kogut, M. H., 2009. In Ovo Treatment with CpG Oligodeoxynucleotides Decreases Colonization of Salmonella Enteritidis in Broiler Chickens. *Veterinary Immunol. Immunop.* 127:371–375.
- Mashchenko, A., Riblet, S. M., Zavala, G. and Garcí'a, M., 2013. In Ovo Vaccination of Commercial Broilers with a Glycoprotein J Gene-Deleted Strain of Infectious Laryngotracheitis Virus. *Avian Dis.* 57:523–531.
- Matsushita, S., Yamashita, J., Iwasawa, T., Tomita, T. and Ikeda, M., 2006. Effects of In Ovo Exposure to Imazalil and Atrazine on Sexual Differentiation in Chick Gonads. *Poultry Sci.* 85:1641–1647.
- McGruder, B.M., Zhai, W., Keralapurath, M.M., Gerard, P.D. and Peebles, E.D., 2011a. Effects of In Ovo Injection of Stimulant Solutions on Growth and Yolk Utilization in Broiler Embryos. *Int. J. Poultry Sci.* 10:5;338-343.
- McGruder, B.M., Zhai, W., Keralapurath, M.M., Gerard, P.D. and Peebles, E.D., 2011b. Effects of *in ovo* Injection of Theophylline and Electrolyte Solutions on Hatchability and Growth of Broilers from Day 0 to Day 10 Post-Hatch. *Int. J. Poultry Sci.* 10:12;927-932.
- Moosanezhad, M., Salahi, A. and Mashayekhi S., 2011. The Best Time for In Ovo Solution Injection in Old Broiler Breeder Flock Eggs. XIV European Symposium on the Quality of Eggs And Products. XX European Symposium on the Quality of Poultry Meat. 4-8 September, Leipzig, Germany.
- Moreira de Souza F., 2008. Basic Aspects of *In-Ovo* Injection in Commercial Hatcheries, Ceva Animal Health Pasific, No:20, Selangor, Malaysia.
- Nakabayashi, O., Kikuchi, H., Kikuchi, T. and Mizuno, S., 1998. Differential Expression of Genes for Aromatase and Estrogen Receptor During the Gonadal Development in Chicken Embryos. *J. Mol. Endocrinol.* 20:193–202.
- Nowaczewski, S., Kontecka, H. and Krystianiak, S., 2012. Effect of In Ovo Injection of Vitamin C During Incubation on Hatchability of Chickens and Ducks.

- Foliobiologica(Kraków), 60:1-2, 93-97.
- Ohta, Y. and Kidd, M. T., 2001. Optimum Site for In Ovo Amino Acid Injection in Broiler Breeder Eggs. *Poultry Sci.* 80:1425–1429.
- Ohta, Y., Kidd, M. T. and Ishibashi, T., 2001. Embryo Growth and Amino Acid Concentration Profiles of Broiler Breeder Eggs, Embryos, and Chicks After In Ovo Administration of Amino Acids. *Poultry Sci.* 80:1430–1436.
- Palmer, B. D. and Guilette JR, L. J., 1991. Oviductal Proteins and Their Influence on Embryonic Development in Birds and Reptiles. Egg incubation Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles. (Ed: D. Charles Deeming, Mark W. J. Ferguson) Cambridge University Press., New York, pp. 29-46.
- Pineda, L., Chwalibog, A., Sawosz, E., Hotowy, A., Elnif, J. and Sawosz, F., 2012a. Investigating the Effect of In Ovo Injection of Silver Nanoparticles on Fat Uptake and Development in Broiler and Layer Hatchlings. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Nanotechnology*, 212486, 1-7.
- Pineda, L., Sawosz, E., Lauridsen, C., Engberg, R. M., Elnif, J., Hotowy, A., Sawosz, F. and Chwalibog, A., 2012b. Influence of In Ovo Injection and Subsequent Provision of Silver Nanoparticles on Growth Performance, Microbial Profile, and Immune Status of Broiler Chickens. *Open Access Animal Physiology*, 4:1–8.
- Richards, M. P., 1997. Trace Mineral Metabolism in the Avian Embryo. *Poultry Sci.* 76:152-164.
- Ricks, C. A., Mendu, N. and Phelps, P. V., 2003. The Embryonated Egg: A Practical Target for Genetic Based Advances to Improve Poultry Production. *Poultry Sci.* 82:931–938.12817448.
- Salahi, A., Mousavi, S. N., Foroudi, F., Khabisi, M. M. and Norozi, M., 2011. Effects of In Ovo Injection of Butric Acid in Broiler Breeder Eggs on Hatching Parameters, Chick Quality and Performance. *Global Veterinaria* 7:5;468-477.
- Salmanzadeh, M., 2012. The Effects of In-Ovo Injection of Glucose on Hatchability, Hatching Weight and Subsequent Performance of Newly-Hatched Chicks. *Brazilian J. Poultry Sci.* 14: 2;71-158.
- Sarma, G., Greer, W., Gildersleeve, R. P., Murray D. L. and Mile A. M., 1995. Field Safety and Efficacy of in ovo Administration of HVT + SB-1 Bivalent Marek's Disease Vaccine in Commercial Broilers. *Avian Diseases* 39:2;211-217.
- Sawosz, F., Pineda, L., Hotowy, A., Hyttel, P., Sawosz, E., Szmidi, M., Niemiec, T. and Chwalibog A., 2012. Nano-nutrition of Chicken Embryos. The Effect of Silver Nanoparticles and Glutamine on Molecular Responses, and the Morphology of Pectoral Muscle. *Baltic Journal of Comparative & Clinical Systems Biology* 2:29-45.
- Sharma, J. M. and Burmester, B. R., 1982. Resistance of Marek's Disease at Hatching in Chickens Vaccinated as Embryos with the TurkeyHerpesvirus. *Avian Diseases*, 26:1; 134-149.
- Sharma J. M. and Burmester B. R., 1984. Disease Control in Avian Species by Embryonal Vaccination. U.S. Patent No. 4, 458,630.
- Sharma J. M., 2014. In Ovo Vaccinations in Chickens. [http://amevea-ecuador.org/web\\_antigua/memorias2010/memorias/MEMORIAS%20\(7\).pdf](http://amevea-ecuador.org/web_antigua/memorias2010/memorias/MEMORIAS%20(7).pdf), Erişim: 12.01.2014.
- Shimada, K., 1998. Gene Expression of Steroidogenic Enzymes in Chicken Embryonic Gonads. *J. Exper. Zoology* 281:450–456.
- Tako, E., Ferket, P. R. and Uni, Z., 2004. Effects of In Ovo Feeding of Carbohydrates and  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylbutyrate on the Development of Chicken Intestine. *Poultry Sci.* 83: 2023–2028.
- Toro, H., Tang, D. C., Suarez, D. L., Sylte, M. J., Pfeiffer, J. and Van Kampen K.

- R., 2007. Protective Avian Influenza *In Ovo* Vaccination With Non-Replicating Human Adenovirus Vector. *Vaccine*, 25:2886–2891.
- Uni, Z., Ferket, P. R., Tako, E. and Kedar, O., 2005. In Ovo Feeding Improves Energy Status of Late-Term Chicken Embryos. *Poultry Sci.* 84:764–770.
- Van den Wijngaard J-K., 2002. In Ovo Vaccine Applications In Chickens Surpass the Conventional Approach, Lohmann Information, Netherlands, 26, 1p.
- Vieira, S. L., 2007. Chicken Embryo Utilization of Egg Micronutrients. *Braz. J. Poultry Sci.*, 9:1-8.
- Wakenell, P.S., Brian, T., Schaeffer, J., Avakian, A., Williams, C. and Whitfill, C., 2002. Effect of In-Ovo Vaccine Delivery Route on Herpes Virus of Turkey/SB-1 Efficacy and Viraemia. *Avian Disease* 46:2;274-280.
- Weber, F. H. and Evanst, N. A., 2003. Immunization of Broiler Chicks by In Ovo Injection of *Eimeria tenella* Sporozoites, Sporocysts, or Oocysts. *Poultry Sci.* 82:1701–1707.
- Weber, F. H., Genteman, K. C., LeMay, M. A., Lewis, D. O. and Evanst, N. A., 2004. Immunization of Broiler Chicks by In Ovo Injection of Infective Stages of *Eimeria*. *Poultry Sci.* 83:392–399.
- Williams, C. J., and Brake, J., 2000. Evaluation of Application Methods for Control of *Aspergillus fumigatus* Proliferation on the Air Cell Membrane of In Ovo Injected Broiler Eggs. *Poultry Sci.* 79:1531–1535.
- Williams, C. J., 2002. In ovo vaccination and chick quality. *International Hatchery Practice* 19:2;7-13. <http://www.positiveaction.info/pdfs/articles/hp19.2p7.pdf>, Erişim: 21.12.2015.
- Williams, C. J., 2008. *International Poultry Production* 15:8;7-9. [http://pfizerglobalpoultry.com/articles/Pfizer\\_15\\_8.pdf](http://pfizerglobalpoultry.com/articles/Pfizer_15_8.pdf), Erişim: 13.11.2015.
- Williams C. J. and Zedek A. S., 2010. Comparative Field Evaluations of In Ovo Applied Technology. *Poultry Sci.* 89:189–193.
- Williams C. J. and Hopkins B. A., 2011. Field Evaluation of the Accuracy of Vaccine Deposition by Two Different Commercially Available In Ovo Injection Systems *Poultry Sci.* 90:223-226.
- Wu, Y. J., Valdez-Corcoran, M., Wright, J. T. and Cartwright A. L., 2000. Abdominal Fat Pad Mass Reduction by In Ovo Administration of Anti-Adipocyte Monoclonal Antibodies in Chickens. *Poultry Sci.* 79:1640–1644.
- Zhao, S., Ma, H., Zou, S. and Chen, W., 2007. Effects of In Ovo Administration of DHEA on Lipid Metabolism and Hepatic Lipogenetic Genes Expression in Broiler Chickens During Embryonic Development. *Lipids* 42:749–757.