



Patentdirektoratet  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3361/86

(51) Int.Cl.5

A 61 K 39/215  
//(A 61 K 39/215,  
A 61 K 39:17)

(22) Indleveringsdag: 15 jul 1986

(41) Alm. tilgængelig: 19 jan 1987

(44) Fremlagt: 16 nov 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 18 jul 1985 NL 8502070

(71) Ansøger: \*DUPHAR INTERNATIONAL RESEARCH B.V.; C.J. van Houtenlaan 36; Weesp, NL

(72) Opfinder: Nico van \*Witenburg; NL

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Vaccine mod smitsom bronkitis hos daggamle kyllinger, samt virusstamme indeholdt i vaccinen

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

3361-86

En levende vaccine mod smitsom bronkitisvirus (IBV) hos daggamle kyllinger er baseret på IBV-stamme 84-3, som er registreret hos Institut Pasteur i Paris under nr. I-473.

Opfindelsen angår vacciner mod smitsom bronkitis-virus (IBV) hos fjerkræ, og mere specielt forbedrede vacciner mod smitsom bronkitis, hvilke vacciner er særdeles sikre og effektive til vaccinering af daggamle 5 kyllinger. Desuden angår opfindelsen en virusstamme indeholdt i vaccinen.

Anvendelsen af levende vacciner mod smitsom bronkitis hos fjerkræ har allerede været kendt gennem mange år. Smitsom bronkitis er en væsentlig påvirkning af 10 bronkierne i fjerkræ forårsaget af en corona virus. Sygdommen forårsager store økonomiske tab indenfor fjerkræavl, fordi smitsom bronkitis stadig forårsager stor dødelighed, især blandt ungt fjerkræ. Foruden dødelighed og mere eller mindre udprægede respirationsfænomener, 15 sker der som et resultat af en IB-infektion, skade på hønsenes æglægningssystem, og som følge deraf reduktion i læggehønsenes produktion. Yderligere kan infektioner med IBV stimulere virus- og bakterielle infektioner, og således resultere i alvorlige økonomiske tab, især in- 20 denfor slagtekyllingsektoren.

Vacciner baseret på levende virus har i begyndelsen været anvendt til bekæmpelse af smitsom bronkitis. F. eks. har man allerede gennem lang tid anvendt levende IBV-vacciner baseret på en modificeret H-stamme. Den op- 25 rindelige H-stamme isoleredes af Bijlenga, Hoekstra og Rispens (Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 81, (1956), side 43, 85 (1960), side 279, og 85 (1960), side 398) og førtes få gange gennem embryonerede hønseæg. Senere opnåedes stammerne (H120 og H52) som viste sig at være 30 mindre virulente for hønen end viruset, der var isoleret fra naturen. Den modificerede stamme H120 anvendes til vaccination af daggamle kyllinger, medens stamme H52 især anvendes til cirka 8 uger gamle dyr.

Skønt anvendelsen af vacciner baseret på stammer- 35 ne H120 og H52 er forholdsvis sikre og virkningsfulde, har det vist sig at de to levende vacciner under visse

omstændigheder ikke er i stand til at hindre udbrud af smitsom bronkitis. Disse udbrud kan henføres til forekomsten af modificerede stammer. Forekomsten af modificerede stammer kræver søgen efter mere virkningsfulde  
5 vacciner baseret på smitsom bronkitisvirusstammer af forskellige serotyper.

Denne undersøgelse har ført til vaccinerne, som er beskrevet i europæisk patentbeskrivelse 0.030.063 og europæisk patentansøgning 0.086.025 som begge er baseret  
10 på smitsom bronkitisvirus (IBV) modificerede stammer. Det har vist sig, at der opnås en effektiv beskyttelse mod smitsom bronkitis ved anvendelse af vacciner (levende og inaktiverede) baseret på de såkaldte modificerede stammer.

15 Undersøgelser har påvist at læggehøns kan beskyttes effektivt ved en kombineret anvendelse af både levende og inaktiverede vacciner.

Slagtekyllinger er hidtil blevet vaccineret mod smitsom bronkitis på deres første levedag, med en vaccine  
20 ne baseret på stamme H120. Grundet forekomsten af de modificerede stammer er ovennævnte vaccination ikke længere effektiv, og derfor bør man finde derivater af de forekommende modificerede stammer, hvilke derivater kan administreres på dag 1. Undersøgelse af slagtekyllinger  
25 gennemført af the Public Health Department for Poultry i Doorn har vist at udover serotypen Massachusetts (H120, H52), er der hovedsageligt fundet vira af serotypen D207. Følgelig skal en virkningsfuld vaccine til beskyttelse af slagtekyllinger mod smitsom bronkitis bestå af  
30 H120 og et virus beslægtet med stamme D207

Skønt det i ovennævnte europæiske patentbeskrivelse og europæiske patentansøgning angives, at vaccinerne beskrevet deri også kan anvendes til unge dyr, har forsøg vist at levende vacciner baseret på de IBV-modificerede stammer, som kendes fra disse dokumenter er for  
35 virulente til vaccination af daggamle slagtekyllinger.

Stammen D274 nævnt i den europæiske patentansøgning (og registreret hos henholdsvis Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, England VLO 10110/AVI/3 og Institut Pasteur under nr. I-216) viste sig at være for  
5 virulent til vaccination af daggamle kyllinger efter 52 og selv efter 122 ægpasager.

Det har overraskende vist sig, at en sikker og effektiv levende vaccine til beskyttelse af daggamle kyllinger mod en modificeret stamme af smitsom bronkitis  
10 opnås når stammen registreret hos Institut Pasteur under nr. I-473 anvendes som en virusstamme.

Følgelig angår opfindelsen en levende vaccine mod smitsom bronkitis, der er ejendommelig ved, at den omfatter et virus af stammen 84-3, som er registreret hos  
15 Institut Pasteur i Paris under nr. I-473.

Opfindelsen angår endvidere virusstammen IBV 84-3 registreret hos Institut Pasteur i Paris under nr. I-473.

Den benyttede virusstamme hidrører fra en stamme  
20 isoleret fra naturen, og omtales herefter som virusstamme 84-3.

Et almindeligt kendt problem ved administrering af vacciner baseret på mere end én levende virusstamme er, at kombinerede vira er mindre immunogene på grund af  
25 gensidig påvirkning (se Am. J. Vet. Res. 36, (1965), side 4, 524 og 525; og Avian Diseases 12, (1968), side 577).

Det er særdeles overraskende at problemet med gensidig påvirkning ikke viser sig når den hidtil ukend-  
30 te stamme 84-3 ifølge opfindelsen kombineres med H120 og andre levende fjerkrævira.

Forsøg 1Sikkerhed af stammen 84-3.

Tre grupper på hver 20 daggamle SPF kyllinger vaccineredes på dag 1 med en dosis på  $10^{4,3}$  EID<sub>50</sub> (æg-  
5 infectionseffektiv dosis) pr. kylling ved drypning i øjet (gruppe 1 med den kendte stamme H120, gruppe 2 med stammen D274, efter at den havde været udsat for 52 ægpassager, gruppe 3 med stammen 84-3 ifølge opfindelsen). En fjerde gruppe på 20 dyr tjente som kontrolgruppe.

10 På dag 5, aflivedes 10 kyllinger fra hver gruppe for vævsundersøgelse af trachea (se R. W. Winterfield et al, Avian Dis. 16 (1972), side 260-269). De resterende 10 kyllinger fra hver gruppe aflivedes ligeledes på dag 5 for undersøgelse af ciliær aktivitet (J. H. Darbyshire, Avian Pathol. 9 (1980), side 179-184). Resultatet af  
15 dette forsøg er angivet i tabel A.

TABEL A

20

Gruppe	Ciliær aktivitet a)	Trachea læsioner b)
25 1	6/9	0,1
2	4/10	1,3
3	9/10	0,54
kontrol	10/10	0

30

a) antallet af kyllinger med ciliær aktivitet og det totale antal af undersøgte kyllinger pr. gruppe.

b) den i prøven anvendte skala til evaluering er på fra 0 til 3.

35

Det ses fra ovenstående tabel, at startende med en dosis på  $10^{4,3}$  EID<sub>50</sub> pr. dyr, dvs. mere end et ti

gange overskud, er stammen 84-3, baseret på ciliæraktivitet, mindre virulent end stammen D274 efter 52 ægpassager og stammen H120. Imidlertid er stammen 84-3, baseret på trachea-læsioner, lidt mere virulent end stammen  
 5 H120. En forklaring på denne forskel kan være, at stammen 84-3 forårsager flere læsioner uden at ødelægge den ciliære aktivitet, hvilket derfor kan betyde at stammerne 84-3 og H120 har lidt forskellig pathologi.

Tilstedeværelsen af ciliær aktivitet betragtes  
 10 sædvanligvis som en pålidelig indikation for beskyttelse mod udsættelse for virulent virus.

Da 9 ud af 10 kyllinger vaccineret med stamme 84-3 udviste ciliær aktivitet, kan det konkluderes at stammen er sikker til daggamle kyllinger, så meget desto  
 15 mere når det tages i betragtning, at man i dette forsøg har administreret mere end et 10 gange overskud til særlig følsomme dyr, nemlig SPF-kyllinger uden maternal immunitet.

20

### Forsøg 2

#### Virkning af vaccination med stamme 84-3.

To grupper på hver 30 daggamle kyllinger opbevarede adskilt.

På dag 1, vaccineredes kyllingerne i prøvegruppen  
 25 ved drypning i øjet med en dosis på  $10^{3,3}$  EID<sub>50</sub> pr. dyr (af stammen 84-3 ifølge opfindelsen). To uger efter vaccinationen aflivedes 5 kyllinger fra hver gruppe og undersøgte for ciliær aktivitet. Dette blev gentaget 4 uger efter vaccinationen. Begge grupper viste 100% ciliær aktivitet.  
 30

Fire uger efter vaccinationen, blev 12 dyr fra hver gruppe udsat for en dosis på  $10^{3,0-3,5}$  EID<sub>50</sub> pr. kylling af den virulente stamme D207. Dette virus administreredes delvis intranasalt og delvis intraokulært.  
 35 Seks dage efter undersøgte dyrene for ciliær aktivitet og trachea læsioner. Resultatet er angivet i tabel B.

TABEL B

5	Gruppe	Trachea læsioner	Ciliær aktivitet <sup>c)</sup>			n
			+	+/-	-	
	prøve	0,5	10	1	1	12
10	kontrol	1,9	2	0	10	12

c) + : tilstedeværelse af ciliær aktivitet.

+/-: tilstedeværelse af ciliær aktivitet på nogle områder

15 - : ingen tilstedeværelse af ciliær aktivitet.

Som det ses af de opnåede resultater er mere end 83% af dyrene fra prøvegruppen beskyttet, hvorimod kun 17% af den ikke-vaccinerede kontrolgruppe er beskyttet. Dette resultat bekræftes af trachea læsions undersøgelsen i begge grupper.

20

### Forsøg 3

#### Kombineret administrering af stamme 84-3 og stamme H120 til daggamle kyllinger

25 To grupper på hver 17 daggamle SPF kyllinger vaccineredes på dag 1 med en dosis på  $10^{3,0}$  EID<sub>50</sub> af stamme 84-3 plus  $10^{3,5}$  EID<sub>50</sub> af stamme H120 pr. kylling. Hver prøvegruppe ledsagedes af en kontrolgruppe på 8 kyllinger. Fire uger efter vaccinationen blev dyrerne fra én

30 prøvegruppe og én kontrolgruppe udsat for en dosis på  $10^{3,5}$  EID<sub>50</sub> af den virulente stamme D207. Den anden prøvegruppe og kontrolgruppe blev på samme tidspunkt udsat for en dosis på  $10^{3,5}$  EID<sub>50</sub> af stammen Voet (dvs. den virulente stamme). Begge virulente stammer administreres både intranasalt og intraoculært. Før administrering af viruset samledes de vaccinerede og ikke-vaccine-

35

rede kyllinger. Seks dage efter administrering af virus-  
et blev dyrene aflivet og undersøgt for ciliær aktivitet  
og trachea læsioner. Resultaterne er angivet i tabel C.

5

TABEL C

Gruppe	<u>Udsættelse for D207</u>		<u>Udsættelse for Voet</u>	
	<u>Ciliær akt. Trach. læs</u>		<u>Ciliær akt. Trach. læs</u>	
prøve	17/17	0,51	17/17	0
kontrol	0/8	1,63	0/8	2,63

15

Det ses fra ovenstående tabel, at den ciliære ak-  
tivitet hos kyllingerne i begge grupper var intakt,  
hvilket angiver 100% beskyttelse. Dette bekræftes af det  
lave læsions-tal hos de to prøvegrupper (0,51 og 0) i  
20 forhold til kontrolgrupperne (1,63 og 2,63).

Vaccination af daggamle SPF kyllinger med en kom-  
bination af stammerne 84-3 og H120 giver en god beskyt-  
telse mod udsættelse for virus af stammen D207 eller  
stammen Voet, hvilket indikerer at begge vira ikke på-  
25 virker hinanden i ugunstig retning under vaccinationen.  
Dette kan vises endnu engang ved hjælp af forsøg 4.

Forsøg 4Forsøg i lille skala.

30

Tre grupper på henholdsvis 375 (gruppe 1), 400  
(gruppe 2) og 50 (gruppe 3) daggamle slagtekyllinger og  
én gruppe på 40 daggamle SPF-kyllinger (gruppe 4) an-  
vendtes.

Gruppe 1 vaccineredes på dag 0 med en dosis på  
35  $10^{4,5}$  EID<sub>50</sub> af stamme 84-3 og  $10^{3,3}$  EID<sub>50</sub> af stamme H120  
pr. dyr. På dag 0 administreredes en dosis  $10^{3,3}$  EID<sub>50</sub>

af stamme H120 pr. dyr til gruppe 2 (spraymetode). Gruppe 3 og 4 tjente som ikke-vaccinerede kontrolgrupper.

På dag 10 aflivedes 20 dyr fra grupperne 1 og 2 for trachealæsionsundersøgelse.

5 Dyrernes vejrtrækning kontrolleredes fra dag 0 til dag 21.

På dag 28 blev 25 dyr fra grupperne 1, 2 og 3, samt 10 dyr fra gruppe 4 udsat intraoculært for en dosis på  $10^{3,8}$  EID<sub>50</sub> af den virulente stamme Voet.

10 Det samme antal dyr fra hver gruppe blev på dag 28 udsat for en dosis på  $10^{3,5}$  EID<sub>50</sub> af den virulente stamme D274 (intranasalt og intraoculært).

Seks dage efter administrering af viruset, blev dyrerne aflivet og undersøgt for trachealæsioner og cil-  
15 liær aktivitet.

Tilførelsen på dag 28 blev gentaget med identiske grupper på dag 42. Disse dyr blev ligeledes aflivet seks dage senere og undersøgt.

De resterende dyr i grupperne 1 og 2 blev vejet  
20 på dag 60 for at bestemme middelvægten på slagtedagen.

Resultaterne af trachealæsionsprøven efter 10, 28 + 6 og 42 + 6 dage er angivet i tabel D.

TABEL D (Trachea læsionstal)

5	Gruppe Nr.	10 dage efter vaccination	28+6 dage efter udsættelse for		42+6 dage efter udsættelse for	
			Voet	D274	Voet	D274
10						
	1	0,40	0,17	0,31	0,00	0,04
	2	0,35	0,24	0,60	0,08	0,57
	3	n.d.	1,59	1,83	n.d.	n.d.
15	4	n.d.	1,10	1,33	1,09	1,60

n.d. = ikke udført

Resultaterne af ciliestopprøven (CST) er angivet  
20 i tabel E, hvor tallene angiver % beskyttelse.

TABEL E (CST).

5	Gruppe	28 + 6 dage efter udsættelse for		42 + 6 dage efter udsættelse for	
		Voet	D274	Voet	D274
10					
	1	100	92	100	100
	2	91	64	100	84
	3	0	0	n.d.	n.d.
15	4	0	0	0	0

På slagtedagen havde dyrene fra gruppe 1 en mid-  
delvægt på 2350 g (n=221), de fra gruppe 2 havde en mid-  
20 delvægt på 2310 g (n=233).

Fra de ovenfor anførte resultater følger det, at  
kombinationen af stamme 84-3 ifølge opfindelsen og H120  
er sikre for daggamle slagtekyllinger, fordi

- 1) der ikke forekommer øgning af respirationssymtomer  
25 efter administrering af den kombinerede vaccine,
- 2) der ikke forekommer højere trachea læsionstal efter  
vaccination,
- 3) der ikke er nogen bemærkelsesværdig forskel i slag-  
tevægt.

30 Beskyttelsen efter udsættelse for virulent virus  
af stammen D274 er meget bedre for gruppe 1 (henholdsvis  
92 og 100% efter 4 og 6 uger) end for gruppe 2 (64 og  
83%). Ikke-vaccinerede dyr var allerede fuldstændig an-  
grebet i en alder af 4 uger.

35 Disse resultater blev fuldstændig bekræftet ved  
trachea-læsionstallene.

Gruppe 1: 0,31 og 0,04.

Gruppe 2: henholdsvis 0,60 og 0,57 i en alder af 4 og 6 uger.

Gruppe 3: 1,83 i en alder af 4 uger.

- 5 Beskyttelsen mod udsættelse for stammen Voet, som er homolog med H120 er sammenlignelige i grupperne 1 og 2.

Gruppe 1: 100% efter 4 og 6 uger.

Gruppe 2: 91% (4 uger), 100% (6 uger).

- 10 Dette bekræftes ligeledes ved trachea-læsionstallene:

Gruppe 1: henholdsvis 0,17 og 0,00 efter 4 og 6 uger.

Gruppe 2: henholdsvis 0,24 og 0,08 efter 4 og 6 uger.

Gruppe 3: 1,59 efter 4 uger.

- 15 Den kombinerede vaccine med stamme 84-3 og stamme H120 giver således en udmærket beskyttelse mod infektion med både stammen D274 og Massachusetts stammen under hele opfedningsperioden.

Som det fremgår af det ovenstående angår opfindelsen hidtil ukendte levende IBV vacciner, som i det mindste stammer fra den hidtil ukendte IBV stamme 84-3, og anvendelsen deraf til vaccinering af daggamle kyllinger.

Vacciner stammer fortrinsvis fra H120 virusstammen og IBV af stammen 84-3. Den hidtil ukendte virusstamme 84-3 kan oparbejdes til en levende vaccine ifølge standardfremgangsmåder. Ved disse fremgangsmåder blandes viruset med stabilisatorer, der sædvanligvis anvendes til dette formål, og frysetørres dernæst. Til administrationsformål skal den frysetørrede vaccine opløses i et flydende opløsningsmiddel, der er egnet til dette formål. Vaccinen kan administreres ved hjælp af de såkaldte øjedryps-, næsedryps-, drikkevands- eller spraymetoder for levende vacciner. Vaccination med den hidtil ukendte levende vaccine ifølge opfindelsen gennemføres fortrinsvis på daggammelt fjerkræ.

Det er klart, at kombinerede levende vacciner, der stammer fra den hidtil ukendte IBV stamme 84-3, stamme H120 og fra en eller flere andre fjerkræ virus-tuper, f.eks. Newcastle disease virus, ligeledes udgør  
5 en del af den foreliggende opfindelse.

## P A T E N T K R A V

1. Levende vaccine mod smitsom bronkitis, k e n -  
d e t e g n e t ved, at den omfatter et virus af stam-  
men 84-3, som er registreret hos Institut Pasteur i Pa-  
ris under nr. I-473.
- 5        2. Vaccine ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t  
ved, at den omfatter en virusmængde af stammen 84-3 på  
mindst  $10^{2,5}$  EID<sub>50</sub> pr. dosis.
3. Vaccine ifølge krav 1 eller 2, k e n d e -  
t e g n e t ved, at den desuden omfatter et eller flere  
10 vira af andre IBV (smitsom bronkitis virus)-stammer.
4. Vaccine ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t  
ved, at den udover virus af stammen 84-3 desuden omfat-  
ter virus af stammen H120.
5. Vaccine ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t  
15 ved, at den totale mængde af IBV er på mindst  $10^{6,0}$   
EID<sub>5</sub> pr. dosis.
6. Vaccine ifølge kravene 1-5, k e n d e t e g -  
n e t ved, at den desuden omfatter et eller flere an-  
dre fjerkrævira.
- 20        7. Vaccine ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t  
ved, at den udover virus af én eller flere andre IBV  
stammer, desuden omfatter Newcastle disease virus.
8. Virusstamme IBV 84-3 registreret hos Institut  
Pasteur i Paris under nr. I-473.