



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **264 336 A3**4(51) **A 61 K 39/108**
C 12 N 1/20**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

(21)	WP A 61 K / 279 135 0	(22)	30.07.85	(45)	01.02.89
(71)	VEB Impfstoffwerk Dessau – Tornau, Jahnstraße 8, Dessau, 4500, DD				
(72)	Michael, Margot, VR Dr. med. vet.; Schöll, Wolfram, VR Dr. med. vet.; Klie, Helma, Dipl.-Biol.; Kludas, Karl-Heinz, Dipl.-Chem.; Urbaneck, Dieter, OVR Prof. Dr. sc., DD				
(54)	Verfahren zur Herstellung von Pilus-Impfstoffen				

(57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Pilus-Impfstoffherstellung mit E. coli-Bakterien. Die so hergestellten Impfstoffe dienen der Prophylaxe von Infektionskrankheiten des Digestionstraktes, die durch E. coli-Stämme bedingt sind, deren pathogene Wirkung wesentlich auf Anheftungsmechanismen beruht. Ziel und Aufgabe der Erfindung ist ein ökonomisches Verfahren zur Herstellung von gut verträglichen und wirksamen Vakzinen, die von sonstigen Antigenstrukturen der Erreger unabhängig wirken und beim Einsatz einer geringen Biomasse einen gleich guten oder besseren Antikörpertiter bzw. Impfschutz bewirken als aufwendiger hergestellte Impfstoffe mit gleicher Indikation. Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß adeninauxotrophe E. coli-Mutanten – ZIMET-Nr. 11086, ZIMET-Nr. 11087 bzw. ZIMET-Nr. 11088 – als Träger der Immunogene verwendet werden.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von Pilus-Impfstoffen gegen Infektionskrankheiten des Digestionstraktes bei Rindern und Schweinen, die durch *Escherichia coli*-Bakterien hervorgerufen werden, durch Kultivierung entsprechend attenuierter Mutanten und nachfolgende Aufarbeitung der Kulturlösung zum Impfstoff, **gekennzeichnet dadurch**, daß die adeninauxotrophen *E. coli*-Mutanten ZIMET 11086, ZIMET 11087 oder ZIMET 11088 eingesetzt werden und daß dem Nährmedium Hefeextrakt und als Stickstoffquellen L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Threonin, L-Methionin und Glycin zugesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Pilus-Impfstoffen zur Prophylaxe von Infektionskrankheiten des Digestionstraktes (Rind und Schwein), die durch *E. coli*-Bakterien hervorgerufen werden, deren pathogene Wirkung wesentlich auf Anheftungsmechanismen beruht.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Unbedingte Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz von Impfstoffen zur Immunprophylaxe gegen Erkrankungen des Digestionstraktes mit ausgeprägter lokaler Schädigung ist das Vorhandensein von Antigenstrukturen im Impfstoff, die in vivo eine Antikörperbildung bewirken und damit das Anhaften pathogener Stämme an der Oberfläche der Epithelzellen verhindern. Zur Immunprophylaxe gegen o. a. Infektionskrankheiten des Digestionstraktes, z. B. der Koliruhr bei verschiedenen Haussäugetierarten (Rind, Schaf, Schwein), wurden und werden bisher international inaktivierte polyvalente Vakzinen eingesetzt. Deren Prinzip beruht entweder

- auf dem Einsatz von Vollzellvakzinen mit den epidemiologisch relevanten OK-Strukturen (SCHÖLL, 1973; MICHAEL u. a., 1977; WITTKOWSKI, 1980),
- auf dem Einsatz von polyvalenten Vollzellvakzinen, die durch Zugabe von Präparationen aus Zellen bezüglich der immunologisch relevanten Haftstrukturen angereichert sind (BRINTON u. Mitarb., 1983),
- auf dem Einsatz von Präparationen aus Zellen, die nur noch die Adhäsionsstrukturen unter Verzicht auf die kompletten Zellen enthalten (NAGY u. a., 1978; MORGAN u. a., 1978; LIEBERMANN u. LIEBSCHER, 1985).

Soweit es die Vollzellvakzinen ohne Anreicherung der Haftantigene anbelangt, weisen diese den Nachteil einer ausgeprägten serotypspezifischen Wirkung aus (WITTIG, 1965 a, b, 1971, 1980, 1981; SENF, 1982; SCHÖLL, 1973; SCHÖLL u. Mitarb., 1980). Die im letzten Jahrzehnt auf Grund der erweiterten diagnostischen und pathogenetischen Kenntnisse (STIRM u. Mitarb., 1967; SMITH u. LINGGOOD, 1971; EVANS u. Mitarb., 1973; JONES u. RUTTER, 1974; ISAACSON, 1977; ØRSKOV u. Mitarb., 1977; NAGY u. Mitarb., 1978) bevorzugt produzierten Impfstoffe mit angereicherten oder gereinigten Haftantigenen und/oder Toxinen sind mit großem Herstellungsaufwand verbunden.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein ökonomisches Verfahren zur Herstellung von gut verträglichen und wirksamen Vakzinen zur Prophylaxe von Infektionskrankheiten des Darmes bei Rindern und Schweinen, bei denen *E. coli*-Stämme mit Adhäsionsmechanismen (Pili) eine Rolle spielen.

Darlegung des Wesens

Durch die Erfindung soll ein Verfahren gefunden werden, bei dem mit geringem biotechnologischem Aufwand Pilusvakzinen hergestellt werden können, die

- von sonstigen Antigenstrukturen der Erreger unabhängig wirken,
- beim Einsatz einer geringen Biomasse einen gleich guten oder besseren Antikörpertiter bzw. Impfschutz bewirken, als aufwendiger hergestellte Impfstoffe mit vergleichbarer Indikation.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß

- die adeninauxotrophen *E. coli*-Mutanten ZIMET 11086, ZIMET 11087 oder ZIMET 11088 als Träger der Immunogene für die Herstellung von Pilusimpfstoffen eingesetzt werden,
 - dem für die Züchtung dieser Mutanten verwendeten Nährmedium neben Hefeextrakt als Stickstoffquellen L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Threonin, L-Methionin und Glycin zugesetzt werden.
- Bei der Züchtung darf die Zelloberfläche der Mutanten nicht verändert werden, so daß sich die Antigenität voll entfalten kann bzw. die genetische Potenz zur Ausbildung der Strukturen voll erhalten bleibt.

Diese genannten Stämme wurden im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena hinterlegt.

Die erfindungsgemäß hergestellten Lebendimpfstoffe haben folgende Vorteile:

- Sie lassen sich mit vergleichsweise gegenüber anderen Plusvakzinen oder pilusangereicherten Vakzinen geringerem biotechnologischem Aufwand herstellen.¹⁾ Im Gegensatz zu diesen ist dabei die Ausbildung der Pili an der Zelloberfläche nicht unbedingt erforderlich.
- Für eine Impfdosis ist nur eine vergleichsweise gegenüber anderen Pilusvakzinen oder pilusangereicherten Vakzinen geringere Biomasse erforderlich, was gleichzeitig Vorteile bezüglich der Verträglichkeit bietet.

1) Im Gegensatz zu diesen ist dabei die Ausbildung der Pili an der Zelloberfläche nicht unbedingt erforderlich.

- Sie wirken unabhängig von anderen Antigenstrukturen der Erregerzellen.
- Sie bewirken bei Versuchstieren (Prüfverfahren) höhere Antikörpertiter gegen die Haftantigene als die entsprechenden inaktivierten Vakzinen.
- Sie haben eine bessere klinische Schutzwirkung als die entsprechenden inaktivierten Vakzinen.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird an Hand der angegebenen Versuchsparemeter und Beispiele näher erläutert.

1. Gewinnung der Produktionsstämme

- Zur Herstellung der Bakterienmutanten wurde von folgenden E. coli-Wildstämmen ausgegangen:

Stamm-Nr.	serologische OK-Struktur	Haftantigen	Enterotoxin ³⁾ LT/ST	LD ₅₀ ¹⁾ $\bar{x} \pm 1 \sigma$
212/111	0 147 : K 89 (B)	K 88	+ –	$5,4 \times 10^6$ (2×10^6 – $1,4 \times 10^7$)
213/055	0 101 : K 28 (A)	K 99	– +	$2,1 \times 10^6$ (8×10^5 – $5,6 \times 10^6$)
212/160	CS 2011 ²⁾ (A)	987p	– +	$2,9 \times 10^7$ ($1,1 \times 10^7$ – $7,4 \times 10^7$)

- 1) Modell Maus (ICR Stamm, Lebendmasse 16–18 g),
i. p. Applikation, Auswertung graphisch im Wahrscheinlichkeitsnetz (Schäfer's Feinpapier Nr. 485), Angabe als vermehrungsfähige Zellen/Maus, Verdünnungsmedium: 5%ige Mucin-Lösung
- 2) Nationale Nomenklatur der Colizentrale im Bezirksinstitut für Veterinärwesen Dresden
- 3) LT = hitzelabiles Enterotoxin; ST = hitzestabiles Enterotoxin

- Die Mutanten wurden mit einer Methode gemäß Patentschrift DD 199 337 gewonnen und hatten folgende Eigenschaften:¹⁾

ZIMET-Nr.	serologische OK-Struktur	Haftantigen	Enterotoxin LT/ST	LD ₅₀ $\bar{x} \pm 1 \sigma$
11086	0 147 : K 89 (B)	K 88	+ –	$2,1 \times 10^8$ ($7,2 \times 10^7$ – $5,6 \times 10^8$)
11087	0 101 : K (A) [–]	K 99	– +	1×10^9 ($6,2 \times 10^8$ – $2,2 \times 10^9$)
11088	CS 2011 (K[A] [–])	987p	– +	$9,6 \times 10^8$ ($5,8 \times 10^8$ – $1,6 \times 10^9$)

- 1) Zeichenerklärung der Tabelle s. Wildstämme

2. Nährmedien und Anzuchtverfahren zur Erhaltung der genetischen Potentiale der verwendeten Mutanten

- Als Nährmedium zur Kultivierung der Bakterienmutanten wird verwendet:

E. c.-Medium 1998, bestehend aus:

Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O	AB-DDR	27,0 g
Mg SO ₄ × 7 H ₂ O	AB-DDR	0,25 g
Supplement VS bzw. Brämschhefeextrakt		27,0 g
L-Asparaginsäure	AB-DDR	0,32 g
L-Threonin	AB-DDR	0,18 g
L-Glutaminsäure	AB-DDR	0,055 g
L-Methionin	AB-DDR	0,16 g
Glycin	AB-DDR	0,11 g
Adenin	AB-DDR	0,05 g
Thiamin	AB-DDR	0,02 g
Glukose	AB-DDR	5 g
Aqua dest.	AB-DDR	ad 1 000 ml
pH 7,6–7,8		

- Die Züchtung der Bakterienzellen erfolgt zunächst als Standkultur und anschließend unter Rührung und Lüftung im Fermentor. Während des Fermentationsprozesses bleiben die Adeninauxotrophie und die Fähigkeit zur Bildung der Haftantigene erhalten. Die Bebrütungstemperatur beträgt +37 °C. Die Bakterienzellen werden am Anfang der stationären Wachstumsphase geerntet.

3. Methoden zum Nachweis der genetischen Stabilität, der Unschädlichkeit und Antigenität

- Adeninauxotrophie und Attenuierung der Bakterienmutanten sind miteinander gekoppelt. Die genetische Stabilität der Lebendimpfstoffe wird
 - während des Herstellungsprozesses durch quantitative Bestimmungen der Reversionsrate zur Adeninprotrophie und
 - bei Abgrenzung von Wild-(Feld)Stämmen durch qualitative Bestimmung der Auxotrophiemarker geführt.

Dazu ist es erforderlich, die Zellen zweimal mit physiologischer NaCl-Lösung zu waschen und auf Minimalagarplatten DAVIS u. MINGIOLI, 1959; FALKOW u. Mitarb., 1962) ohne Zusätze bzw. mit einer der Markersubstanzen zu plattieren. Die Bestimmung der Lebendkeimzahl erfolgt auf vollergänzttem Minimalmedium. Die Reversionsrate darf $\leq 10/10^8$ koloniebildende Einheiten (kbE) nicht überschreiten. Die Bakterienmutanten wachsen nicht auf teilergänztem Minimalmedium.

- Zur Bestimmung der Antigenität werden Kaninchen im Gewicht von 2,5–3 kg mit den verschiedenen Präparationen geimpft und die Immunantwort mittels Langsamagglutination (LA) durch Vergleich der Titer vor der Vakzination = 0-Wert und des Titors nach der Vakzination ermittelt. Dabei ist das Testantigen so auszuwählen, daß die pilusspezifischen Titer erfaßt werden.

Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

- K 99-Antikörper¹⁾ von Kaninchen, geimpft mit 1×10^9 Zellen/Tier:

K 99-Trägerstamm (K 99 ⁺) ²⁾		K 99-Trägerstamm (K 99 ⁻) ³⁾	
a. vacc.	p. vacc.	a. vacc.	p. vacc.
23	128	8	128

- K 88-Antikörpertiter¹⁾ von Kaninchen, geimpft mit

K 88-Testantigen	inaktivierten polyvalenten Handelsimpfstoffen		mit K 88-Trägerstamm	
	Dosis: 7×10^9 Zellen/Tier		Dosis: 2×10^9 Zellen/Tier	
	a. vacc.	p. vacc.	a. vacc.	p. vacc. Tier
I	5,7	16	10	256
II 5,7	16	16	812	
III	4	11,3	38	> 1 290

1) Titerangabe: reziproker Wert der Serumverdünnung als geometrisches Mittel von 2 Kaninchen

2) Die Züchtung wurde so gestaltet, daß die Pili ausgebildet und in vitro nachzuweisen waren.

3) Die Züchtung wurde so gestaltet, daß die Pili nicht ausgebildet waren, wohl aber die Fähigkeit der Zellen zur Ausbildung der Pilusstruktur erhalten blieb.

- Antikörpertiter von Kaninchen, geimpft mit 1 ID¹⁾

Testantigene	K 88-angereicherten HI ²⁾ (internat. Vgl.-Präparat)		inaktivierter HI (bisherig. DDR-Präparat)		K 88-, K 99-, P 987-Trägerstammgemisch	
	a. vacc.	p. vacc.	a. vacc.	p. vacc.	a. vacc.	p. vacc.
K 88 I	8	25	4	32	6,3	128
II	6,3	25	2,8	32	13	256
III	5	25	2,8	23	13	102
K 99	—	—	—	—	11	128
P 987	—	—	—	—	80	1 290

Titerangaben s. o.

1) ID = vom Hersteller angegebene Impfdosis

2) HI = Handelsimpfstoff polyvalent

- Anwendung von Versuchsmustern eines Lebendimpfstoffes (LI) auf der Basis von Stamm ZIMET 11087 zur Muttertierimmunisierung von Primiparae im Vergleich zur inaktivierten Vakzine Colivacc „Dessau“^(R)

Versuchskategorien	Gruppe ungeimpfter Kontrolltiere	Colivacc-Gruppe	LI-Gruppe
lebend geb. Kälber	43	128	145
totgeb.	1 (2,3 %)	6 (4,5 %)	5 (3,3 %)
Durchfall-erkrankungen	3 (6,98 %)	7 (5,5 %)	3 (2,07 %)
Durchfallintensität	1 ++ 2 +++	5 + 2 +++	3 +
Verendungen	4 (9,3 %)	6 (4,68 %)	2 (1,38 %)
Sektions-ergebnisse	3 Kälber insgesamt: path.-anat.: Kolisepsis, Koliruhr, Koliinfektion bakt.-serol.: E. coli 0 9 : K 35, E. coli 0 101, E. coli 0 101 : K 30		

- Anwendung von Versuchsmustern eines LI auf der Basis von Stamm ZIMET 11087 zur Muttertierimmunisierung von Pluriparas im Vergleich zur inaktivierten Vakzine Colivacc „Dessau“^(R)

Versuchskategorien	Gruppe ungeimpfter Kontrolltiere	Colivacc-Gruppe	LI-Gruppe
lebend geb. Kälber	81	212	79
totgeb. Kälber	3	5	—
Durchfall-erkrankungen	57 (70,3 %)	160 (75,47 %)	38 (48,10 %)
Durchfallintensität	8 ++ 49 +++	11 + 51 ++ 98 +++	8 + 21 ++ 9 +++

Versuchskategorien	Gruppe ungeimpfter Kontrolltiere	Colivacc-Gruppe	LI-Gruppe
Verendungen	12 (14,8 %)	20 (9,43 %)	4 (5,06 %)
Sektionsergebnisse	3 Kälber: path.-anat.: Salmonellose, Salmonellose, Kolisepsis bakt.-serol.: S. dublin, S. dublin, E. coli 0 101 K 30	5 Kälber: path.-anat.: Salmonellose, Salmonellose, Enteritis u. Pneumonie, Kolisepsis, Kolisepsis, bakt.-serol.: S. dublin, S. dublin, Ø, E. coli 0 101 K 30, E. coli 0 78	4 Kälber: path.-anat. Salmonellose, Enteritis, Koliruhr Kolisepsis bakt.-serol.: S. dublin, Ø, E. coli 0 78, E. coli 0 78

- Anwendung von Versuchsmustern eines trivalenten Lebendimpfstoffes auf der Basis der Stämme ZIMET 11086, ZIMET 11087 und ZIMET 11088 zur Muttertierimpfung von Schweinen im Vergleich zur inaktivierten Vakzine Coliporc „Dessau“^(R)

Versuchskategorien	Coliporc-Gruppe		LI-Gruppe	
	AS ¹⁾	JS ¹⁾	AS ¹⁾	JS ¹⁾
Würfe	98	42	78	14
aufzuchtfähige Ferkel	835	134	1 020	436
Ferkelverluste (%)	13,7	14,0	9,1	13,4
dav. Ferkelruhrtage	59,1	71,6	16,1	61,7

1) AS = Altsauen; JS = Jungsaugen

Herstellung der Impfstoffe und Impfstoffanwendung

- Die Herstellung der lyophilisierten Lebendimpfstoffe erfolgt nach bekannten Methoden. Der Bakterienkultur werden vor Lyophilisation Saccharose und inaktiviertes Normalserum vom Rind bzw. Schwein zugegeben. Die lyophilisierten Impfstoffe werden in einer gepufferten NaCl-Lösung mit Trypton resuspendiert.
- Die resuspendierten Impfstoffe werden in festgelegter Dosis (KbE/Immunisierung) hochträchtigen Muttertieren — in der Regel zweimal — parenteral (im., ggf. auch sc.) appliziert, um auf diese Weise den Immunglobulingehalt der Eutersekrete spezifisch zu erhöhen und die mit diesen Sekreten getränkten bzw. gesäugten Kälber bzw. Ferkel passiv — allgemein und lokal — zu schützen.

Literaturverzeichnis

BRINTON, C. C., FUSCO, P., WOOD, S., HUCHAPPA, G. J., GOODNOW, R. A. und STRAYER, J. G. (1983):

A complete vaccine for neonatal swine colibacillosis and the prevalence of *Escherichia coli* pili on swine isolates *Vet. Med. / Small Animal Clinician* **78**, 962–966

DAVIS, B. D. u. MINGIOLI, F. S. (1950):

Mutants of *Escherichia coli* requiring methionin of Vitamin B 12 *J. Bacteriol.* **60**, 17–28

EVANS, D. J., EVANS, D. G. u. GORBACH, S. L. (1973):

Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *E. coli* isolated from man *Infect Immun.* **8**, 725–730

FALKOW, S., ROWUD, R. u. BARON, L. S. (1962):

Genetic homology between *Escherichia coli* K 12 and *Salmonella* *J. Bacteriol.* **84**, 1303–1312

- ISAACSON, R. E. (1977):
K 99 Surface Antigen of *Escherichia coli*: Purification and Partial Characterization
Inf. Imm. **15**, 272–279
- JONES, G. W. u. RUTTER, J. M. (1974):
Contribution of the K 88 antigen of *E. coli* to enteropathogenicity: protection against disease by neutralising the adhesive properties of K 88-antigen
Amer. J. Clin. Nutr. **27**, 1441–1449
- LIEBERMANN, H. und LIEBSCHER, D. H. (1985):
Genetic engineering-Grundlagen
Mh. Vet.-Med. **40**, 182–186
- MICHAEL, Margot, WITTIG, W., SENF, W., STEPHAN, V. u. SCHÖLL, W. (1977):
Colivacc® „Dessau“, eine Formol-Adsorbatvaccine zur Prophylaxe der Koliruhr des Kalbes
Mh. Vet.-Med. **17**, 674–676
- MORGAN, R. L., ISAACSON, R. E. MOON, H. W., BRINTON, C. C. u. TO, C. C. (1978):
Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified 987 or K 99-Pili: Protection correlate with pilus homology of vaccine and challenge.
Inf. Imm. **22**, 771–777
- NAGY, B., MOON, H. W., ISAACSON, R. E., TO, C. C. u. BRINTON, C. C. (1978):
Immunization of suckling pigs against enteric enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccinating dams with purified pili Inf.
Imm. **21**, 269–274
- NAGY, B., MOON, H. W. u. ISAACSON, R. E. (1979):
Pathogenese der enteralen *E. coli*-Infektion bei neugeborenen Ferkeln und Kälbern
Wien. tierärztl. Wschr. **66**, 15–19
- ØRSKOV, I., ØRSKOV, F., JANN, B. u. JANN, K. (1977):
Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*.
Bacteriol. Rev. **41**, 667–710
- SCHÖLL, W. (1973):
Fragen der Medikation bei Koliruhr und Kolienterotoxämie der Schweine
medicamentum 14 Nr. 12, 1. Beilage für die Veterinärmedizin, 1–8
- SCHÖLL, W. MICHAEL, M. und KLIE, H. (1980): Zur Serotypspezifität der Schutzwirkung von Koliimpfstoffen
Tierzucht **34**, 461–462
- SENF, W. (1982):
Beitrag zur Immunprophylaxe der Koliruhr der Saugferkel
Mh. Vet.-Med. **37**, 165–167
- SMITH, H. W. u. LINGGOOD, M. A. (1971):
Observations on the pathogenic properties of the K 88, HLY and ent. plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhea
J. Med. Microbiol. **4**, 467–485
- STIRM, S., ØRSKOV, F., ØRSKOV, I. u. MANSA, B. (1967):
EPISOME-carried surface antigen K 88 of *Escherichia coli* III. Morphology
J. Bact. **93**, 740–748
- WITTIG, W. (1965a):
Untersuchungen zur *E. coli*-Infektion der jungen Saugferkel (Coliruhr)
Arch. exper. Vet.-med. **19**, 657–668
- WITTIG, W. (1965b):
Zum Vorkommen des K-Antigen 88 (L) bei *Escherichia coli*-Stämmen von Schweinen
Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. **197**, 487–499
- WITTIG, W. (1971):
Neuere Erkenntnisse zur Pathogenese und Prophylaxe der *Escherichia coli*-Infektionen der Schweine
Mh. Vet.-Med. **26**, 74–78
- WITTIG, W. (1980):
Koliruhr und Kolienterotoxämie des Schweines
In: BEER, J. (Hrsg.), *Infektionskrankheiten der Haustiere*
VEB Gustav Fischer Verlag Jena S. 464–469
- WITTIG, W. (1981):
Die atypische Koliruhr des Ferkels
Vortrag Jahrestagung der Fachkommission Schweineproduktion der Wiss. Ges. für Vet.-Med. der DDR Berlin 27. Mai 1981
- WITTKOWSKI, G. (1980)
Erfahrungen mit den *E. coli*-Vakzinen Ecopig^(R) und Porcovac^(R) Berl. Münsch. Tierärztl. Wschr. **93**, 224–227 (1980)