

①9



Octrooiraad
Nederland

①1 192087

①2 C OCTROOI

②1 Aanvraag om octrooi: 7811230

⑤1 Int.Cl.⁶
A61K39/012, A23K1/18

②2 Ingediend: 14.11.78

③0 Voorrang:
14.11.77 GB 0047335/77

④3 Ter inzage gelegd:
16.05.79 I.E. 79/11

④4 Openbaargemaakt:
01.10.96 I.E. 96/10

④7 Dagtekening:
04.02.97

④5 Uitgegeven:
01.04.97 I.E. 97/04

⑦3 Octrooihouder(s):
Unilever N.V. te Rotterdam.

⑦2 Uitvinder(s):
P.J. Davis te Felmersham(GB)

⑦4 Gemachtigde:
Drs. J. van der Toorren c.s. te 3130 AC
Vlaardingen.

⑤4 Bestrijding van coccidiosis.

Bestrijding van coccidiosis

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een voeder voor pluimvee met een vochtgehalte van 6 tot 12 gew.% en op een werkwijze ter bereiding van zo'n voeder voor pluimvee. Een vochtgehalte van 6 tot 12 gew.% is gebruikelijk voor pluimveevoeder.

Coccidiale infecties komen voor bij alle pluimveesoorten die door de mens worden geteeld. Dergelijke infecties zijn in het bijzonder lastig wanneer zij voorkomen bij groepen dieren die met de moderne intensieve pluimveeteeltmethoden worden gefokt. Een infectie kan zich dan snel door de gehele groep verspreiden, en in het allergunstigste geval een slechte groei veroorzaken. ernstige infectie kan tot sterfte onder de vogels leiden. Al vele jaren heeft men zich dan ook aanzienlijke inspanningen getroost om betrouwbare voorbehoedsmaatregelen tegen zulke infecties te vinden, en in het bijzonder om middelen te vinden waardoor pluimvee doeltreffend immuun kan worden gemaakt tegen het optreden van zulke infecties. Het praktische nut van elke doeltreffende immunuseermethode is daarin gelegen, dat de door latere coccidiale infecties veroorzaakte negatieve effecten op de groei daardoor zullen worden tegengegaan en voortijdige sterfte wordt voorkomen.

Men heeft reeds vastgesteld, dat pluimvee dat infectie door coccidiosis heeft overleefd, een zekere mate van immuniteit tegen verdere infectie behoudt. Van dit effect heeft men op praktische wijze gebruik gemaakt bij een werkwijze als beschreven in Amerikaans Octrooischrift No. 3.147.186, waarin bij pluimvee een subklinische infectie wordt teweeggebracht door toediening van een enkel oraal entmedium, dat 100-800 levende, in sporenvorm aanwezige coccidia-oöcysten per vogel bevat. De aldus ontstane infectie, nog versterkt door secundaire en tertiaire infectiecycli, welk veroorzaakt worden wanneer de vogels nog meer levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten oppikken, die afkomstig zijn uit de uitwerpselen van de geïnfecteerde vogels, verleent immuniteit aan de groep als geheel. De doeltreffendheid van deze methode wordt nog verhoogd indien aan het pluimvee een anticoccidiaal geneesmiddel op subcuratief niveau wordt toegediend, waardoor de pathogene effecten van de coccidia worden verminderd, maar deze organismen toch nog in staat worden gesteld levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten te produceren, welke door andere dieren uit de groep kunnen worden opgenomen. Een vloeibaar entmedium van levende, in sporenvorm aanwezige coccidia-oöcysten voor orale toediening aan pluimvee is in de handel verkrijgbaar. Hoewel de toepassing hiervan ongetwijfeld een doeltreffende methode is voor het verlenen van immuniteit aan pluimvee, heeft zij het nadeel dat het gevaar bestaat dat, bij ondeskundige toepassing per abuis een overdosis aan oöcysten aan de dieren wordt toegediend, hetgeen een ernstige en wellicht zelfs fatale infectie tot gevolg kan hebben.

In een bepaalde uitvoering van de in Amerikaans octrooischrift 3.147.186 beschreven werkwijze vindt de orale toediening van een entmedium van oöcysten plaats via het drinkwater of het voeder dat aan het pluimvee wordt verstrekt. Een overwegend nadeel bij het toedienen van het entmedium aan het voer is, dat een natte substantie wordt verkregen die slecht houdbaar is door infecties van schimmels en bacteriën.

Aanvraagster meent ook, dat er nog altijd behoefte is aan een methode voor het immuniseren van pluimvee die de pluimveehouder geen extra taken of verantwoordelijkheden oplegt en die het potentiële risico van overdoses vermindert. Volgens de uitvinding is nu verrassenderwijs gevonden, dat pluimvee doeltreffend tegen coccidiosis kan worden geïmmuniseerd, door toediening van voeder met het gebruikelijke vochtgehalte van 6 tot 12 gew.% waarin een kleine hoeveelheid levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten van een of meer coccidia, waarvoor het pluimvee gevoelig is, aanwezig is, waarbij dit voedsel geruime tijd kan worden bewaard zonder dat de immuniserende werking sterk achteruit gaat. Het is verrassend dat veevoerders die 6-12 gew.% water bevatten gebruikt kunnen worden omdat nu gebleken is dat er geen uitdroging van de oöcysten optreedt ondanks het lage watergehalte in tegenstelling tot wat in de relevante vakliteratuur wordt gesuggereerd.

Voor dit doel wordt volgens de uitvinding een voeder voor pluimvee verschaft, met een vochtgehalte van 6 tot 12 gew.%, met het kenmerk, dat het per kg voedingsstoffen 10 tot 10.000 levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten bevat van ten minste één soort coccidia waarvoor het pluimvee gevoelig is. Tevens verschaft de uitvinding een werkwijze ter bereiding van een voeder voor pluimvee zoals beschreven in de vorige alinea, met het kenmerk, dat voederstoffen worden gemengd met een voormengsel, dat een dragermateriaal omvat, waarin levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten van ten minste één soort coccidia waarvoor het pluimvee gevoelig is, verdeeld zijn. Een geschikt dragermateriaal is een waterig concentraat, dat tevens één of meer eetbare verdikkingsmiddelen bevat. Een geschikt eetbaar verdikkingsmiddel is een in koud water oplosbaar polysaccharide, in het bijzonder natriumcarboxymethylcellulose.

De uitvinding verschaft ook een werkwijze ter bereiding van een voeder voor pluimvee zoals hiervoor beschreven, met het kenmerk, dat voederstoffen in de vorm van brokjes of korreltjes (met een verlaagd

vochtgehalte) worden besproeid met een waterig concentraat, dat levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten bevat van ten minste één soort coccidia waarvoor het pluimvee gevoelig is.

Door het pluimvee een bepaalde hoeveelheid oöcysten toe te dienen in het gewone voeder, stelt men het pluimvee in staat zichzelf in te enten in een door de pluimveehouder geregelde en steeds toenemende mate. De dagelijks op te nemen hoeveelheid oöcysten wordt bepaald door de hoeveelheid voeder die door elk dier wordt opgegeten, en de hoeveelheid oöcysten in het voeder kan worden geregeld door de veevoederfabrikant, wiens moderne kwaliteitscontrolefaciliteiten kunnen waarborgen dat er geen gevaar voor overdosering ontstaat. Bovendien is het mogelijk, doordat de oöcysten in het normale voedingspakket van de dieren zijn opgenomen, ervoor te zorgen dat de kuikens reeds geschikte hoeveelheden oöcysten gaan consumeren zodra zij vast voedsel beginnen op te nemen. Het immuniseerproces kan dus beginnen in de eerste levensfase na het uitbroeden. Alle hoeveelheden oöcysten die in deze beschrijving worden genoemd, dienen te worden verstaan als berekend over elke afzonderlijke coccidia-soort die aanwezig is.

Bij voorkeur bevat het pluimveevoeder volgende de uitvinding niet meer dan ongeveer 2.500 levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten per kg. Het biedt beslist voordelen om de in sporenvorm aanwezige oöcysten toe te voegen aan het voeder van een bepaalde vogel in elk stadium van diens leven na het verlaten van het ei. Het verdient daarbij de voorkeur dat de vogel gevoederd wordt met een voeder dat kleine hoeveelheden in sporenvorm aanwezige oöcysten bevat, zodra het dier is uitgebroed en voeder tot zich begint te nemen. Naarmate het dier groeit, neemt zijn dagelijkse behoefte aan voedsel aanzienlijk toe. Nemen wij de gewone huiskip (*Gallus domesticus*) als voorbeeld, dan blijkt, dat het kuiken in het begin ongeveer 2 g voeder per dag opneemt. Na 10 dagen is dit opgelopen tot ca. 10 g per dag, en na 30 dagen gebruikt het dier misschien wel 80 g per dag. Ook de gewenste samenstelling van het voeder van het dier verandert gedurende de groei en in de handel zijn pluimveevoerders verkrijgbaar met verschillende samenstellingen die speciaal bestemd zijn voor de verschillende ontwikkelingsfasen van het dier. Er zijn bijvoorbeeld voeders die speciaal zijn bedoeld voor kuikens, of voor opgroeiende dieren of voor volwassen broed- en legkippen. Teneinde ervoor te zorgen dat in elke fase van zijn ontwikkeling het dier een geschikt aantal sporenvormige coccidia-oöcysten per dag consumeert, kan het doelmatig zijn dat de verschillende voeders ook verschillende hoeveelheden oöcysten per kg bevatten.

Aanvraagster is van mening, dat het voor het bereiken van een optimale immunisering nodig is, dat een pas uitgebroed kuiken ongeveer 1 tot 20 levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten per dag gebruikt. Tijdens de eerste 10 dagen van de groei dient deze hoeveelheid te stijgen tot 2 tot 50 oöcysten per dag. Tegen de 30ste dag dient de per dag geconsumeerde hoeveelheid oöcysten van de orde van circa 5 tot 200 te zijn.

Bij voorkeur bevat een voeder voor jonge kuikens van 500–5000 levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten per kg, en in het ideale geval niet meer dan 2000 per kg.

In een voeder voor opgroeiende kippen bedraagt de hoeveelheid levende, in sporenvorm oöcysten van 50–2000 per kg en een ideale hoeveelheid bedraagt niet meer dan 500 per kg.

In een voeder voor broed- of legkippen bedraagt een geschikte hoeveelheid aan levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten van 10–1000 per kg en ideaal is hoeveelheid van niet groter dan 100 per kg.

De levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten kunnen worden verkregen door opzettelijk infecteren van een groep vogels, en het verzamelen van de oöcysten uit hun excrementen. Methoden voor het verkrijgen van levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten van coccidia zijn uit de literatuur bekend en maken dus geen deel uit van de onderhavige uitvinding. Eén van de geschikte werkwijzen wordt uitvoerig beschreven in Amerikaans Octrooischrift No. 3.147.186.

De oöcysten kunnen direct tijdens het mengen van het pluimveevoeder worden toegevoegd, of kunnen worden toegevoegd via een vóórmengsel. Desgewenst kan ook een suspensie van de oöcysten, bij voorkeur een waterige suspensie, op het pluimveevoeder worden versproeid. Dit laatste is in het bijzonder nuttig wanneer een voeder in de vorm van brokjes of korrels wordt gewenst, omdat de oöcysten pas mogen worden toegevoegd nadat alle stadia van de fabricage van het voeder waarbij hitte wordt toegepast, voltooid zijn. De oöcysten worden heel snel door verwarming of verhitting gedood, en bij de gebruikelijke methode voor de vervaardiging van brokjes zouden eventueel aanwezige oöcysten in het tot brokjes omgevormde mengsel worden vernietigd. Als gevolg van de hittegevoeligheid van de oöcysten mag een voeder volgens de uitvinding tijdens de opslag ook niet aan extreme temperaturen worden blootgesteld. Bovendien worden de oöcysten ook beschadigd wanneer zij uitdrogen en om deze reden mag men het voer dan ook nooit volkomen laten uitdrogen. Het vochniveau in het voeder dient binnen de grenzen van 6 tot 12 gew.% te blijven.

Volgens de uitvinding kan men voeder voor pluimvee bereiden door toepassing van een geheel of grotendeels vast, vrijvloeiend vóórmengsel, dat levende, in sporenvorm aanwezige coccidia-oöcysten,

- verdeeld over een drager, bevat, en dat als droog product kan worden toegevoegd aan een pluimvee-voedermengsel, of dat met water kan worden aangemaakt tot een pasta of brij, welke dan door mengen of versproeien in een pluimveevoeder kan worden opgenomen. Bij voorkeur wordt als drager een eetbaar verdikkingsmiddel bij aanwezigheid van water toegepast, zoals een colloïde-vormende stof, hoewel men ook stoffen kan toepassen die gelen vormen. Een geschikt verdikkingsmiddel is zetmeel, zoals aardappelmeel, tarwezetmeel of maïszetmeel. Zetmeel heeft echter het nadeel dat het niet zo gemakkelijk mengbaar is met water, en de toepassing hiervan dus kan leiden tot betrekkelijk klonterige pasta's. Een verdikkingsmiddel dat méér de voorkeur heeft is een in koud water oplosbaar polysaccharide, zoals alkylcellulose, een carboxyalkylcellulose of een hydroxyalkylcellulose. De meeste voorkeur heeft natriumcarboxymethylcellulose.
- Desgewenst kunnen ook gommen, zoals johannesbroodpitmeel, guar gom en tragacanth worden gebruikt. Desgewenst kunnen ook mengsels van enkele van deze verdikkingsmiddelen worden toegepast. Het aantal in sporenvorm aanwezige oöcysten dat in het voormengsel wordt opgenomen is afhankelijk van het aantal dat per gewichtseenheid van het pluimveevoeder vereist is, alsmede van de gewenste of toegestane hoeveelheid van de drager in het pluimveevoeder. Een voormengsel dat volgens de uitvinding kan worden toegepast bevat ten minste 1000 in sporenvorm aanwezige oöcysten per kg, de ideale hoeveelheid bedraagt ten minste 10.000 per kg. Een gebruikelijk voormengsel kan 50.000–500.000 in sporenvorm aanwezige oöcysten per kg bevatten. Een maximum hoeveelheid is niet gemakkelijk aan te geven: een voormengsel dat meer dan een miljoen in sporenvorm aanwezige oöcysten per kg bevat zou nuttig kunnen zijn in die gevallen, waarin wel een hoog oöcysten-gehalte in het voeder nodig is, maar waarin de hoeveelheid dragermateriaal tot een minimum beperkt moet blijven. Het zal duidelijk zijn, dat voormengsels van het zojuist beschreven type ook kunnen worden toegepast voor de opname in het pluimveevoeder van andere essentiële sporen-ingrediënten, zoals bijvoorbeeld minerale toevoegsels, vitaminen, aminozuren, zoals lysine, en carotenoïde-pigmenten, die gewoonlijk worden toegepast om de kleur van de eierdooiers te beïnvloeden. Voor het behoud van de levensvatbaarheid van de oöcysten dient het voormengsel een vochtgehalte te bezitten binnen de grenzen van 6 tot 12 gewichtsprocent. Voorts heeft de uitvinding betrekking op het toevoegen van een waterig concentraat, dat levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten bevat tijdens de bereiding van pluimveevoerders. Bij voorkeur bevat het waterige concentraat de oöcysten in suspensie. Om bezinken van de oöcysten tegen te gaan verdient het de voorkeur, dat het waterige concentraat tevens een of meer eetbare verdikkingsmiddelen bevat van de types die zojuist beschreven werden in verband met het vaste, vrij-vloeiende voormengsel. Ook hier gelden dezelfde voorkeuren voor in koud water oplosbare polysacchariden in het algemeen, en natriumcarboxymethylcellulose in het bijzonder. In dit geval echter zijn slechts kleine hoeveelheden van dergelijke stoffen vereist. De viscositeit ervan mag niet zodanig worden verhoogd dat het concentraat onschenkbaar of onsproeibaar wordt. De optimale hoeveelheid voor het verdikkingsmiddel ligt meestal binnen 0,1 tot 10 gew.% van het waterige concentraat. De hoeveelheden oöcysten in het waterige concentraat worden bepaald door dezelfde overwegingen als die welke eerder in deze beschrijving werden genoemd in verband met het praktisch vaste voormengsel: geheel, vergelijkbare gehalten zijn dus geschikt.

- Een voordeel van een waterig oöcysten-concentraat dat een eetbaar verdikkingsmiddel bevat, zoals een in koud water oplosbaar polysaccharide, is, dat het verdikkingsmiddel water bindt. Wanneer het waterige concentraat bij de fabricage van het pluimveevoeder wordt gemengd met droge ingrediënten, verhindert het binden van het water door het verdikkingsmiddel een snelle absorptie van het water in het voeder en dit draagt ertoe bij dat de oöcysten gelijkmatig door de hele massa van het voeder worden verdeeld. Als het water te snel geabsorbeerd wordt, is het mogelijk dat een plaatselijke concentratie van oöcysten te hoog wordt en daardoor de oöcysten inhomogeen in het voeder worden verdeeld, wat nadelig voor de werking zou zijn.

- Afgezien van het opnemen in het pluimveevoeder van de levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten is het bij het praktisch toepassen van de uitvinding niet van essentieel belang, dat de samenstelling of fysische vorm van het pluimveevoeder op enigerlei wijze wordt gewijzigd. Alle thans in de handel zijnde, gestandaardiseerde pluimveevoedermengsels, kunnen worden toegepast, en het voedingsmateriaal in het voeder kan derhalve alle eiwit-, koolhydraat- en vetbestanddelen bevatten die normaal in dergelijke voeders worden aangetroffen.

- De uitvinding zal nu, enkel bij wijze van voorbeeld, worden beschreven met betrekking tot het bedwingen van infecties bij de gewone kip (*Gallus domesticus*), veroorzaakt door *Eimeria tenella*, welke een van de minst immunogene van alle coccidium soorten is, en stellig een van de meest pathogene en virulente.
- Hieruit volgt logischerwijze, dat elke methode, die aantoonbaar doeltreffend is bij het bedwingen van infecties door *Eimeria tenella*, ten minste even doeltreffend is tegen de minder hardnekkige coccidia.

De begeleidende tekeningen figuren 1-3 hebben betrekking op Voorbeeld 1.

Figuur 1 is een grafiek, die de aantallen oöcysten weergeeft welke opgenomen en afgescheiden zijn door vogels, die met een immuniserend voederdieet volgens de uitvinding zijn gevoerd;

lijn A geeft het aantal opgenomen oöcysten aan dat per dag door elke kip tijdens werd geconsumeerd tot

5 aan de 34ste dag en na de 34ste dag werden geen oöcysten met het voeder meer toegediend;

lijn B geeft de gemiddelde dagelijkse opbrengst aan uitgescheiden oöcysten ($\times 10^6$ per dag) weer van elke kip die het oöcysten-bevattende poeder had gebruikt.

Figuur 2 is een grafiek, waarin het percentage gewichtstoename van twee groepen vogels wordt vergeleken, volgende op een krachtige aanval met levende, coccidiale oöcysten, waarbij één groep vogels
10 was geïmmuniseerd volgens de uitvinding. De lijnen C en D geven het gemiddelde percentage van respectievelijk de geïmmuniseerde en de controlekippen weer na de aanval met de oöcysten.

Figuur 3 geeft een paar blokdiagrammen weer, waarin de symptomen (uitgedrukt in afgescheiden bloederige excrementen) worden vergeleken, die de twee groepen vogels vertonen, waarvan het percentage gewichtstoename werd vergeleken in figuur 2.

15

Voorbeeld 1

(1) Behandeling van de vogels

Pas-uitgebroede Cobb-slachtkuikens werden verkregen van een commerciële kippenfokkerij, en onmiddellijk op willekeurige wijze in groepen van zes verdeeld. Groepen waarvan de oöcysten-productie
20 moest worden gecontroleerd, werden in kooien gehouden welke voorzien waren van een vloer van open metaalgaas, door de mazen waarvan de excrementen konden vallen, terwijl andere, die bestemd waren om de doeltreffendheid van het oöcysten-bevattende voeder aan te tonen, gehouden werden op stro. De behuizing waarin alle kuikens waren ondergebracht, was grondig behandeld om er zeker van te zijn, dat zij vrij was van achtergebleven oöcysten.

25 (2) Oöcysten

Oöcysten werden verkregen door drie weken oude Cobb-slachtkuikens oraal te infecteren met een dosis van 5000 oöcysten per kuiken. Hun excrementen werden opgevangen op de 6e, 7e en 8e dag na de infectie, gemengd met ongeveer tweemaal hun volume aan 2,5% waterige kaliumdichromaat-oplossing en daarna gehomogeniseerd, waarbij een gladde brij werd verkregen. Deze brij werd gezeefd door een nylon
30 zeef met een zodanige maaswijdte dat de oöcysten er door heen kunnen en de oöcysten werden als volgt uit het filtraat verwijderd. Eerst werden de oöcysten afgecentrifugeerd bij 1000 g gedurende 15 minuten, waarna het sediment opnieuw werd gesuspenderd in een verzadigde waterige natriumchloride-oplossing, waarin de oöcysten blijven drijven. Deze suspensie werd gecentrifugeerd bij 500 g gedurende 10 minuten, en de daarbij overblijvende oöcysten-suspensie werd afgetapt en verdund met 10 volumedelen gedestilleerd
35 water. Door centrifugereren bij 1000 g gedurende 15 minuten werden de oöcysten tot vaste brokjes gevormd. De bewerking werd herhaald, en de daarbij verkregen oöcysten-brokjes werden tenslotte opgenomen in een 2,5% waterige oplossing van kaliumdichromaat (zoals bekend uit het Amerikaanse octrooischrift 3.174.186, kolom 9). De oöcysten liet men sporuleren door deze suspensie vier dagen continu bij 28°C te beluchten, zoals beschreven in Amerikaans octrooischrift 3.174.186, kolom 11/12. Als voorraad-suspensie werden deze
40 gesporuleerde oöcysten op een temperatuur van 4°C gehouden, in een met fosfaat gebufferde zoutoplossing, bekend als standaard PBS (= Phosphate Buffered Saline). Deze was bereid door 85 gram natriumchloride, 10,7 gram dinatrium-waterstof-orthofosfaat (watervrij) en 3,9 gram natrium-diwaterstof-orthofosfaat (dihydraat) op te lossen om ongeveer 9 liter gedestilleerd of gede-ioniseerd water en de pH in de stellen op 7,1 door geleidelijke toevoeging van 1M zoutzuur (HCl) of 1M natronloog (NaOH), voor zover nodig. Daarna
45 werd aangevuld tot een volume van 10 liter met gedestilleerd of gede-ioniseerd water.

(3) Bereiding van het oöcysten-bevattende voeder

Een aantal kippen werd geïmmuniseerd door een continue toevoer van geringe aantallen oöcysten, toegevoegd aan het voeder. Deze werden toegevoegd in een hoeveelheid van ongeveer 1,3 per gram meel. Om te zorgen voor een gelijkmatiger spreiding door het gehele voeder en een aanvullen mechanische
50 beschermingsmethode te verschaffen werden de oöcysten eerst gesuspenderd in een zetmeelpasta, welke vervolgens met het meel werd gemengd in de kom van een Hobart snij-/mengapparaat. De pasta werd bereid door een gladde, dikke suspensie te maken uit 300 g tarwemeel met 1000 ml koud water. Deze pasta werd 30 minuten gestoomd en toen gekoeld. Daarna werden aan een portie van 125 ml van deze pasta 6000 gesporuleerde oöcysten toegevoegd, waarna deze portie werd gemengd met 4500 g meel.
55 Kippen werden ad libitum tot aan de 34ste dag met dit voeder gevoerd en de hoeveelheid oöcysten die zij opnamen werd berekend op grond van de hoeveelheid water die zij hadden verbruikt. In de lijn A van figuur 1 is het gemiddelde aantal met het voeder opgenomen oöcysten per dag en per dier aangegeven. De

controle-kippen kregen met hun voeder geen oöcysten toegediend.

(4) Levensvatbaarheid van de oöcysten

De levensvatbaarheid van de oöcysten in het voeder werd met tussenpozen van veertien dagen gecontroleerd door het voederdieet te voeren aan nieuwe, voor besmetting gevoelige kippen en dan in hun excrementen de aanwezigheid van oöcysten vast te stellen op de 6e tot 11e dag na het begin van het voederen met oöcysten.

(5) Beoordeling van infecties

De effecten van de immuniserende infecties werden nagegaan aan de hand van het dagelijks gemiddeld per dier afgescheiden aantal oöcysten dat is aangegeven met de lijn B in figuur 1, de snelheid van de gewichtstoename en de eventuele aanwezigheid van bloed in de excrementen. De dieren werden gewogen met tussenpozen van een week gedurende de immuniseringsperiode, doch frequenter nadat de "aanval" met de oöcysten had plaatsgevonden. Uit het gewicht van de dieren werd het percentage gewichtstoename sinds het begin van de immunisering door de toediening van oöcysten in het voeder berekend. Het gemiddelde percentage gewichtstoename van de geïmmuniseerde kippen en de controle-kippen na de aanval met de oöcysten wordt weergegeven door de lijnen C en D in figuur 2.

Wanneer in de excrementen bloed werd aangetroffen, werd een ruwe beoordeling gemaakt op basis van het aantal vers bloed bevattende excrementen dat kon worden opgemerkt. Een cijferbeoordeling van 0-4 werd gebruikt, nl. van 0 (afwezig) via 2 (vaak voorkomend) tot 4 (gelijkmatig verspreid). De aldus verkregen resultaten zijn weergegeven in figuur 3.

(6) Continue immunisering via de voederopname

Deze proef werd opgezet om vast te stellen of in sporenvorm aanwezige oöcysten, toegevoegd aan het voeder in zeer geringe aantallen, konden blijven leven en nauwkeurig geregelde, subklinische infecties konden veroorzaken bij voeding aan vatbare kippen. De immunisatiebehandeling duurde 34 dagen, en werd vervolgens getest door middel van een krachtige aanval met 500.000 oöcysten. Dit werd bereikt door volgens standaardmethoden bereide infectieuze oöcysten te suspenderen in water of PBS (zie (2) hiervoor). Het gebruikte volume was zodanig berekend dat 1 ml, of een vergelijkbare maar gedefinieerde dosis, het benodigde aantal oöcysten zou bevatten, dat voor de aanval nodig was. Iedere dosis van gesuspenderde oöcysten werd opgezogen in een plastic injectiespuit voor eenmalig gebruik, die verbonden was met een zacht, smal plastic buisje van 10 cm lengte. De dosis werd toegediend aan de te behandelen vogel via de standaardmethode van krop intubatie. Hierbij werd het aangehechte buisje voorzichtig door de mond direct in de krop gebracht. Daarna werden de oöcysten uit de injectiespuit in de krop gedrukt, waardoor een precieze toediening werd bereikt zonder pijn voor de vogel.

Hiervoor werd drie groepen, elk van zes kippen, gebruikt. De eerste en tweede groep ontvingen het oöcysten-bevattende dieet vanaf het moment dat zij één dag oud waren en de derde groep kreeg een normaal dieet dat geen oöcysten bevatte. Teneinde de minst gunstige condities na te bootsen welke waarschijnlijk in bedrijfssituaties zullen optreden, werden de groepen 1 en 3 op een dikke laag stro gehouden.

Groep 2 werd op metaalgaas gehouden, zodat het aantal oöcysten dat dagelijks met de excrementen werd uitgescheiden gemakkelijk kon worden bepaald.

(7) Resultaten

De oöcysten bleven in het voeder leven gedurende het experiment. In de excrementen werden oöcysten uitgescheiden vanaf de 8ste dag, zoals blijkt uit figuur 1. Ook toen het dieet werd gevoerd aan nieuwe, vatbare kippen, werden grote aantallen oöcysten uitgescheiden op de 6e tot 11e dag na de toevoeging van de doses. Uit het patroon van de oöcysten-afscheiding was duidelijk, dat zich al spoedig nadat de kippen 3 weken oud waren, een aanzienlijke immuniteit begon te ontwikkelen, want een toch optredende snel stijgende oöcysten-afscheiding tot een zeer hoog aantal werd direct tot staan gebracht en teruggebracht tot een veel geringere afscheiding tegen de 25ste dag van de proef. De aanval op de 34ste dag met 500.000 oöcysten leverde slechts een onbeduidende piek van oöcysten-afscheiding rond de 42ste dag op. De hobbel bij dag 32-36 werd veroorzaakt door de uitbarsting rond dag 24.

De immuniserende oöcysten brachten geen waameembare pathogene effecten teweeg, ondanks het feit dat de kippen van groep 1 op stro werden gehouden en talrijke verse oöcysten konden hebben opgepikt. Gedurende de gehele immuniseringsperiode werden geen bloederige excrementen gezien, doch, wat belangrijker is, de gemiddelde gewichtstoename van de niet-geïmmuniseerde controlegroep en de geïmmuniseerde groep was statistisch gelijk tot aan de dag van de aanval.

De aanval met 500.000 oöcysten op de 34ste dag veroorzaakte ernstige ziekte in de controlegroep, zoals men kan zien aan de statistisch significante verschillen in gewichtstoename en de cijfers voor bloederige excrementen, weergegeven in resp. figuren 2 en 3. Er trad echter geen sterfte op. De kippen uit de

geïmmuniseerde groep bleven echter volkomen onaangetast.

(8) Gevolgtrekkingen

- De belangrijkste gevolgtrekkingen uit deze resultaten zijn, dat oöcysten, die op deze wijze aan het voederdieet zijn toegevoegd, ten minste één maand in leven blijven en dat zij, toegediend in deze vorm, een sterke immuniteit kunnen teweegbrengen zonder pathogene effecten te veroorzaken.

Het is duidelijk, dat de verse oöcysten, die met de excrementen in het stalstro werden gedeponeerd, geen gevaar vormden. De condities waaronder de kippen werden gehouden, waren erop gericht een maximale gelegenheid te geven tot herinfectie, maar omdat elke kip in haar voeder een vaste dosis oöcysten ontving, had zich reeds een doeltreffende, zo niet duurzame, immuniteit ontwikkeld voordat op uitgebreide schaal sporenvorming kon optreden, die leidde tot uitscheiding van de oöcysten.

Omdat de oöcysten waren toegevoegd aan het voeder, werden zij constant opgenomen, zonder dat er enigerlei extra behandeling nodig was. Een onvermijdelijk gevolg van deze wijze van toedienen is, dat de dieren een gestadig toenemende dosis oöcysten ontvangen naarmate hun voedselopname toeneemt. Omdat bij de groei van de kip de voedselopname toeneemt, kan na enige tijd voeder met een wat lager gehalte aan oöcysten worden toegepast. Het is van belang dat de oöcysten gelijkmatig door het voeder zijn verdeeld. Bij ongelijkmatige verdeling zou het gevaar bestaan van een overdosering doordat een kip een portie voeder met een overmatig hoog gehalte aan oöcysten zou kunnen opnemen. De controlekippen werden door de aanval ernstig getroffen, maar over het geheel genomen maakten zij het toch beter dan verwacht was. Dit was vrijwel zeker het gevolg van het feit, dat oöcysten niet volledig waren uitgestoten uit hun milieu. Aangezien de condities waaronder zij werden gehouden niet gericht waren op het geheel voorkomen van infectie, is het mogelijk dat de kippen enige lichte weerstand hadden ontwikkeld.

De geïmmuniseerde kippen waren tegen de tijd dat het voederen met het oöcysten-bevattende voeder werd gestaakt, nl. op de 34ste dag, in staat een zware infectie met oöcysten zonder schadelijke gevolgen te weerstaan.

Voorbeeld II

Een waterig concentraat werd bereid door ongeveer 6000 levende, in sporenvorm aanwezige Eimeria tenella oöcysten, verkregen op de in Voorbeeld I beschreven wijze, op te nemen in 100 ml fysiologische zoutoplossing (0,85 gew.% natriumchloride in water), waarin 2,5 g natriumcarboxymethylcellulose was opgelost. Dit concentraat werd gemengd met 4500 g van een genormaliseerd, in de handel verkrijgbaar pluimveemeel. Voor dit mengen werd een Hobart snij-/mengapparaat gebruikt waarbij het concentraat in de kom van de roterende menger, die het meel bevatte, werd uitgeschonken, waarna het mengen werd voortgezet tot een op het oog homogeen product verkregen was. Gewone kippen, die vanaf het uitbroeden met dit voeder waren gefokt, vertoonden dezelfde goede immuniteit tegen een infectie-aanval met E. tenella als de geïmmuniseerde kuikens uit Voorbeeld I.

Conclusies

1. Voeder voor pluimvee met een vochtgehalte van 6 tot 12 gew.%, met het kenmerk, dat het per kg voedingsstoffen 10 tot 10.000 levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten bevat van ten minste één soort coccidia waarvoor het pluimvee gevoelig is.
2. Werkwijze ter bereiding van een voeder voor pluimvee zoals beschreven in conclusie 1, met het kenmerk, dat voederstoffen worden gemengd met een voormengsel, dat een dragermateriaal omvat, waarin levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten van ten minste één soort coccidia waarvoor het pluimvee gevoelig is, verdeeld zijn.
3. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat het dragermateriaal een waterig concentraat is, dat tevens één of meer eetbare verdikkingsmiddelen bevat.
4. Werkwijze volgens conclusie 3, met het kenmerk, dat als eetbaar verdikkingsmiddel een in koud water oplosbaar polysaccharide, in het bijzonder natriumcarboxymethylcellulose, wordt toegepast.
5. Werkwijze ter bereiding van een voeder voor pluimvee zoals beschreven in conclusie 1, met het

kenmerk, dat voederstoffen in de vorm van brokjes of korreltjes (met een verlaagd vochtgehalte) worden besproeid met een waterig concentraat, dat levende, in sporenvorm aanwezige oöcysten bevat van ten minste één soort coccidia waarvoor het pluimvee gevoelig is.

Hierbij 2 bladen tekening

Fig. 1.

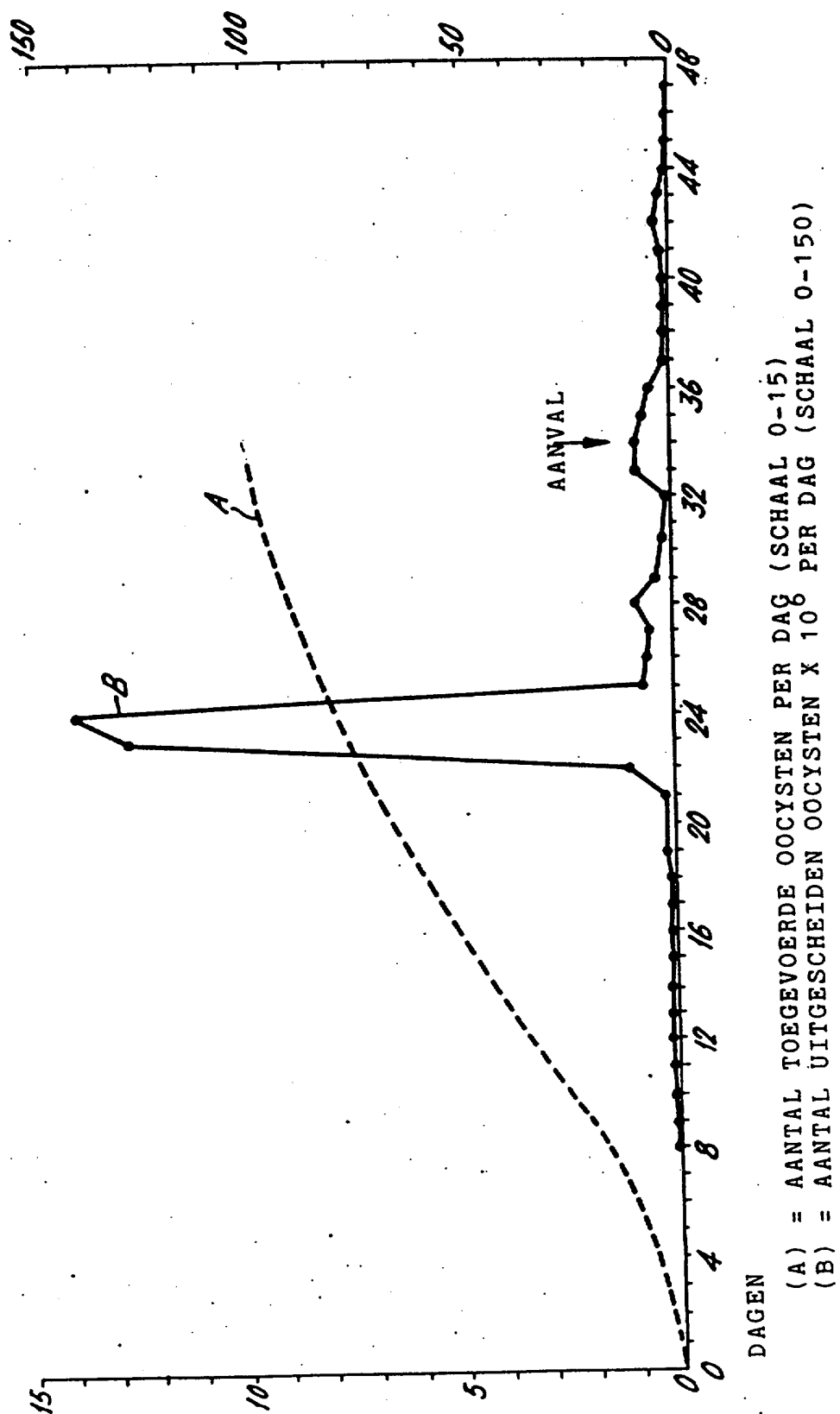


Fig. 2.

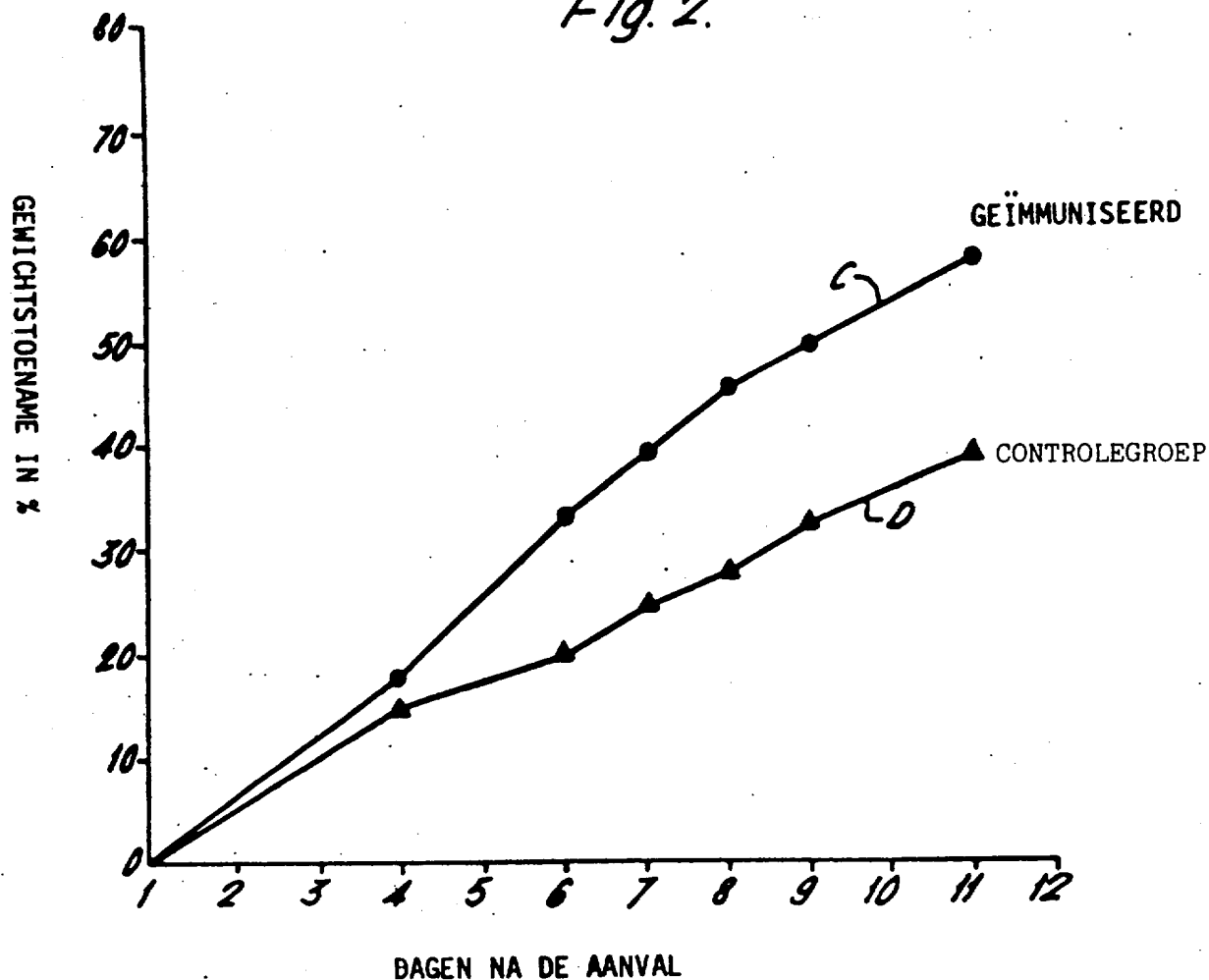


Fig. 3.

