

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 164846 B

Patentdirektoratet  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 0470/83

(51) Int.Cl.5

A 61 K 39/215  
C 12 N 7/00

(22) Indleveringsdag: 04 feb 1983

(41) Alm. tilgængelig: 06 aug 1983

(44) Fremlagt: 31 aug 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 05 feb 1982 GB 8203400

(71) Ansøger: \*Akzo N.V.; Velperweg 76; 6826 DW Arnhem, NL

(72) Opfinder: Alois Gregor \*Burger; NL, Frans Gerrit \*Davelaar; NL, Heinrich Dieter \*Luetticken; NL

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Mikrobiologisk ren kultur af en infektiøs bronkitisvirusstamme

(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 5052/80 = (163067)

(57) Sammendrag:

470-83

Infektiøse bronkitisvacciner afledt af infektiøse bronkitis-  
vira, der spontant hæmagglutinerer hønseerythrocyter, frem-  
gangsmåder til fremstilling deraf, infektiøse bronkitis-  
virusstammer, der spontant hæmagglutinerer hønseerythrocyter,  
samt en fremgangsmåde til immunisering af æglæggende høns mod  
infektiøs bronkitis.

DK 164846 B

Den foreliggende opfindelse angår en mikrobiologisk ren kultur af en infektiøs bronkitisvirusstamme.

5 Et fjerkræ-coronavirus vides at være det forårsagende stof til frembringelse af akut meget smitsom respirationssygdom hos unge og voksne høns, hvilken sygdom er karakteriseret ved tracheal rallen, hosten, nysen og nasale udtømninger. Sygdommen, der kaldes infektiøs bronkitis (IB), kan forårsage høj dødelighed, navnlig blandt unge høns, og endvidere kan nyrer og forplantningsorganer blive påvirket, hvilken sidstnævnte skade kan resultere i et fald i ægproduktionen blandt læggehøns og avlshøns. I mange tilfælde er ægfaldet ledsaget af en enteris, der forårsager diarre.

15 Høns blev betragtet som værende den eneste naturlige vært for IB-virus (IBV), men fornylig er viruset også blevet isoleret fra kalkuner. Foruden fjerkræ-IBV er stoffet, der forårsager den coronare virale enteritis hos kalkuner (CET, Bluecomb disease), beskrevet som en anden fjerkræ-coronavirusart.

20 Til bekæmpelse af IB hos fjerkræ anvendes vacciner i stor målestok. Immunisering af f.eks. stegekyllinger og unge fremtidige lægge- og avlshøns er hovedsagelig baseret på levende, svækkede vacciner. De levende vaccinevirusstammer er desuden blevet valgt på grund af deres immunogene egenskaber på basis af deres antigene spektrum og formindskede pathogenicitet. Vacciner er blevet beskrevet indeholdende enten en bestemt serotype, såsom Connecticut (f.eks. Connecticut Isolate A 5968) eller Massachusetts (f.eks. Baudette type IBV 42), som kun beskytter mod den homologe type, eller som anvender en vaccine afledt af en bestemt virusstamme, der har vist sig kun at have et bredere antigenisk spektrum, såsom H-stammen.

35 Kombinationen af forskellige IB-serotyper i levende vacciner har også været forsøgt, men mest sandsynligt som resultat af indbyrdes vekselvirkning var den tilvejebragte beskyttelse mod de respektive serotyper ikke optimal.

Det viste sig således, at IB-vacciner baseret på disse hyppigt anvendt IB-virusstammer eller kombinationer deraf ikke resulterer i en fuldstændig immunisering mod udbrud af IB.

- 5      Opfindelsen angår derfor en mikrobiologisk kultur af en infektiøs bronkitisvirusstamme, der er ejendommelig ved, at den spontant hæmagglutinerer hønseerythrocyter.

- 10      IB-vacciner fremstillet ud fra IBV-stammer ifølge opfindelsen er imidlertid overraskende mere effektive overfor smitsom bronkitis. Disse hidtil ukendte vacciner kan afledes af infektiøse bronkitisvira, der spontant hæmagglutinerer hønseerythrocyter.

- 15      IB-vira, der har evnen til spontant at hæmagglutinere hønseerythrocyter, viste sig at forekomme blandt forskellige IBV-serotyper, f.eks. af Massachusetts-typen og Connecticut-typen, men også vira tilhørende nye serotyper blev identificeret.

- 20      Immuniseringsvirkningen af de virusstammer, der udviser spontan hæmagglutineringsvirkning af hønseerythrocyter, overstiger virkningen af vira hørende til de samme respektive serotyper, men som ikke spontant agglutinerer erythrocyter.

- 25      Det har også vist sig, at IB-vacciner afledt af kombinationer af IB-vira, der spontant agglutinerer hønseerythrocyter, tilvejebringer bedre beskyttelse end vacciner baseret på kombinationer af IBV-stammer fra forskellige serotyper, der ikke bevirker agglutineringsvirkning af hønseerythrocyter.

- 30      IB-vacciner fremstillet ud fra IBV-stammer ifølge den foreliggende opfindelse udviste også fortrinlige immuniseringsegenskaber ved kombination med vacciner afledt af en eller flere ikke-hæmagglutinerende IB-vira samt ved kombination med vacciner afledt af andre virale isolater, såsom vacciner mod  
35      Marek's sygdom, Newcastle-sygdom eller ægtabssygdom (egg drop disease).

Mikrobiologisk rene kulturer af infektiøse bronkitisvirusstam-

mer ifølge opfindelsen er deponeret hos the Central Veterinary Laboratory, New Haw at Weybridge, U.K., og registreret under numrene VLO 10110/AVI/3; VLO 10110/AVI/4; VLO 10110/AVI/5; VLO 10110/AVI/6 og VLO 10110/AVI/7, og som er deponeret hos Institut Pasteur, registreret under numrene henholdsvis I-216, I-217, I-218, I-215 og I-214, som svarer til betegnelserne henholdsvis D 274, D 1466, D 580, 246 G og 249 G, der er anvendt i beskrivelsen.

De omhandlede IBV-stammer viste sig at henhøre til forskellige serotyper. Stammerne 246 G og D 580 er henholdsvis af Massachusetts-type og Connecticut-type. Disse stammer er nye, men kan klassificeres blandt allerede eksisterende serotyper. Stammerne D 274, 249 G og D 1466 henhører til nye, hidtil uomtalte serotyper. I tabel 1 er resultaterne af virusneutralisationsforsøg (VN) i æg sammenfattet, idet der blev benyttet metoden konstant serum, fortyndet virus, hvilke resultater viser, at de hidtil ukendte isolater D 274 og D 1466 hverken hører til Massachusetts-serotypen, der ved disse forsøg repræsenteres af den hollandske vaccinstamme H<sub>52</sub>, eller til en af de nordamerikanske IB-serotyper, som ikke dækkes af H-stammevaccinerne. Den hæmagglutinerende stamme D 274 kan klassificeres som den hidtil ukendte serotype D 207, og det hæmagglutinerende virus D 1466 hører til typen D 212. Serotyperne D 207 og D 212 blev første gang identificeret i beskrivelsen til DK patentansøgning nr. 5052/80 og blev da anset for nye, eftersom de ikke svarede til allerede eksisterende serotyper, såsom Massachusetts-serotypen, eller til de nordamerikanske serotyper. Stammen 249 G tilhører den samme serotype som stammen D 274. Dette fremgår (i tabel 2) af krydsneutralisationsforsøg (under anvendelse af plaque-reduktionsprøven med kyllingefosterfibroblastceller (CEF-celler)) mellem hidtil ukendte isolater og specifikke antisera dannet i specifikke pathogenfrie høns (SPF)-høns.

Betydningen af vaccination mod de hidtil ukendte serotype IBV-stammer D 274, 249 G og D 1466 illustreres af den store udbredelse af disse serotyper i hønse-markisolater.

I tabel 3 er anført det relative antal flokke med antistoffer mod de hidtil ukendte serotype IB-vira (3A) og den hyppighed, hvormed IB-vira af de respektive serotyper blev isoleret fra flokkene (3b).

- 5 De omhandlede hidtil ukendte vira er karakteriseret ved følgende egenskaber, som gør det muligt at identificere dem som fjerkræ-coronavira:
  1. De er i besiddelse af nucleinsyren af RNA-typen; viruskopiering i kulturer af hønsefosternyreceller (CEK) blev
   
10 ikke signifikant påvirket af tilsætning af 5-fluordesoxyuridin til dyrkningsvæsken.
  2. Viraene er følsomme overfor fedtopløsningsmidler; behandling med chloroform af infektiøs fosterhinde-allantoinfluidum (AAF) opnået ved formering af viraene i SPF-
   
15 ægfostre resulterede i en signifikant formindskelse af infektivitetstiteren. Dette er typisk for indesluttede vira indeholdende essentielle lipider, hvilket også er en egenskab ved fjerkræ-coronavira.
  3. Undersøgelse med elektromikroskop af viruspræparater fremstillet ved koncentreret af inficeret AAF i en ultracentrifuge viste viruspartikler af størrelse og facon, der
   
20 er karakteristisk for coronavira, og med typiske fremspring (længde på 15-20 nm) på overfladen. Diameteren af partiklerne uden fremspring var 75-120 nm.
  4. Ved anvendelse af et geldiffusionsforsøg blev det påvist,
   
25 at viraene indeholder antigen, som de har til fælles med kendte fjerkræ-coronavira, f.eks. IBV-referencestamme Baudette. Ingen antigener til fælles med andre fjerkrævira kunne imidlertid påvises. Specifikke antisera fremstillet mod de omhandlede hidtil ukendte stammer i SPF-
   
30 høns reagerede ikke med antigener fremstillet ud fra an-

dre fjerkrævira end fjerkræ-coronavirus.

5. De omhandlede hidtil ukendte virusstammer formerer sig i inficerede cellers cytoplasma. Egnede in vitro systemer er:

- 5       \* SPF-æg på fosterstadiet (fortrinsvis inficeret ad allantoinevejen;
- \* kultur af trachealorgan;
- \* hønseceller og
- \* hønsefosterceller (fortrinsvis CEK-celler).

10       De ovenstående data er tilstrækkelige til at identificere disse hidtil ukendte vira som henhørende til fjerkræ-coronaviraene og til at adskille dem fra andre fjerkrævira, f.eks. fjerkræ-influenzavira, Newcastle disease-virus (NDV), REV-virus, dvs. reticulo-endotheliosisvirus, adenovirus, leucose-

15       virus, reticuloendotheliosis-virus, fjerkræ-encephalomyelitisvirus, herpesvira inklusive infektiøs laryngotracheitisvirus, Marek's sygdomsvirus, due- og kalkun-herpesvira og infektiøs bursal sygdomsvirus.

20

Viruset kan dyrkes i embryoniske SPF-hønseæg eller i en cellekultur, fortrinsvis fra fjerkrævæv.

Hvis levende, svækket vaccine skal fremstilles, kan svækkelsen foretages ved tilpasning af virusisolaterne til embryoniske æg eller en cellekultur (fortrinsvis CEK-celler) og overførsel af viruset blandt sådanne kulturer, f.eks.

25       10-200 gange. En alternativ metode til fremstilling af en sikker, levende vaccine består i at udvælge og dyrke egnede kloner af et fjerkræ-coronavirus, forudsat at de stadig har

30       evnen til spontan agglutinerings.

Til fremstilling af en inaktiveret vaccine ud fra de omhandlede hidtil ukendte vira kan AAF eller vævskulturvæsken inaktiveres ved hjælp af f.eks. formaldehyd eller  $\beta$ -propionolacton.

- 5 Efter inaktivering og om nødvendigt indstilling af pH-værdien samt neutralisation af det inaktiverende middel kan det inaktiverede antigen blandes med et hjælpestof. Hjælpestoffet kan f.eks. være aluminiumhydroxid eller et materiale bestående af mineralolie (f.eks. "Marcol"<sup>®</sup> 82) eller en planteolie  
 10 og en eller flere emulgatorer, såsom "Tween"<sup>®</sup> 80 og "Span"<sup>®</sup> 80.

Levende vacciner kan administreres som øjendråber, næsedråber, drikkevand eller ved hjælp af spraymetoder i en alder varierende fra 1 dag gamle til læggetidspunktet (ca. 18 uger).

- 15 Inaktiverede vacciner vil sædvanligvis blive administreret i en alder på 10-20 uger ved hjælp af subcutan eller intramuskulær injektion.

- I tilfælde af levende vacciner kan der anvendes en dosis i intervallet fra log 3 til log 7 EID<sub>50</sub> pr. fugl, fortrinsvis  
 20 mellem log 4 og log 5 EID<sub>50</sub>.

Inaktiverede vacciner kan indeholde det antigeniske ækvivalent fra log 5 til log 8 EID<sub>50</sub> pr. fugledosis, fortrinsvis mellem log 6 og log 8 EID<sub>50</sub>.

- 25 Hvis vaccinen (levende eller inaktiveret) indeholder mere end én coronavirusstamme, bør hver stamme være til stede i de nævnte dosismængder.

Kombination af en eller flere af de omhandlede fjerkræcoronavira med en eller flere ubeslægtede fjerkrævira, såsom f.eks. NDV, infektiøs bursal sygdomsvirus (Infectious Bursal

Disease Virus), EDS 76 virus (ægtabssyndrom 76-virus), Adeno-  
eller Reo-vira, især i inaktiverede vacciner, kan også fore-  
tages.

5

10

15

20

25

30

35

Tabel 1

| Virus ↓     | Serum → I. 97 | I 609 | Connecticut | Florida | JMK   | 3896  | 207   | 212   | H52 (Mass) | 3128 | 274   | 1466  |
|-------------|---------------|-------|-------------|---------|-------|-------|-------|-------|------------|------|-------|-------|
| J 97        | ≥ 6,2         | 0,7   | 1,2         | 1,4     | 0,7   | 1,7   | 0     | 0     | 0,7        |      | ≤ 1,5 | ≤ 1,9 |
| J 609       | ≤ 2,9         | 4,9   | ≤ 2,9       | ≤ 2,9   | ≤ 2,9 | 3,6   | ≤ 2,9 | ≤ 2,9 | 5,1        |      | ≤ 2,8 | ≤ 2,8 |
| Connecticut | 2,1           | 2,1   | ≥ 6,8       | 6,1     | 1,8   | 3,6   | 1,6   | ≤ 1,2 | 4,1        |      | ≤ 2,5 | ≤ 2,6 |
| Florida     | 0,6           | 1,3   | 3,4         | ≥ 4,2   | 0,5   | 2,6   | 1,0   | 0     | 1,3        |      | 3,0   | ≤ 2,3 |
| JMK         | 2,8           | 1,5   | 1,4         | 2,3     | ≥ 6,3 | 2,8   | 1,3   | 1,0   | 1,2        |      |       |       |
| D-3896      | ≤ 0,8         | 0,9   | 1,5         | 1,5     | ≤ 0,8 | ≥ 6,6 | 1,9   | ≤ 0,3 | ≤ 0,7      | 3,2  |       |       |
| D-207       | 0,5           | 0     | 0,4         | 0,5     | ≤ 0,3 | 2,6   | ≥ 5,3 | 1,3   | 1,4        | 1,4  |       |       |
| D-212       | 0             | 1,2   | 1,0         | 1,0     | 0,3   | 2,3   | 0,5   | 5,3   | 0,5        | 1,4  |       |       |
| H52         | 1,6           | 2,8   | 1,8         | 2,8     | 1,1   | 1,8   | 1,1   | 1,1   | ≥ 5,3      |      |       |       |
| D-274       | 2,2           | 2,7   | 4,9         | 3,7     | 2,8   | 4,2   | 5,0   | ≤ 1,5 | ≥ 1,6      | 3,4  | ≥ 5,9 | 3,5   |
| D-1466      | ND            | ND    | ND          | ND      | ND    | 1,8   | 1,2   | ≥ 4,9 | 0,5        |      |       |       |
| D-3128      | ND            | ND    | ND          | ND      | ND    | 1,5   | 0     | 0     | 0          | 6,4  |       |       |
| D-752       |               |       |             |         |       | 1,9   | 1,5   | 1,3   | 1,5        | 1,9  | 2,0   | 3,9   |

Tabel 2

|    | Anti-<br>serum<br>Virus-<br>stamme | Massachusetts | D-207 | D-212 | Connecticut |
|----|------------------------------------|---------------|-------|-------|-------------|
|    |                                    |               |       |       |             |
| 5  | M41 (Mass)                         | ++            | -     | -     | -           |
|    | D-274                              | -             | ++    | -     | -           |
|    | 249 G                              | -             | ++    | -     | -           |
|    | 246 G                              | ++            | -     | -     | -           |
|    | D-212                              | -             | -     | ++    | -           |
| 10 | D-580                              | -             | -     | -     | ++          |
|    | Connecticut                        | -             | -     | -     | ++          |

++ = en specifik antiserum, der fortyndet i forholdet 1:16 forårsager en fuldstændig formindskelse på  $\pm 40$  plaques  $\approx$

- = det samme antiserum forårsager ikke en signifikant formindskelse af plaqueoptællingen.

Tabel 3

|    |                                  |                                                                 |       |       |
|----|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------|-------|
|    |                                  | Procent af flokke med antistof mod en eller flere nye serotyper |       |       |
|    | A                                | D 207                                                           | D 212 |       |
| 20 | Serologi                         |                                                                 |       |       |
|    | 197 målte flokke                 | 61%                                                             | 32%   |       |
|    |                                  | Antal klassificerede isolater                                   |       |       |
|    | B                                | Mass <sup>*</sup>                                               | D 207 | D 212 |
| 25 | Virusisolationer ud af 52 flokke | 9 <sup>*</sup>                                                  | 29    | 4     |

\* Ingen differentiering foretaget fra H-vaccinestammer.

Tabel 3 viser, at flokkene også inficeres i betydelig grad med vira af serotyperne D 207 og D 212.

A viser procentdelene af flokke med cirkulerende antistoffer mod nævnte serotyper.

5 B viser antallet af virusisolater fra 52 flokke, som blev klassificeret som D 207 eller D 212 serotypeisolater.

Det kan på baggrund heraf konkluderes, at infektion af høns med IB-vira af nævnte serotyper udgør et problem.

10

Opfindelsen illustreres ved hjælp af de følgende eksempler.

#### Eksempel I

##### Isolation af infektiøse bronkitisvira

Isolationer blev foretaget med flokke af avlshøns og læggehøns under anvendelse af følgende procedure:

15

Tracheale vatpindsprøver og/eller tarmafskrabninger fra det caecale område blev suspenderet i tryptosephosphat-kødsuppe indeholdende antibiotika.

20

Mindst ti 9-11 dage gamle SPF hønseæg på fosterstadiet blev podet med hver af virusprøvesuspensionerne via allantoinevejen.

48-72 timer efter podning blev allantoinvæske og CAM (chorioallantoinmembran) høstet fra fire af de ti podede æg med henblik på yderligere overførsel til SPF-æg. Mindst tre rækker blindoverførsler blev udført for hver prøve. De resterende æg fra hver overførsel (sædvanligvis seks ud af ti) blev inkuberet i 7 dage, og det endnu levende foster blev undersøgt for væksthæmning og skader, der er typiske for IB.

25

#### Eksempel II

##### Levende vacciner

##### A. Virusets formering

SPF-hønseæg på fosterstadiet (inkuberet 10-11 dage) podes med log 3 til log 4 af den 50% æginfektøse dosis (EID<sub>50</sub>) af podedeviruset i allantoinhulheden. Æggene blev gennemlyst 18-24 timer p.i., og uspecifikt døde fostre, dvs. fostre, der ikke døde som følge af virusreplikation, bortkastes. Efter en inkubationstid på 18-72 timer (afhængigt af den benyttede virusstamme) høstes AAF, klares ved centrifugering og/eller filtrering og blandes til slut med en passende koncentration af antibiotika (når det er tilrådeligt).

35

B. Fremstilling af vaccinen

AAF-mængden kan derpå oparbejdes til et farmaceutisk præparat ved hjælp af i og for sig kendte metoder. Stabilisering kan udføres ved tilsætning af et passende stabiliseringsmiddel, såsom et carbohydrat som sorbitol eller mannitol, eller et protein, såsom albumin eller casein, eller passende blandinger. Hovedmængden af AAF kan nedfryses til temperaturer under  $-35^{\circ}\text{C}$  og lagres indtil yderligere behandling. Alternativt lagres hovedmængden ved  $+4^{\circ}\text{C}$  indtil yderligere behandling. Prøver udtages til bestemmelse af virusindholdet. Stabiliseret AAF (efter optøning, i tilfælde af at materialet blev frosset) fyldes på lyofiliseringsglas i mængder på 1-2 ml. Virusindholdet indstilles på en sådan måde, at titeren efter frysetørring er mindst 4,0 log EID<sub>50</sub> pr. fugledosis.

Glassene lukkes derefter under vakuum eller under nitrogen efter frysetørring.

Eksempel IIIInaktiveret vaccine20 A. Fremstilling af viruset

Viruset formeres som beskrevet under IIA. Lagring af hovedmængden før inaktivering og yderligere oparbejdning kan foretages ved temperaturer under  $-35^{\circ}\text{C}$ .

B. Inaktivering af viruset

25 Den frosne AAF optøes, en prøve udtages til bestemmelse af virustiteren (EID<sub>50</sub>), og AAF-mængden inaktiveres ved tilsætning af formalin til en slutkoncentration på 0,4%. Efter 24 timer ved stuetemperatur kan formalinen neutraliseres med natriummetabisulfit. En prøve afprøves for  
30 inaktivering ved podning i følsomme SPF-hønsefostre eller

eller på CEF-kulturer med mindst én overførsel. Alternative metoder til inaktivering er brugen af  $\beta$ -propiolacton, ethylen-imin eller derivater deraf.

- 5 Den inaktiverede AAF fortyndes eller koncentrerer afhængigt af titerbehovet. Koncentrering kan også foretages forud for inaktivering. Egnede metoder er ultrafiltrering eller koncentrering ved hjælp af polyethylenglycoludfældning.

Inaktiveret AAF kan lagres ved  $+4^{\circ}\text{C}$ .

#### C. Fremstilling af vaccine

- 10 Til fremstilling af en inaktiveret olieemulsionsvaccine sættes "Tween" <sup>®</sup> 80 til den inaktiverede antigensuspension til en koncentration på 3,5%. Antigenindholdet indstilles til mindst 7,0 log EID<sub>50</sub> pr. fugledosis. Den antigeniske masse eller mængde kan bestemmes ved hjælp af
- 15 en enzymimmunoprøve. Suspensionen emulgeres derpå i hjælpestoffets oliefase i forholdet olie til vand på 70:30 eller 55:45. Hjælpestoffets sammensætning er:

|    |                          |       |
|----|--------------------------|-------|
|    | "Marcol" <sup>®</sup> 52 | 90%   |
|    | "Tween" <sup>®</sup> 80  | 3,5%  |
| 20 | "Span" <sup>®</sup> 80   | 6,5%. |

Den vandige fases gennemsnitlige partikelstørrelse er mindre end 1,0  $\mu\text{m}$ .

#### Eksempel IV

##### Kombineret vaccine

- 25 A. Kombineret levende vaccine

Til fremstilling af en levende kombineret vaccine skal AAF indeholdende de forskellige virusstammer (fremstillet ifølge eksempel II) kombineres på en sådan måde, at det krævede mindste virusindhold for hver enkelt stamme opnås

i slutproduktet.

B. Kombineret inaktiveret vaccine

Virusstammerne formeres i overensstemmelse med eksempel IIA og lagres ved  $-35^{\circ}\text{C}$ .

5 De respektive virusstammers antigener inaktiveres i overensstemmelse med eksempel IIIB og lagres ved  $+4^{\circ}\text{C}$ .

"Tween" <sup>®</sup> 80 sættes til de respektive antigensuspensioner til en koncentration på 3,5%. Det antigeniske indhold af hver enkelt virussuspension indstilles således, at hver  
10 stamme er indeholdt i en fugledosis af vaccinen med et antigenisk ækvivalent på mindst 7,0 log EID<sub>50</sub>. Den polyvalente vaccine emulgeres som beskrevet i eksempel IIIC. Den vandige fase kan enten blandes før emulgering, eller også kan de enkelte antigener emulgeres separat forud for  
15 blanding.

Eksempel V

Hæmagglutinerings af hønseerythrocyter

To volumener inficeret AAF (fremstillet ifølge eksempel IA) eller den oven på inficerede vævskulturer svømmende væske  
20 blev blandet med 1 volumen 2% hønseerythrocytsuspension ved stuetemperatur.

Agglutinerings følger inden for ca. 2 min., lejlighedsvis inden for 5 min. Hæmagglutinerings kan fremskyndes ved inkubering ved  $+4^{\circ}\text{C}$ .

25 Hæmagglutininets er knyttet til viruspartiklerne, således som det kan påvises ved hjælp af bromelianbehandling.

Eksempel VIHæmagglutineringsinhibering (H1)

5 A. Hvorvidt hæmagglutineringen af hønseerythrocyter forårsaget af de hidtil ukendte IBV-stammer er specifik og skyldes virusantigenet kan påvises ved inhibering af hæmagglutineringsreaktionen ved tilsætning af specifikke antisera overfor det pågældende virus forud for tilsætning af erythrocyterne.

10 SPF-æg blev podet med den hæmagglutinerende stamme D 274 48 timer efter podning, inkuberet, og AAF blev høstet.

Den ubehandlede AAF blev benyttet som sådan eller fortyndet 1:1 med serum eller antiserum. Derefter blev hønseerythrocyter tilsat. Resultaterne er anført i den efterfølgende tabel.

15

Tabel 4

20

| Tilsætninger                             | H A +/- |
|------------------------------------------|---------|
| Ubehandlet AAF                           | +       |
| AAF + SPF hønse serum                    | +       |
| AAF + specifikt IBV-antiserum (type 207) | -       |
| AAF + specifikt NDV*-antiserum           | +       |

\* NDV = Newcastle disease-virus.

25 Tabel 4 viser, at den hæmagglutinerende egenskab forårsages af IB-viruset og ikke af bestanddele i SPF-æg, der anvendes til inkubation af D 274-stammen, eller af en eventuel kontaminering med et Newcastle-sygdomsvirus. HA-aktiviteten af D 274 kunne inhiberes med specifikt antiserum, der er dannet mod D 274-viruset. Dette virus er af 207 serotypen.

B. Eftersom de hidtil ukendte IB-vira bærer hæmagglutinin (som vist ved hjælp af bromlianbehandling) og henhører til forskellige serotyper, kan HI-prøven også benyttes til at skelne mellem de hidtil ukendte vira.

5

Den benyttede metode er beskrevet af D.J. Alexander et al. Avian Pathology 5, 125-134 (1976)). Phospholipase C har været benyttet til behandling af de respektive antigener.

10

Den således opnåede titer er udtrykt som 2 log. Datoen er anført i den efterfølgende tabel.

Tabel 5

15

20

| Serum<br>↓  | Antigen fra IBV<br>(serotype) → | M41<br>(Mass) | D274<br>(207) | D1466<br>(212) |
|-------------|---------------------------------|---------------|---------------|----------------|
|             |                                 |               |               |                |
| H52 (Mass)  |                                 | 9             | 6             | 5              |
| 207         |                                 | 6             | 10            | 5              |
| 212         |                                 | 5             | 5             | 8              |
| 246G (Mass) |                                 | 10            | 5             | n.d.           |

25

Tabel 5 viser ved hjælp af graden af krydsreaktion, at D 274 er af D 207-serotypen, at D 1466 er af D 212-serotypen, og at de ikke kan klassificeres i en anden serotype.

#### Eksempel VII

#### Vaccinationsforsøg med SPF-høns

30

#### A. Formering af vira og fremstilling af vacciner

35

Vira af stammerne D 207 (ikke-hæmagglutinerende (HA-)) og D 274 (hæmagglutinerende (HA+)) blev dyrket på SPF-æg og svækket under henholdsvis 54 og 52 ægoverførsler. Vacciner af disse svækkede virusstammer blev fremstillet ifølge eksempel III.

B. Vaccination

To grupper, hver på 10 SPF-høns, der var 6 uger gamle, blev vaccineret ved øjendrypning med 4,0 log EID<sub>50</sub> af de ovennævnte respektive vacciner. Høns blev huset i isolationsrum og tappet til serumafprøvning med ugentlige mellemrum. Disse seras HI-titer blev bestemt i overensstemmelse med metoden beskrevet i eksempel VIB under anvendelse antigen fremstillet ud fra IBV D 274. Resultaterne anført i den følgende tabel viser udviklingen af immuniseringen overfor D 274-antigener i løbet af 12 uger i de to grupper af vaccinerede høns. En kontrol med uvaccinerede høns blev medtaget ved prøven.

Tabel 6

| Vaccine   | Uger efter vaccination |     |     |     |     |      |     |      |      |     |     |     |
|-----------|------------------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|------|-----|-----|-----|
|           | 0                      | 1   | 2   | 3   | 4   | 6    | 7   | 8    | 9    | 10  | 11  | 12  |
| 207 (HA-) | 4,0                    | 5,4 | 6,2 | 5,9 | 6,6 | 4,8  | 4,2 | 5,5  | 5,8  | 5,2 | 4,1 | 5,2 |
| 274 (HA+) | 4,7                    | 7,5 | 8,2 | 8,7 | 8,2 | 10,0 | 9,3 | 10,0 | 10,1 | 9,5 | 8,8 | 9,3 |
| Ingen     | ← < 5 →                |     |     |     |     |      |     |      |      |     |     |     |

I seraene fra de samme to grupper vaccinerede høns undersøges den neutraliserende reaktion (> 4,0 log) overfor den homologe stamme D 274 (52. overførsel). Antallet af dyr (ud af ti vaccinerede), der udviser en reaktion, er anført i den følgende tabel.

Tabel 7

| Uger efter vaccination | Vaccinegruppe |           |
|------------------------|---------------|-----------|
|                        | 207 (HA-)     | 274 (HA+) |
| 3                      | 7/10*         | 9/10*     |
| 12                     | 5/10          | 9/10      |

\*Antallet af dyr, der udviser en reaktion, ud af ti vaccinerede.

C. Smitteforsøg

Tolv uger efter vaccination blev den vaccinerede og en ikke-vaccineret gruppe rugehøns udsat for en smittende infektion med 4,0 log EID<sub>50</sub> af stamme D 274 (efter 52 overførsler). Fire dage efter smitte blev trachealsnit fra fugle fremstillet med henblik på histologisk undersøgelse ved hjælp af immunofluorescens (IFT) under anvendelse af standardteknik. Antallet af fugle (ud af ti vaccinerede), der udviste mikroskopiske skader eller positiv IFT, er anført i den efterfølgende tabel.

Tabel 8

| Vaccine   | Mikroskopiske skader | IFT positiv |
|-----------|----------------------|-------------|
| 207 (HA-) | 6/10*                | 2/10        |
| 274 (HA+) | 0/10                 | 0/10        |
| Ingen     | 10/10                | 6/10        |

\*Antallet af dyr, der udviser en reaktion, ud af ti vaccinerede. Det kan konkluderes, at en vaccine fremstillet ud fra den hidtil ukendte hæmagglutinerende stamme D 274 frembringer store mængder HI og neutraliserer antistoftiters så tidligt som en uge efter vaccination, idet den i en kendt mængde vedvarer at være beskyttende i mindst tolv uger efter vaccination. Dette kunne bekræftes af en 100% beskyttelse af D 274-gruppen mod smitte.

I modsætning hertil fremkaldte den ikke-hæmagglutinerende stamme D 207 af den samme serotype kun små mængder HI-antistof i løbet af forsøgstiden. Endvidere var den neutraliserende antistoftiter signifikant lavere sammenlignet med den med hæmagglutinerende stamme D 274 vaccinerede gruppe tolv uger efter vaccination, hvilket bekræfter den signifikant mindre beskyttelsesgrad (kun ca. 50%) i D 207-gruppen.

Eksempel VIIIVaccination med kombineret levende vaccineA. Formering af vira og fremstilling af vacciner

5 Vira af de hæmagglutinerende stammer D 274 og D 1466 blev  
formeret i overensstemmelse med metoden beskrevet i eksem-  
pel IA og monovalente og polyvalente vacciner af disse  
blev fremstillet i overensstemmelse med eksemplerne hen-  
holdsvis IIB og IVA med 4,0 log EID<sub>50</sub> af hver stamme.

10

B. Vaccination

Fire grupper, hver af ti uger gamle SPF-høns, blev huset  
i fire separate isolationsrum. Hønsene blev vaccineret  
15 ved hjælp af øjendrypning. Gruppen A blev vaccineret med  
stamme D 274-vaccine, gruppe B med D 1466-vaccine, gruppe  
C med den kombinerede vaccine, og gruppen D var en ikke-  
vaccineret kontrolgruppe.

20

C. Afprøvning af immunicering

Blod blev opsamlet på vaccinationsdagen og 2, 4, 6 og 8  
uger senere. Sera blev afprøvet individuelt for homolog  
og heterolog HI-antistofreaktion under anvendelse af anti-  
gener fremstillet med forskellige prototype-stammer (M41,  
25 D 274 og D 1466). Resultaterne er anført i tabel 9.

30

35

Tabel 9

| Gruppe,<br>vacciner<br>↓ | Ag type | Uger efter vaccination |      |       |  |     |      |       |  |      |       |       |  |
|--------------------------|---------|------------------------|------|-------|--|-----|------|-------|--|------|-------|-------|--|
|                          |         | 0                      |      |       |  | 2   |      |       |  | 4    |       |       |  |
|                          |         | M41                    | D274 | D1466 |  | M41 | D274 | D1466 |  | M41  | D274  | D1466 |  |
| A) D 274                 |         | 3,6                    | 4,0  | 3,5   |  | 9,4 | 9,8  | 8,0   |  | 6,8  | ≥10,1 | 5,9   |  |
| B) D 1466                |         | 3,4                    | 3,7  | 3,2   |  | 7,0 | 5,8  | 7,3   |  | 5,2  | 5,1   | 7,2   |  |
| C) D274 + D1466          |         | 3,4                    | 3,9  | 3,4   |  | 7,8 | 8,0  | 7,3   |  | 6,6  | ≥9,0  | 7,3   |  |
| D) Ingen                 |         | 3,3                    | 3,8  | 3,3   |  | 4,8 | 4,0  | 3,8   |  | ≤3,7 | ≤3,9  | 4,1   |  |
|                          |         |                        |      |       |  |     |      |       |  | 5,2  | ≥10,0 | 4,4   |  |
|                          |         |                        |      |       |  |     |      |       |  | 4,1  | 4,4   | 6,8   |  |
|                          |         |                        |      |       |  |     |      |       |  | 5,2  | ≥8,4  | 6,4   |  |
|                          |         |                        |      |       |  |     |      |       |  | ≤3,0 | ≤3,6  | ≤3,5  |  |
|                          |         |                        |      |       |  |     |      |       |  | 4,4  | ≥10,3 | 3,1   |  |
|                          |         |                        |      |       |  |     |      |       |  | 4,1  | 5,1   | 6,3   |  |
|                          |         |                        |      |       |  |     |      |       |  | 5,7  | 9,0   | 6,5   |  |
|                          |         |                        |      |       |  |     |      |       |  | ≤3,2 | 4,2   | ≤3,0  |  |

De D 274-vaccinerede høns (gruppe A) reagerer med høje niveauer af homologe HI-antistoffer fra to uger indtil slutningen af forsøget. På tidspunkterne 2 og 4 uger p.v. iagttoges en signifikant krydsreaktion mod de heterologe antigener M41 og D1466, der forsvinder mellem 6-8 uger. Hønsene i gruppe B udviste en lignende reaktion ved et lavere titer-niveau. De homologe reaktioner forbliver på et beskyttende niveau indtil i det mindste afslutningen af forsøgene (8 uger efter vaccination. Den kombinerede vaccine (gruppe C) fremkaldte i lang tid vedvarende høje niveauer af HI-antistoffer mod begge vaccinstammer. En udtalt heterolog reaktion på M41-antigenet kan også ses på tidspunkterne 2 og 4 uger p.v. Den tidlige heterologe reaktion kan måske forklares ved en større mængde immunoglobuliner, der reagerer på de gruppespecifikke antigener. Det fremgår af dette forsøg, at de to hæmagglutinerende stammer D274 og D1466 udviser deres immunogene virkningsevne i både enkelte og kombinerede levende vacciner.

#### Eksempel IX

#### 20 Vaccinationsforsøg i marken

##### A. Virusformering og vaccinefremstilling

Levende vacciner af de ikke-hæmagglutinerende virusstammer H 120 og D 207 og af den hæmagglutinerende stamme D 274 blev fremstillet som beskrevet i eksempel VIIA.

##### 25 B. Vaccination

Flokke af hvide italienerhøns og brune høns blev vaccineret en dag gamle med H 120 vaccine. I en alder af ti uger blev de hvide italienerhøns og de brune høns vaccineret med vacciner af henholdsvis D 207 og D 274. Dosen var 4,5 log EID<sub>50</sub> pr. fugl. Den gennemsnitlige flokstørrelse var 15.000 fugle, og vaccinen blev administreret som spray (knapsack-sprøjteapparat).

C. Blodopsamling

På dagen for vaccination med D 207 og D 274 vaccinerne blev 24 blodprøver taget pr. flok med henblik på serologisk undersøgelse, og dette blev gentaget fire uger efter vaccination.

D. Immuniseringskontrol

Neutralisationsindekset (NI) blev benyttet som parameter for beskyttelse. Et middelstort NI på mere end 4 log overfor den respektive serotype blev betraget som havende forbindelse med effektiv vaccination.

Tabel 10

| Vaccinestamme | Antal flokke (gennemsnitlig størrelse 15.000 fugle) |                            |                                |                                  |
|---------------|-----------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
|               | Vaccine rede                                        | Pos.* på vaccinationsdagen | Pos.* 4 uger efter vaccination | Stigning i reaktion i flokke i % |
| D 207 (HA-)   | 10                                                  | 4                          | 6                              | 40% → 60%                        |
| D 274 (HA+)   | 20                                                  | 4                          | 18                             | 20% → 90%                        |

\* pos. = middelstort NI  $\geq$  4 log overfor serotype D 207.

I tabellen vises, at procentdelen af flokke, der reagerer med en neutraliserende reaktion, som vides at være beskyttende, er signifikant højere i D 274-gruppen sammenlignet med D 207-vaccinegruppen.

Eksempel XUdvikling og fordeling af HI-antistoftitære under vaccinationsforsøg i marken

5 Serologisk reaktion i lægge- og avlsflokke efter vaccination med den hæmagglutinerende vaccinstamme D-274 er blevet målt.

10 Ialt 137 flokke med en gennemsnitlig størrelse på 15.000 fugle blev vaccineret i en alder af 10-12 uger med en enkelt dosis levende D-274 vaccine (serotype D-207) ved hjælp af knapsack-sprayadministration.

15 Vaccination af Massachusetts-type var blevet udført med de samme daggamle flokke (H 120) og i en alder på ca. 15 uger (H 52). Alle flokke blev prøvet for HI-antistoffer mod de respektive serotyper Massachusetts, D-207 og D-212 i en alder af 18-20 uger.

20 Fordelingsmønsteret for HI-titære er vist i fig. 1. 16 ud af de 137 flokke blev fulgt indtil en alder af 38 uger, og HI-titære blev målt med 4 ugers mellemrum. Resultater er anført i fig. 2. Af de 137 flokke udviste 86% HI-titære > 7, 63% > 8 og 25% > 9 overfor serotypen D-207. Reaktionen overfor Massachusetts-serotypen - efter to vaccinationer med ikke-hæmagglutinerende stammer - var lavere: 66% af flokkene havde HI-titære < 7. Reaktionen overfor D-212 serotype (ingen vaccination) var som forventet endnu lavere: 25 82% af flokkene havde en HI-titer < 7.

30 Fra den langvarige undersøgelse (fig. 2) kan det også konkluderes, at HI-titære opnået efter en enkelt vaccination med stammen D-274 er konsekvent højere sammenlignet med de, der fremkaldes af to vaccinationer med konventionelle Massachusetts-vacciner.

Eksempel XIHæmagglutinerings af hønseerythrocyter (RBC's)

Den spontane hæmagglutinerende virkning af de omhandlede IBV-stammer som vist ved det hurtige plade-HA-forsøg, der  
 5 blev benyttet i eksemplerne V og VI, blev også undersøgt på en mere kvantitativ m de ved hjælp af et langsomt HA-forsøg i mikrotiterplader, i hvilke spontan hæmagglutinerings ikke udvises konsekvent.

Eftersom differentiering mellem hæmagglutinerende og ikke-hæmagglutinerende stammer ved det kvantitative langsomme HA-forsøg i mikrotiterplader er ønskelig, benyttedes koncentreret og delvis rensede virussuspensioner til påvisning af HA-aktiviteten.

A. Fremstilling af virussuspensioner

15 Allantoinv skeh stninger fra 10 dage gamle  g på fosterstadiet blev opsamlet 24-48 timer efter podning (p.i.). AAF-mængden blev klaret ved centrifugering i 10 min. ved 1000 x g.

20 Virusindholdet i 35 ml AAF blev pelletteret under anvendelse af SW-28 rotor (Beckman) ved 30.000 x g i 60 min.

Den således opnåede pellet blev resuspenderet i 1 ml PBS (phosphatpufferet saltvand).

B. Undersøgelse af hæmagglutinerings

25 Dobbelte seriefortyndinger af virussuspensionerne blev fremstillet i mikrotiterplader. 25  l RBC (1%) blev sat til 50  l slutvolumener af virusfortyndinger. Pladerne blev afl st efter inkubation i 2-18 timer ved 4 C.

Titere udtrykkes som den reciprokke værdi af den højeste fortynding, der udviser mere end 75% agglutinerings (n =

antal forsøg).

Resultaterne er sammenfattet i tabel 11.

Tabel 11

| 5  | Stamme     | HA før<br>koncentrering | HA efter 35-dobbelt konc. |          |
|----|------------|-------------------------|---------------------------|----------|
|    |            |                         | Geometrisk middel         | Interval |
| 10 | AAF (neg.) | - (n = 1)               | - (n = 2)                 | -        |
|    | M41        | - (n = 4)               | - (n = 3)                 | -        |
|    | D274       | - (n = 5)               | 3 (n = 6)                 | 2-8      |
|    | 246G       | - (n = 5)               | 3 (n = 5)                 | 2-8      |
|    | D-1466     | - (n = 3)               | 4 (n = 5)                 | 2-8      |

De tre spontant hæmagglutinerende stammer D-274, 246G og D-1466, der her er afprøvet, udviser alle HA-titere mellem 2 og 8 efter et 35-dobbelt koncentreringstrin, medens ikke-inficeret AAF (negativ kontrol) og den ikke-hæmagglutinerende referencestamme M41 forblev negativ efter den samme behandling.

Disse forsøg viser, at både med de langsomme og hurtige plade-HA-prøver kan hæmagglutineringsreaktion fremkaldt af de hidtil ukendte IBV-stammer findes. Koncentreringstrinnene anvendes rutinemæssigt til koncentrering og delvis rensning af IBV-partikler. Dette viser, at HA-egenskaberne ved de beskrevne stammer er knyttet til viruspartiklerne.

## P a t e n t k r a v .

-----

1. Mikrobiologisk ren kultur af en infektiøs bronkitisvirus-  
5 stamme, k e n d e t e g n e t ved, at den spontant hægagglu-  
tinerer hønseerythrocyter.

2. Mikrobiologisk ren kultur ifølge krav 1, k e n d e -  
t e g n e t ved, at den omfatter en infektiøs bronkitisvirus-  
10 stamme, som er deponeret hos the Central Veterinary Labora-  
tory, New Haw at Weybridge, U.K., og registreret under numrene  
VLO 10110/AVI/3; VLO 10110/AVI/4; VLO 10110/AVI/5; VLO 10110/  
AVI/6 og VLO 10110/AVI/7, og som er deponeret hos Institut  
Pasteur, registreret under numrene henholdsvis I-216, I-217,  
15 I-218, I-215 og I-214.

20

25

30

35

Fig. 1: Fordeling af HI-antistoftitære mod tre IB-serotyper efter vaccination med levende D-274 vaccine

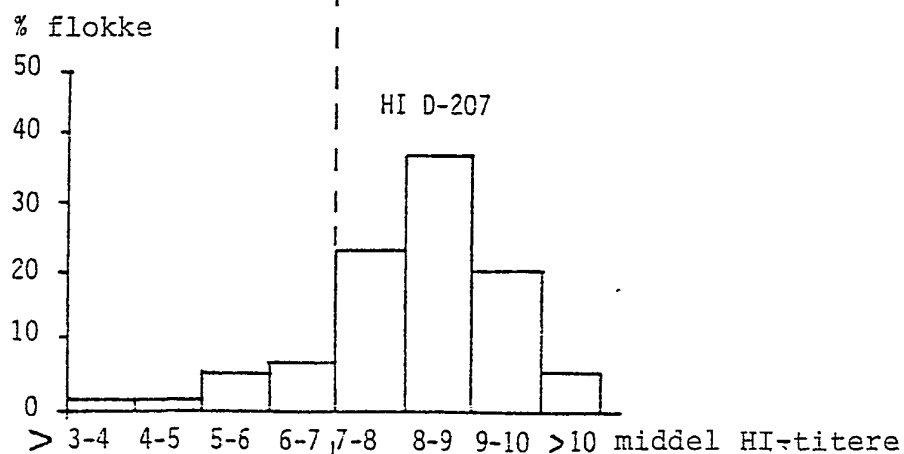
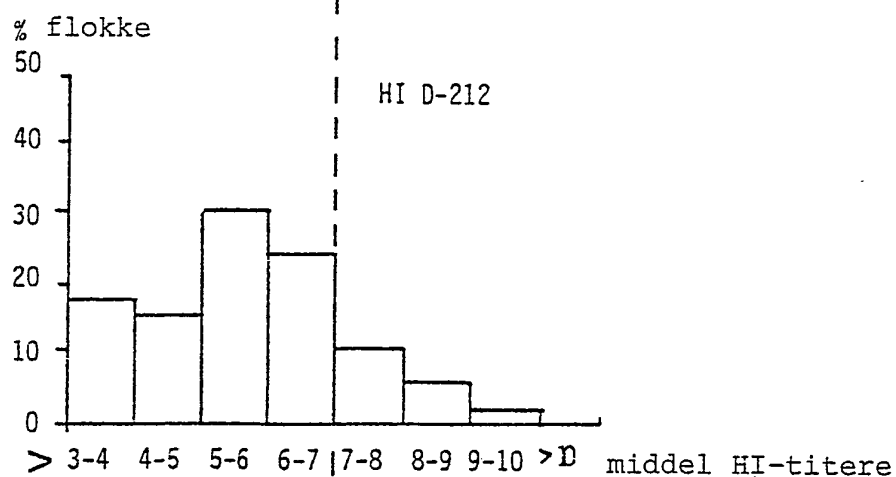
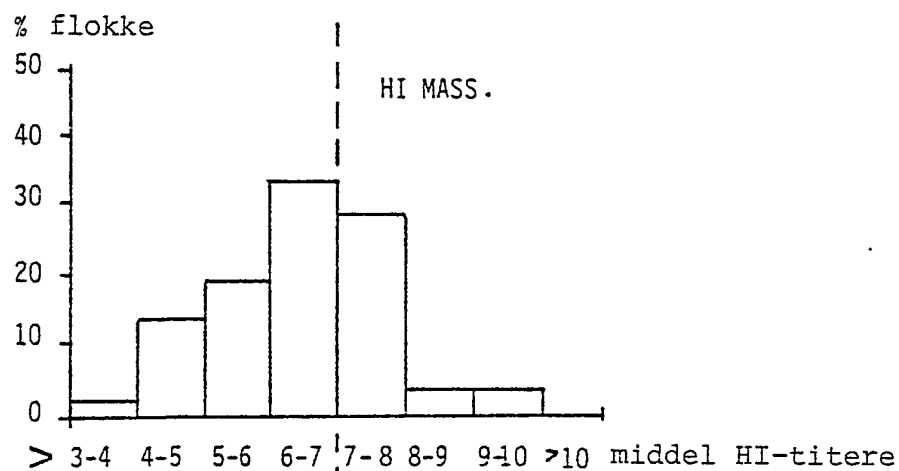


Fig. 2: Langvarig undersøgelse af HI-titrene hos 16 flokke, der 1 dag gamle blev vaccineret med H120, 16 uger gamle blev vaccineret med H52 (begge Massachusetts-type) og 12 uger gamle blev vaccineret med D274.

