

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

204 439 B

- (21) A bejelentés száma: 3582/89
(22) A bejelentés napja: 1989. 07. 14.
(30) Elsőbbségi adatok:
88/01819 1988. 07. 18. NL
(83) Letétbe helyezés: DNW BL-9998 - CNCM I-781

(51) Int. Cl.⁵

A 61 K 39/17

- (40) A közzététel napja: 1990. 08. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992. 01. 28. SZKV 92/01

(72) Feltaláló:

van Wiltenburg, Nico, Weesp (NL)

(73) Szabadalmas:

Duphar International Research B.V.,
Weesp (NL)

(54) **Eljárás newcastle-betegség, valamint newcastle-betegség és fertőző
bronchitis elleni élő vírusvakcinák, továbbá newcastle-betegség vírus
előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás Newcastle-betegség, valamint Newcastle betegség és fertőző bronchitis elleni élő vírusvakcina, és az új vírus előállítására. A vakcina a párizsi Pasteur Intézetben I-781 számon letétbe

helyezett NDW törzset legalább $10_{\log} 5,5$ IEID₅₀/dózis mennyiségben tartalmazza.

Mind a mono-, mind a bivalens vakcina alkalmazása mentes az ismert mellékhatásoktól.

A találmány tárgya eljárás baromfinál alkalmazandó Newcastle-betegség elleni mono- és bivalens élő vírus-vakcinák és egy új NDV-törzs előállítására.

A Newcastle-betegség (ND) a légzőrendszer, a tojórendszer, a belek és a központi idegrendszer rendelkezésére, amely baromfinál gyakran előfordul.

A Newcastle-betegség (N) a baromfityesztésben nagy gazdasági veszteségeket okoz. Az állatok elhullásán kívül a betegség légzési és idegi tüneteket, és tojóállatoknál a tojórendszer károsodása következtében tojástermelési csökkenést okoz.

A betegség élő vagy elölt oltóanyag vakcinálása útján szorítható vissza az állatoknál. Hitchner-B1-törzs-vagy La Sota törzs-alapú élő vakcinákat például már korábban is alkalmaztak. Bár az ismert NDV törzseken alapuló vakcinák használata viszonylag biztonságos és hatásos, mégis megfigyelték, hogy fiatal csibéknél erős immunreakció lép fel, ha a vakcinálást jó védőhatást biztosító törzsszel hajtjuk végre /Vet.Rex. 95 (12)263 (1974)/. Másrészt a védelem nem teljes, ha a vakcináláshoz kiscsik immunreakciót kiváltó törzset (pl. legyengített vagy mutáns törzset) használnak. (851 880 sz. belga szabadalmi leírás). Ebben a tekintetben fontos szerepet játszik az anyai immunitás, minthogy anyai immunitással rendelkező csibék hatásos vakcinálása csak jelentős immunreakciót kiváltó törzsekkel érhető el.

Az ismert törzseken alapuló NDV-vakcinák másik hátránya, hogy ND és fertőző hörghurut (IB, fertőző bronchitis) elleni kombinált vakcinák nem alkalmazhatók az elfogadhatatlanul erős immunreakciót előfordulása miatt (C.A. 101, 149 448 p.).

Meglepő módon azt találtuk, hogy a fenti hátrányokkal nem rendelkező ND elleni vakcinák állíthatók elő, ha NDV-törzsként NDW BL-9998 jelű törzset alkalmazunk, amelyet a párizsi Pasteur Intézetben (CNCM) I-781 számon helyeztünk letétbe 1988.06.12-én.

Azt találtuk, hogy az NDW-törzsen alapuló élő vakcinák teljesen biztonságosak és igen hatásosak erős anyai immunitással rendelkező csirkék megvédéséhez is. Ezért a találmány szerinti vakcina már 1 napos korban alkalmazható.

Azt találtuk továbbá, hogy az egynél több víruskomponens alkalmazásakor fellépő általános probléma, azaz a kombinált vírusok kölcsönhatásoknak tulajdonítható csökkent immunizáló hatása /ún. interferencia, lásd Am. J. Vet. Res. 36, 4, 524 és 525 (1965); és Avian Diseases 12, 577 (1968)/ nem következik be, ha az NDW-törzset más élő vírustörzsekkel kombináljuk.

A találmány szerinti vakcinákban alkalmazott vírus törzseket úgy állíthatjuk elő, hogy az NDW vírust vagy a fertőző bronchitis vírust (IBV) átvisszük egy megfelelő táptalajra (pl. megtermékenyített, speciális, patogénmentes - SPF - tojásokat vagy megfelelő sejtenyészeteket, pl. csirkevese-sejtenyészetet oltnak be a vírusokkal), az inokulált táptalajt inkubáljuk a vírusok szaporodásának biztosítására, és a tenyésztett vírokat elkülönítjük a fermentléből. Közelebbről: az NDW törzs vagy az IBV törzs inokuláló vírusát steril körül-

mények között bevisszük 10-11 napos, keltetőben tartott SPF I. típusú jércetojások allantoisz-üregébe. 28-48 órán át 37 °C-on végzett inokulálás után elkülönítjük az akkor még élő, illetve 24 órával az oltóvírussal történt inokulálást követően, az inkubálási periódus végéig elpusztult és adott esetben stabilizálószerrel és/vagy antibiotikumok (pl. Na-penicillin G, streptomycin vagy natamicin) hozzáadása után liofilizáljuk.

Egyedi vakcinák, amelyek az NDW vírust legalább $10_{\log} 5,5$ EID₅₀/dózis mennyiségben tartalmazzák, úgy állíthatók elő, hogy a liofilizált vírust egy folyékony vízóanyagban szuszpendáljuk, amilyen a víz, sóoldat vagy foszfát-pufferes sóoldat.

Hasonló módon állíthatunk elő kombinált vakcinákat, amelyek az NDW vírust legalább $10_{\log} 5,5$ EID₅₀/dózis és egy vagy több IBV törzset legalább $10_{\log} 4,0$ EID₅₀/dózis mennyiségben tartalmazzák.

Az új élő vírus-vakcinák az ún. szemcsepp, orrcsepp-módszerrel, az ivóvízzel vagy spray formájában adagolhatók be.

Az ilyen vakcina a csibéknek 1 napos korukban vagy későbbi időpontban adhatók be akkor is, ha nagyfokú anyai immunitással rendelkeznek, kívánt esetben egy vagy több IB-vírussal kombinálva. Az alkalmazás például spray vagy szemcsepp útján történhet.

A találmányt az alábbiakban részletesebben ismertetjük, hivatkozva az elvégzett kísérletekre.

1. kísérlet

NDW-törzsszel történő vakcinálás hatékonysága

1 napos pecsenyecsirkék egy csoportjából 24 madáron határozzuk meg az anyai immunitást a HI-módszer segítségével. Az átlagos titer $2_{\log} 10,7$ volt. (HI-módszert lásd Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. 10³. Ed. 1920. 1989. Pennsylvania, USA)

43 csirkét egyenként $\log 5,4$ EID₅₀ mennyiségű NDW vakcinával kezelünk spray-vakcinálás útján. 21 és 22 madarat vakcinálásuk után 3, illetve 6 hét múlva egyenként $10_{\log} 6$ ELD₅₀ mennyiségű virulens Herts 33 vírussal fertőzünk meg szemcsepp formájában. A fertőzés idején kontrollként a broilereknek 1 héttel idősebb két SPF ("specific pathogen free") csibét is megfertőzünk. (Az ELD₅₀ az a dózis, amely mellett az inokulált tojásokban az embriók 50%-a elpusztul).

A vakcinálás után 3 hét múlva mind a 21 madár életben maradt, míg a vakcinálást követő 6 hét múlva a 22 madár közül 20 volt életben. Az SPF kontrollok elpusztultak.

E kísérletből kitűnik, hogy a nagyfokú anyai immunitással rendelkező csirkék NDW törzsszel történő vakcinálása kitűnő védettséget nyújt virulens ND vírussal való fertőzés ellen a hízalási időszak folyamán.

2. kísérlet

Kombinált ND/IB vakcina komponensét képező NDW-törzsszel történő vakcinálás hatásossága

$2_{\log} 10,7$ HI-egység átlagos anyai ellenanyag-titerrel rendelkező 48 broilert 1 napos korukban spray útján vakcinálunk, dózisonként $10_{\log} 5,4$ EID₅₀ NDW-

ből és $10 \log 4,0 \text{ EID}_{50} \text{ H } 120/84$ -ból álló kombinált vakcinával. (Az EID_{50} az a dózis, amely mellett a beoltott tojások 50%-a a fertőzés jeleit mutatja). A H 120/84-3 fertőző bronchitisz törzset mint vakcina törzset a Duphar B.V. (Weesp, Hollandia) forgalmazza.

23 és 25 csibét vakcinálásuk után 3, illetve 6 hét múlva szemcsepp formájában megfertőzünk állatonként $10 \log 6,5 \text{ ELD}_{50}$ mennyiségű virulens Herts 33 vírussal. A fertőzés idején kontrollként két SPF csirkét szintén megfertőzünk a virulens vírussal.

Fertőzés után a vakcinálást követő 3 hét múlva 23 csirkéből 21 maradt életben, míg a vakcinálást követő 6 hét múlva mind a 25 madár életben volt. Az SPF kontrollok elpusztultak.

E kísérletből kitűnik, hogy ha az NDW-törzset kombinált ND/IB vakcina komponensként alkalmazzuk, kitűnő védőhatás érhető el virulens ND vírussal való fertőzéssel szemben a hízalási időszak folyamán, akkor is, ha a csibék anyai antitest-titere a vakcinálás időpontjában magas.

3. kísérlet

Kombinált ND/IB vakcina komponensét képező NDW-törzsszel történő vakcinálás hatásossága

75 napos broilerek egy csoportjából 25 madarat kiemelünk az anyai antitest-titer HI-módszerrel való meghatározása céljából. Az átlagos titer $2 \log 8,7$ volt. A fennmaradó csirkéket két 25-ös csoportra osztjuk. Az első csoportot kombinált NDW/H120/84-3 vakcinával kezeljük a 2. példában leírtak szerint. A második csoport nem vakcinált kontroll csoportként szolgál. E csoportból 1 madár a fertőzés megtörténte előtt elpusztult. A vakcinálás után 32 nap múlva mint két csoportot megfertőzzük állatonként $10 \log 6,5 \text{ ELD}_{50}$ Herts 33 vírussal/beszerezhető a Weybridge Poultry Station-től (Weybridge, Nagy-Britannia). Egyidejűleg két, körülbelül 6 hetes SPF csirkét is megfertőzünk.

A 25 vakcinált madár közül 1 pusztult el a fertőzés után. A 24 nem vakcinált kontroll közül 21 pusztult el. Az SPF kontrollok elpusztultak.

E kísérletből kitűnik, hogy a kombinált ND/IB vakcina komponensét képező NDW törzs kiváló védetségget biztosít virulens ND vírussal való fertőzés ellen, ami megerősíti a 2. kísérlet következtetéseit.

4. kísérlet

Kisméretű szabad területen végzett próba

1 napos broilerként ketrecekbe osztunk szét és Pulvac IB Primer (IB-törzs H120/84-3) vírussal vagy kombinált Pulvac IB Primer/NDW vakcinával kezeljük őket. Néhány ketrec csibéit nem vakcináljuk (kontroll csoport). Minden ketrecre 400 csibét helyezünk.

A vakcináció után 10 nappal meghatározott légsző-elváltozás pontozási értékei:

- 0,0 a nem vakcinált maradagnál;
- 0,1 – 0,6 – 0,7 – 1,1 az IB Primer-rel vakcinált madaraknál (10–10 madárból álló 4 csoport);
- 0,0 – 0,0 – 0,2 – 0,8 az IB Primer/NDW kombináció-

val vakcinált madaraknál (10–10 madárból álló 4 csoport).

A módszert R.W. Winterfield et al. cikke ismerteti /Avian Diseases, 16, 260-269, (1972)/.

5 A vakcinálás után 0, 3 és 6 hét múlva meghatározott átlagos ND HI-titer

– 8,2 (anyai immunitás), 4,0, illetve 4,0 az IB Primer-rel vakcinált madaraknál;

10 – 8,2, 5,3, illetve 6,4 az IB Primer/NDW kombinációval vakcinált madaraknál.

A vakcinálást követő 6 hét múlva meghatározott átlag-tömegekben nem volt jelentős eltérés a két csoport között.

A vakcinációt követő 4, 5 és 6 hét múlva virulens ND vírussal, Herts 33/56 törzsszel történő fertőzés után 90%, 100%, illetve 92% védetség tapasztalható a kombinált IB Primer/NDW vakcinával kezelt csoportnál. Az IB Primer-rel vakcinált csoport, valamint a nem vakcinált csoport teljesen védetlen volt az ND fertőzéssel szemben (0% védetség) mindhárom esetben.

Vakcinálás után 4 hét múlva virulens IB vírussal, valamint Voet törzsszel és egy virulens D274 törzsszel fertőzve (mindkét törzs beszerezhető a Dutch Poultry Helath Institute-ből (Doorn, Hollandia))

25 – 100% védetség észlelhető Voet ellen és 80–100% védetség D274 ellen IB Primer-rel vakcinált madaraknál;

30 – 100% védetség mutatható ki Voet ellen és 60–100% védetség D274 ellen, kombinált IB Primer/NDW vakcinával kezelt madaraknál;

– nincs védetség (0% védetség mindkét törzs ellen) a nem vakcinált madaraknál.

35 E kísérletből kitűnik, hogy az NDW törzs mint a kombinált IB/ND vakcina komponense

– teljesen ártalmatlan,

– kitűnő védetséget ad virulens ND vírus fertőzéssel szemben,

40 – nem interferál a vakcina többi komponensével, úgy-hogy azok is teljes mértékben hatásosak maradnak.

A kombinált IB/ND vírus-vakcina fő előnye az ismert monovalens IB vakcinákhoz képest az, hogy

– egyszeri vakcinálással két betegség ellen érhetünk el védelmet,

45 – a vakcina alkalmazása messzemenően biztonságos.

SZABADALMIIGÉNYPONTOK

50 1. Eljárás élő vírus vakcina előállítására Newcastle-betegség ellen, *azzal jellemezve*, hogy az NDW törzshöz tartozó liofilizált élő Newcastle-betegség vírust, amelyet a párizsi Pasteur Intézetben (CNCM) I-781 számon helyeztünk letétbe, folyékony vívőanyagban szuszpendáljuk.

55 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy folyékony vívőanyagként vizet, sóoldatot vagy foszfát-pufferes sóoldatot alkalmazunk.

60 3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy dózisonként legalább $10 \log 5,5 \text{ EID}_{50}$ mennyiségű, az NDW törzshöz tartozó vírust alkalma-

zunk a vakcina előállítására.

4. Eljárás a Newcastle-betegség és a fertőző bronchitis ellen hatásos kombinált vakcina előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, az NDW törzshöz tartozó élő Newcastle-betegség vírust, amelyet a párizsi Pasteur Intézetben (CNCM) az I-781 számon helyeztünk letétbe, és egy vagy több fertőző bronchitis vírus törzset folyékony vivőanyagban szuszpendálunk.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy folyékony vivőanyagként vizet, sóoldatot vagy foszfát-pufferes sóoldatot alkalmazunk.

6. A 4. vagy 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a vakcina előállításához dózisonként legalább 10^5 EID₅₀ NDW törzshöz tartozó vírust és

legalább 10^4 log 4,0 EID₅₀ fertőző bronchitis vírust alkalmazunk.

7. Eljárás az 1-6. igénypontok szerinti eljárásban alkalmazható liofilizált élő Newcastle-betegség vírus előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az NDW törzshöz tartozó vírussal, amelyet a párizsi Pasteur Intézetben (CNCM) I-781 számon helyeztünk letétbe, beoltunk egy megfelelő táptalajt, az inokulált táptalajt a vírus szaporítására inkubáljuk és a vírust elkülönítjük az azt tartalmazó fermentléből, majd a vírust tartalmazó anyagot liofilizáljuk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a liofilizálás előtt stabilizálószeret és/vagy antibiotikumokat adunk a vírust tartalmazó anyaghoz.

Kiadja: Országos Találmányi Hivatal, Budapest
Felelős kiadó: dr. Szvoboda Gabriella

KÓDEX