PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

277 353

ČESKÁ
A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)

(21) Číslo přihlášky: **6316-90**

(22) Přihlášeno: 17. 12. 90

(40) Zveřejněno: 12. 08. 92

(47) Uděleno: 25. 11. 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 13. 01. 93

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.[5]:
A 61 K 39/012

FEDERÁLNÍ
ÚŘAD PRO
VYNÁLEZY

(73) Majitel patentu:
Výzkumný ústav pro biofaktory a vet.léčiva, s.p., Jílové u Prahy, CS;

(72) Původce vynálezu:
Bedrník Petr RNDr. CSc., Praha, CS;
Kučera Jan RNDr. CSc., Praha, CS;
Firmanová Anna ing., Pohoří-Skalsko, CS;

(54) Název vynálezu:
Vakcina proti kokcidióze drůbeže

(57) Anotace:
Řešení se týká kombinované vakciny proti kokcidióze drůbeže, která se skládá z linií druhů rodu Eimeria, jejichž patogenita byla oslabena zkrácením vývojového cyklu, zejména Eimeria maxima, Eimeria acervulina a Eimeria brunetti. U linií Eimeria tenella, Eimeria mitis, Eimeria praecox a Eimeria necatrix byla patogenita oslabena adaptací na růst v kuřecích embryích a dlouhodobým pasážováním v kuřecích embryích. V jedné vakcinační dávce je obsažen příslušný stejný počet oocyst jednotlivých linií, přičemž účinnosti bylo dosaženo již při použití bivalentní vakciny o složení Eimeria tenella a Eimeria acervulina.

CS 277 353 B6

Oblast techniky

Vynález se týká vakcíny proti kokcidióze drůbeže.

Dosavadní stav techniky

Kokcidióza je onemocnění různých druhů hospodářských zvířat, zejména kura domácího vyvolávané parazitickými prvoky, zejména rodu Eimeria, jehož následkem je zhoršení přírůstků hmotnosti, zvýšení spotřeby krmiva a popřípadě úhyn nakažených zvířat. V současné době se prevence provádí většinou kontinuálním podáváním antikokcidik v krmivu. Tento způsob prevence má řadu nevýhod spočívajících ve vývoji resistence k používaným preparátům, v možných residuích těchto látek v jatečných produktech a v zábně vývoje přirozené imunity proti kokcidióze, která je velmi důležitá pro drůbež odchovanou za účelem snášky vajec pro konsumní či rozmnožovací účely. Dalším způsobem prevence kokcidiózy je vakcinace drůbeže pomocí vakciny založené na patogenních či atenuovaných liniích různých druhů kokcidií. Při použití patogenních druhů kokcidií pro vakcinaci dochází k přechodnému snížení užitkovosti vakcinované drůbeže a zejména prarodičovské linie jednotlivých plemen jsou na infekci patogenními kokcidiemi tak citlivé, že je nelze k vakcinaci vůbec pouít. Doposud jsou známy jen dva způsoby oslabování patogenity kokcidií. Long (1965, Nature, 208: 509 a J.of Comparative Patholog, 82: 429 až 437) zjistil, že kokcidii Eimeria tenella lze adaptovat na růst v kuřecích embryích a že po dlouhodobém pasážování dochází ke snížení jejich patogenity, přičemž stability této vlastnosti je dosaženo po 60 pasážích v kuřecích embryích. Jeffers (1977, J.Parasitol., 61: 1083 až 1090) zjistil, že patogenitu lze oslabit též řízeným zkracováním vývojového cyklu různých druhů kokcidií. Linie kokcidií, jejichž patogenita byla oslabena tímto druhým způsobem, byly použity McDonaldem a Shirleym pro přípravu vakcíny proti kokcidiím kura domácího EP č. 0256 878. Oocysty kokcidií používané k vakcinaci jsou v tomto případě získávány z trusu infikovaných kuřat. Z literárních údajů je známo (např. Michajlovič et al., Acta veterinaria, Beograd, 1980, 30:143 až 147), že při infekci kuřat Newcastelskou chorobou mohou virové partikule vyvolávající toto onemocnění přecházet i do oocystkokcidií, zejména druhu Eimeria tenella. Takto se mohou oocysty kokcidií získávané na kuřatech a používané k vakcinaci stát zdrojem této nákazy pro další kuřata. Oocysty kokcidií jsou velmi odolné vůči běžným desinfekčním prostředkům a v prostředí, kde se s nimi pracuje, či kde je přítomna drůbež, je velmi obtížné zabránit kontaminacím při pasážování kokcidií jednoho druhu či jedné linie oocystami jiných druhů kokcidií. Toto nebezpečí se výrazně zvyšuje jednak při nutnosti udržovat velké počty kuřat kokcidií prostých až do stáří minimálně tří týdnů pro potřeby průmyslové produkce různých druhů kokcidií za účelem výroby vakcíny nebo jednak pomnožování rychlených linií kokcidií, protože jejich reprodukční potenciál je nižší, než potenciál patogenních kmenů kokcidií, takže případná kontaminace způsobí převládnutí oocyst patogenního kmene v produkovaných oocystách. Toto je obzvlášť důležité pro E.tenella, největšího kokcidiového patogena u drůbeže. Další nevýhodou je nebezpečí kontaminace oocyst získaných z trusu infikovaných kuřat patogenními bakteriemi (např. salmonelami).

Podoba vynálezu

Uvedené nevýhody z velké části odstraňuje vakcina proti kokcidióze drůbeže, zejména na bázi linií rodu Eimeria, jejichž patogenita byla oslabena, za přítomnosti běžného nosiče a adjuvants, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že jedna vakcinační dávka obsahuje
100 až 1000 oocyst Eimeria tenella a
100 až 600 oocyst Eimeria acervulina.
Patogenita linie Eimeria tenella byla oslabena adaptací na růst v kuřecích embryích a dlouhodobým pasážováním v kuřecích embryích na patogenita linie Eimeria acervulina byla oslabena zkrácením vývojového cyklu.
Vakcina podle vynálezu výhodně obsahuje v jedné vakcinační dávce
100 až 1000 oocyst Eimeria tenella a
100 až 600 oocyst Eimeria acervulina, popřípadě
50 až 600 oocyst Eimeria maxima a/nebo
100 až 600 oocyst Eimeria praecox a/nebo
100 až 600 oocyst Eimeria mitis a/nebo
100 až 600 oocyst Eimeria brunetti a/nebo
100 až 1000 oocyst Eimeria necatrix.
Patogenita linií Eimeria tenella, Eimeria mitis, Eimeria necatrixa Eimeria praecox byla oslabena adaptací na růst v kuřecích embryích a dlouhodobým pasážováním v kuřecích embryích.
Vakcina podle vynálezu dále obsahuje v jedné vakcinační dávce
200 až 500 oocyst Eimeria tenella a
200 až 500 oocyst Eimeria acervulina.
Patogenita linie Eimeria tenella byla oslabena adaptací na růst v kuřecích embryích s dlouhodobým pasážováním v kuřecích embryích.
Vakcína podle vynálezu dále obsahuje v jedné vakcinační dávce
200 až 500 oocyst Eimeria tenella a
200 až 500 oocyst Eimeria acervulina, popřípadě
200 až 500 oocyst Eimeria maxima.
Patogenita linie Eimeria tenella byla oslabena adaptací na růst v kuřecích embryích a dlouhodobým pasážováním v kuřecích embryích.
Vakcina podle vynálezu dále obsahuje v jedné vakcinační dávce
200 až 500 oocyst Eimeria tenella a
200 až 500 oocyst Eimeria acervulina, popřípadě
200 až 500 oocyst Eimeria maxima a/nebo
200 až 500 oocyst Eimeria praecox a/nebo
200 až 500 oocyst Eimeria mitis a/nebo
200 až 500 oocyst Eimeria brunetti a/nebo
200 až 500 oocyst Eimeria necatrix.
Patogenita linií Eimeria tenella, Eimeria mitis, Eimeria necatrix a Eimeria praecox byla oslabena adaptací na růst v kuřecích embryích a dlouhodobým pasážováním v kuřecích embryích.
Linie kokcidií rodu Eimeria s oslabenou patogenitou byly odvozeny od mateřských kmenů kokcidií

Eimeria tenella CH/CS	1966/01,
Eimeria acervulina CH/CS	1966/01,
Eimeria maxima J/CS	1982/01,
Eimeria brunetti CHR/CS	1988/01,
Eimeria praecox TR/CS	1987/01,
Eimeria mitis BY/CS	1985/01 a
Eimeria necatrix I/CS	1988/02.

Vakcina podle vynálezu se získá tak, že oocysty druhů Eimeria tenella, Eimeria mitis, Eimeria necatrix a Eimeria praecox, jejichž patogenita byla oslabena adaptací na vývoj v kuřecích embryích a dlouhodobým pasážováním v kuřecích embryích metodou popsanou Longem (1965, 1972), a oocysty druhů, které nelze adaptovat na růst v kuřecích embryích, tj. Eimeria brunetti, Eimeria maxima, Eimeria acervulina, takže jsou získány z trusu kuřat infikovaných kokcidiemi, jejichž patogenita byla oslabena zkrácením vývojového cyklu metodou popsanou Jeffersem (1977), se smíchají tak, aby 1 ml konečné suspenze obsahoval 10 až 100 tisíc oocyst Eimeria tenella, 10 až 60 tisíc oocyst Eimeria acervulina a oocysty dalších požadovaných druhů v odpovídajícím množství. Suspenze oocyst je konzervována 2,5% roztokem dvojchromanu draselného či 1% roztokem chloraminu.

Při používání kuřecích embryí z chovů prostých Newcastleské choroby je eliminováno nebezpečí přenosu této choroby vakcinou a taktéž při případné kontaminaci kuřecích embryí patogenními kokcidiemi je jejich pomnožení potlačeno, protože produkční schopnost linií adaptovaných na kuřecí embrya je podstatně vyšší.

Vakcina podle vynálezu se aplikuje tak, že po 2 až 3 h žíznění se podá kuřatům vakcina naředěná pitnou vodou na objem, který kuřata vypijí do 2 hodin.

Grafy 1 až 2 demonstrují průběh snášky u slepic hybrida Hisex hnědý vakcinovaných během odchovu proti kokcidióze bivalentní vakcínou obsahující oocysty druhů Eimeria tenella a Eimeria acervulina na farmě S.

Grafy 3 až 4 demonstrují průběh snášky u slepic hybrida Hisex hnědý ošetřovaných během odchovu antikokcidiky.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Vysporulované oocysty linie Eimeria tenella oslabené pasážováním na kuřecích embryích se vysterilizují působením antiforminu po dobu 30 až 60 minut. Po odstranění antiforminu centrifugací jsou z oocyst ve fyziologickém roztoku uvolněny sporocysty a z nich pomocí trypsinu a žluči působící na sporocysty 60 min. při 41 °C asporozoity. Po vymytí trypsinu jsou sporozoity inokulovány v množství 5 až 30 tisíc do alantois kuřecích embryí starých 10 až 13 dní. Kuřecí embrya jsou udržována při teplotě 38 °C. Sedmý den po infekci jsou embrya usmrcena a urátové shluky obsahující nové oocysty vyjmuty, oocysty jsou pak rozvolněny opatrnou homogenizací urátových shluků a po krátkém natrávení antiforminem vysporulovány v roztoku dvojchromanu draselného. Tímto způsobem lze připravit též oocysty druhů Eimeria mitis a Eimeria praecox. Takto získané oocysty jsou uchovávány v 2,5% roztoku dvojchromanu draselného či 1% roztoku chloraminu při 4 °C. Oocysty oslabených linií, které nelze pasážovat na kuřecích embryích, jsou získávány infekcí kuřat. Jednodenní sexovaní kohoutci snáškových plemen kura domácího jsou umístěni v klecích v přísné izolaci za účelem zabránění kontaminace patogenními kmeny kokcidií a krmeni dietou obsahující účinné širokospektré antikokcidikum až

do stáří minimálně tří týdnů. Za dva dny po převedení na krmení bez antikokcidik jsou kuřata infikována dávkou 5 až 100 tisíc oocyst žádaného druhu kokcidií. Dle délky prepatentní periody daného druhu kokcidií je pak zahájen sběr trusu obsahující oocysty, který probíhá 2 až 3 dny. Oocysty jsou bezprostředně izolovány z trusu flotací v nasyceném roztoku chloridu sodného a po jeho vymytí vodou probíhá sporulace v 2,5% roztoku dvojchromanu draselného, či jiném prostředku zabraňujícím množení bakterií, za současného okysličování probubláváním vzduchu. Vysporulované oocysty jsou uchovávány v 2,5% roztoku dvojchromanu draselného či v 1% roztoku chloraminu při 4 °C a používány pro přípravu vakcíny.

Vlastní příprava vakciny spočívá ve smíchání suspence oocyst po- žadovaných druhů kokcidií v takovém poměru, aby 1 ml vakcíny obsahoval 50 tisíc oocyst Eimeria tenella, tj. 100 vakcinačních dávek na jedno kuře. Množství ostatních druhů kokcidií zahrnutých do vakcíny se liší podle druhu a to tak, že může být na 5 oocyst Eimeria tenella 2 až 5 oocyst Eimeria acervulina a Eimeria maxima, přičemž u druhů Eimeria brunetti, Eimeria praecox a Eimeria mitis je poměr jejich oocyst k oocystám Eimeria tenella 1:1. Oocysty jsou konzervovány 2,5% roztokem dvojchromanu draselného či 1% roztokem chloraminu. Takto připravená vakcina se podává kuřatům starým 7 až 10 dnů v pitné vodě naředěné na objem, který kuřata vypijí za cca 2 hodiny, přičemž před palikací vakcíny je kuřatům v drůbežárně zamezen přístup k vodě na cca 2 hodiny.

Vakcína podle vynálezu byla odzkoušena k vakcinaci brojlerů a chovných kuřat. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách I až III a přiložených grafech 1 až 4.

Z tabulky I a II vyplývá, že účinnost bivalentní vakcíny obsahující oocysty atenuovaných linií kokcidií druhů Eimeria tenella a E.acervulina je srovnatelná s účinností antikokcidik ve výkrmu brojlerů.

Z tabulky III vyplývá srovnatelná účinnost jednotlivých typů vakcin proti kokcidióze, obsahující různé druhy kokcidií ve výkrmu brojlerů.

Z grafů 1 až 4 vyplývá srovnatelná účinnost bivalentní vakcíny obsahující druhy E.tenella a E.acervulina v odchovu snáškových plemen slepic 61 300 kusů s ošetřováním antikokcidiky (taktéž 61 300 ks). Nástup do snášky a její průběh byl v obou případech obdobný.

Průmyslová využitelnost

Vakcinu proti kokcidióze drůbeže na bázi linií rodu Eimeria oslabenou patogenitou je možné využít k vakcinaci brojlerů a chovných kuřat.

Tabulka I

Výsledky vakcinace brojlerů proti kokcidióze bivalentní vakcinou obsahující oocysty Eimeria tenella a Eimeria acervulina na farmě LR.

Turnus	1.		2.		3.		4.		5.		6.		Celoroč.souhrn	
Ošetření	Vakcina	Antikok-cidika	Vakcina	Antikok-cidika	Vakcina	Antikok-cidika	Vakcina	Antikok-cidika	Vakcina	Antikok-cidika	Vakcina	Antikok-cidika	Vakcina	Antikok-cidika
Naskladněno	14 685	16 650	14 870	15 430	15 040	15 439	15 230	15 440	15 100	15 430	15 430	15 190	90 355	93 579
Ztráty %	3,92	2,82	2,51	2,59	2,59	4,5	1,51	3,32	2,45	3,98	2,59	3,71	2,59	3,49
Živá hmotnost (kg)	2,01	1,85	1,959	1,883	1,783	2,00	1,895	1,956	1,978	2,047	1,89	1,93	1,92	1,94
Konverze krmiva	2,20	2,28	2,096	2,175	2,001	2,327	1,905	2,108	1,954	2,238	2,15	2,11	2,05	2,21
Délka výkrmu	46,5	46,5	47,5	45,5	47,0	46,5	47,00	45,00	46,5	47,5	45,0	46,0	46,6	46,2
Číslo produkt.	188,77	169,57	191,8	185,3	184,7	176,6	191,8	179,4	201,7	171,9	175,0	179,9	188,96	177,1

Vysvětlivky k tabulce I až III: Vakcina složená z druhů E.tenella a E.acervulina, 500 oocyst od každého druhu/kuře

Antikokcidika - halofuginon a narasin, resp. monensin

$$\text{Číslo produktivity} = \frac{\text{dožitelnost v \% . živá hmotnost}}{\text{konverze krmiva . délka výkrmu}} \cdot 100$$

+Vysoký úhyn zapříčiněn pneumonií.

Tabulka II

Výsledky vakcinace brojlerů proti kokcidióze bivalentní vakcinou obsahující oocysty Eimeria tenella a Eimeria acervulina na farmě LP.

Turnus	1.	2.	3.	4.	5.	Souhrnné výsledky vakcinace	Antikokcidika+
Ošetření	vakcinace						
Naskladněno	5 680	5 460	5 450	5 440	5 400	22 030	27 297
Ztráty %	6,28	4,74	4,86	3,84	3,8	4,93	3,03
Živá hmotnost (kg)	1,63	1,56	1,67	1,95	1,95	1,71	1,62
Konverze krmiva	2,24	2,20	2,08	2,04	2,09	2,13	2,13
Délka výkrmu (dny)	46	44	44	48	45	45,5	47,3
Číslo produktivity	144,8	155,91	172,98	191,77	183,5	167,74	161,36

+Souhrnné výsledky z pěti předchozích turnusů ošetřených antikokcidiky

Vysvětlivky viz tab. I

Tabulka III

Výsledky vakcinace brojlerů proti kokcidióze vakcinou proti kokcidióze o různém složení na farmě VK.

Turnus	1.		2.				3.				4.	
Ošetření	Vakcina TA	Antikok-cidika	Vakcina TA	TAM	TAP	Antikok-cidika	Vakcina TA	TAB	TAMB	Antikok-cidika	Vakcina TAB	Antikok-cidika
Naskladněno	10 045	10 045	10 450	10 450	10 450	10 450	10 412	10 412	10 412	10 412	9 800	9 800
Ztráty %	4,66	7,87	5,46	5,6	5,47	6,20	3,95	4,34	3,95	4,24	2,65	3,42
Živá hmot-nost (kg)	2,16	2,17	1,75	1,84	1,75	1,90	1,79	1,81	1,74	1,86	1,99	2,08
Konverze	2,33	2,33	2,37	2,31	2,36	2,27	2,39	2,39	2,39	2,38	2,31	2,32
Délka výkrmu (dny)	48	48	46	46	46	46	46	46	46	46	47	47
Číslo produktivity	184,10	178,79	151,75	163,46	152,38	170,70	156,4	157,5	152,0	162,70	178,40	184,20

Druhy obsažené ve vakcině:
T - E.tenella
A - E.acervulina
M - E.maxima
P - E.praecox
B - E.brunetti

Číslo produktivity viz tab. I
Antikokcidika viz tab I

CS 277353 B6

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Vakcina proti kokcidióze drůbeže na bázi linií rodu Eimeria, jejichž patogenita byla oslabena, za přítomnosti běžného nosiče a adjuvants, vyznačující se tím, že jedna vakcinační dávka obsahuje
   100 až 1 000 oocyst Eimeria tenella a
   100 až 600 oocyst Eimeria aceruulina,
   přičemž patogenita linie Eimeria tenella byla oslabena adaptací na růst v kuřecích embryích a dlouhodobým pasážováním v kuřecích embryích a patogenita linie Eimeria acervulina byla oslabena zkrácením vývojového cyklu.

2. Vakcína podle bodu 1., vyznačující se tím, že jedna vakcinační dávka obsahuje
   100 až 500 oocyst Eimeria tenella a
   100 až 500 oocyst Eimeria acervulina.

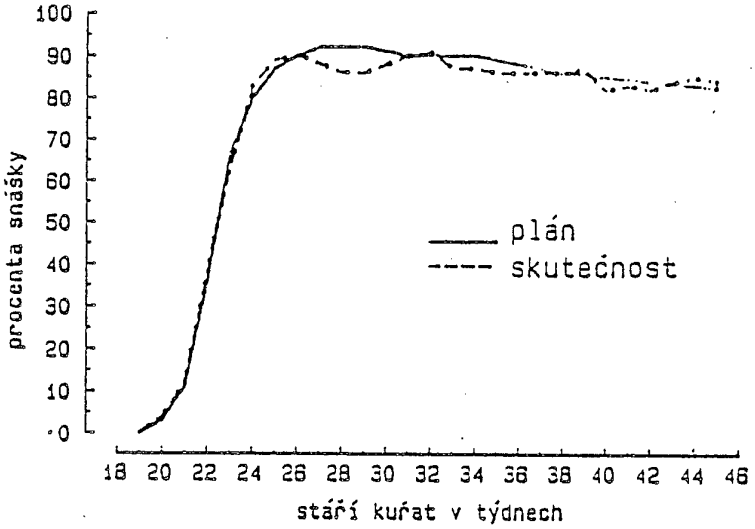
3. Vakcina podle bodu 1. až 2., vyznačující se tím, že jedna vakcinační dávka dále obsahuje
   50 až 600 oocyst Eimeria maxima a/nebo
   100 až 600 oocyst Eimeria brunetti,
   které jsou oslabeny zkrácením vývojového cyklu.

4. Vakcina podle bodu 1. až 3., vyznačující se tím, že jedna vakcinační dávka dále obsahuje
   100 až 600 oocyst Eimeria praecox a/nebo
   100 až 600 oocyst Eimeria mitis a/nebo
   100 až 1 000 oocyst Eimeria necatrix,
   přičemž u druhů Eimeria brunetti, Eimeria praecox a Eimeria mitis je poměr jejich oocyst k oocystám Eimeria tenella 1:1, kdy patogenita linií Eimeria praecox, Eimeria mitis, Eimeria necatrix byla oslabena adaptací na růst v kuřecích embryích a dlouhodobým pasážováním v kuřecích embryích.

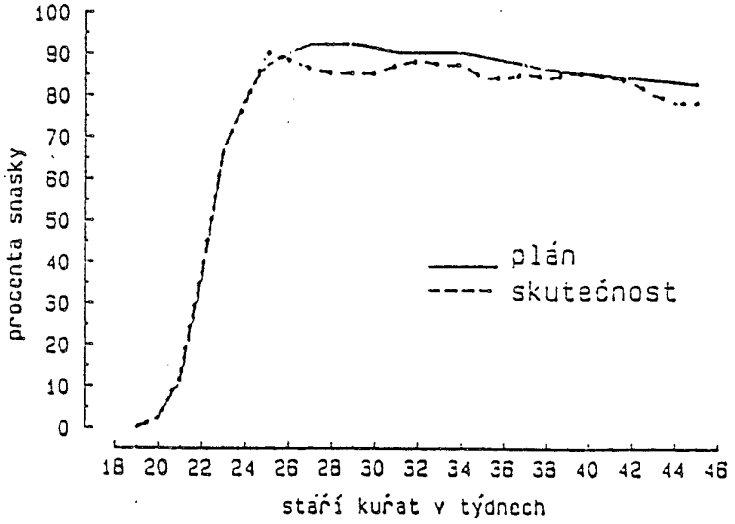
5. Vakcina podle bodů 1. až 4., vyznačující se tím, že jedna vakcinační dávka obsahuje
   200 až 500 oocyst Eimeria maxima a/nebo
   200 až 500 oocyst Eimeria praecox a/nebo
   200 až 500 oocyst Eimeria mitis a/nebo
   200 až 500 oocyst Eimeria brunetti a/nebo
   200 až 500 oocyst Eimeria necatrix.

2 výkresy

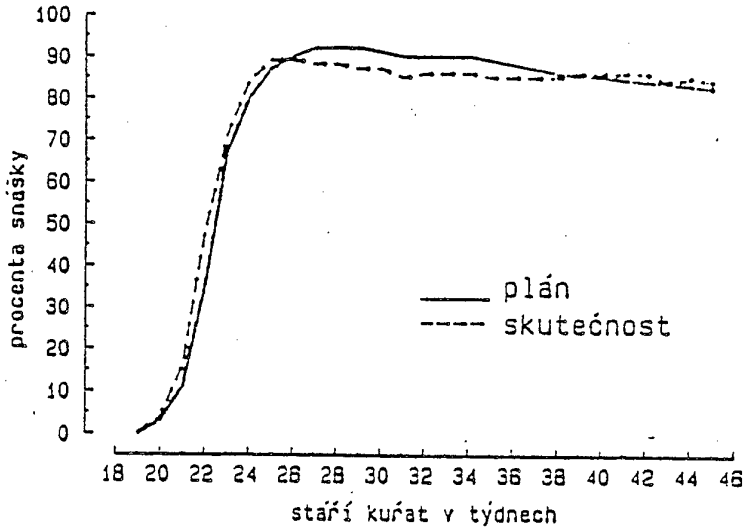
Graf 1


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
procenta snášky
plán
skutečnost
18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46
stáří kuřat v týdnech

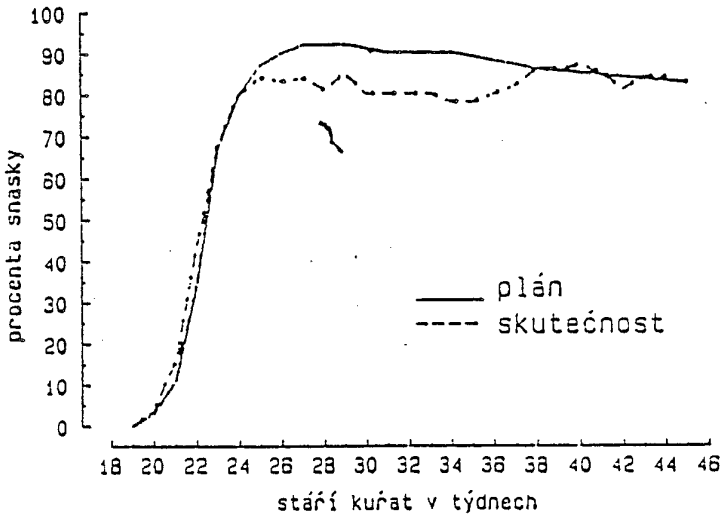
Graf 2


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
procenta snasky
plán
skutečnost
18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46
stáří kuřat v týdnech

Graf 3



Graf 4



Konec dokumentu