



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101982900001025
Data Deposito	10/12/1982
Data Pubblicazione	10/06/1984

Titolo

VACCINO VIVO PER LA PREVENZIONE DELLA SALMONELLOSI IN VOLATILI ACQUATICI E
PROCEDIMENTO PER FABBRICARLO

* *STAMPATA*
"VACCINO VIVO PER LA PREVENZIONE DELLA SALMONELLOSI IN VOLATILI ACQUATICI E PROCEDIMENTO PER FABBRICARLO".

VSESOJUZNY GOSUDARSTVENNY NAUCHNO-KONTROLNY INSTITUT
VETERINARNYKH PREPARATOV, a Mosca e

VSESOJUZNY NAUCHNO-ISSLEDOVATELSKY VETERINARNY INSTITUT
PTITSEVODSTVA, a Leningrado (U.R.S.S.).

Inventori Designati: Boris Julievich SHUSTER, Jury Alexeevich
MALAKHOV, Fedor Sergeevich KIRZHAEV, Arkady Semenovich PERSOV,
Vladimir Alexandrovich SEDOV, Anatoly Mikhailovich KOSIKOV,
Vyacheslav Nikolaevich GUSCHIN, Vladimir Gavrilovich LIKHODED.

=.=.=.=.=

Depositata il '10 DIC. 1982 al No. 24687 A/82

=.=.=.=.=

RIASSUNTO

La presente invenzione riguarda in generale il settore della medicina veterinaria, ma, più particolarmente, un nuovo vaccino vivo per la prevenzione della salmonellosi nei volatili acquatici ed un procedimento per fabbricarlo.

Il vaccino della presente invenzione comprende essenzialmente una sospensione di coltura viva della razza attenuata salmonella typhi-murium n. 3. depositata presso All-Union State Control Research Institute of Veterinary Preparations the USSR Ministry of Agriculture, in una concentrazione da 2 a 4 bilioni di cellule microbiche per 10 cm cubici di acqua potabile. E' descritto un procedimento

per fabbricare il nuovo vaccino vivo, in cui la razza attenuata salmonella typhi-murium n. 3 è coltivata in un mezzo di coltura contenente fonti di carbonio, azoto, sali minerali, sostanze biologicamente attive, ad una temperatura di 37-38°C, per produrre il massimo accumulo ottenibile di biomassa durante il periodo da 10 a 14 ore, con conseguente essiccamiento ed ottenimento del vaccino.

°=°=°=°=°=°

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda in generale il settore della medicina veterinaria, ma, più particolarmente, un nuovo vaccino vivo per la prevenzione della salmonellosi in volatili acquatici, un procedimento per fabbricarlo e la sua applicazione profilattica in volatili acquatici per combattere la salmonellosi causata da salmonella typhi-murium.

La salmonellosi provocata dalla S.typhi-murium che colpisce il volatile aquattico è contrassegnata da alta incidenza, carattere assai contagioso e conseguenze spesso fatali.

Inoltre la S. typhi-murium è stata coinvolta nelle tossico-infezioni alimentari nell'uomo, essendo ritenuta una degli agenti principali che le determinano, mentre il volatile aquattico è l'ospite principale di questo microbo in condizioni naturali ed i prodotti ottenuti dall'uccisione del pollame infetto costituiscono la fonte fondamentale delle in-



fezioni nell'uomo.

La prevenzione e la cura della salmonellosi nel volatile acquatico si basa principalmente sull'uso di sostanze medicinali e di generiche misure veterinario-sanitarie che, di regola, non riescono a garantire uno stato di salute più elevato nell'allevamento ed nel mantenimento del bestiame ad un livello numerico richiesto. La specifica profilassi della salmonellosi negli uccelli acquatici è estremamente inadeguata.

E' noto un vaccino polivalente di germi uccisi usato per la colibacillosi e la salmonellosi in animali da pelliccia, pollame, vitelli, maialini, il quale consiste in una sospensione di quattro bilioni di *S. typhi-murium*, *S. cholerae-suis*, *S. dublin* e *E. coli* di 24 differenti tipi di siero uccisi con formalina e tiomersal. Il vaccino, prodotto come liquido, è raccomandato per la somministrazione subcutanea ripetuta due volte negli uccelli: prima in una dose da 0,25 a 0,5 e poi in una da 0,5 a 1,0 ml. (Veterinary statute, Moscow, "Kolos" publishers, 1973, vol. 1, p. 548; manuale intitolato "Veterinary agents" Moscow, "Kolos" editori 1981, pag. 223).

Il vaccino presenta una bassa immunogenicità. La inoculazione non conferisce la completa protezione contro la malattia né impedisce che il singolo individuo divenga un portatore. Inoltre il vaccino contiene salmonella (*S. dublin*

e *S. cholerae-suis*) ed *Escherichia* (OIII, OII9, OI27, OI39, ecc) che non sono patogene negli uccelli. La somministrazione parenterale ripetuta due volte del vaccino con una siringa è troppo complicata per una campagna di inoculazione condotta su vasta scala. Il sudetto vaccino comporta un notevole pericolo che si verifichi reazione allergica.

Assai promettenti nella prevenzione della salmonellosi negli animali sono i vaccini vivi in grado di stimolare il meccanismo cellulare di immunità che gioca un ruolo fondamentale nella protezione dell'organismo contro agenti infettivi (Collins, Bact. Rev. 1974, 38, 4, 371-402).

La pratica corrente fa uso dei vaccini vivi per la salmonellosi: vitelli della razza *S. dublin* (brevetto U.S.A. No. 3.356.574 rilasciato il 5 dicembre 1967), maiali della razza *S. cholerae-suis* (brevetto U.S.A. n. 3.364.117 del 16 gennaio 1968), pecore della razza *S. abortus-ovis* (brevetto francese n. 2.464.300 del 6 marzo 1981). Tuttavia, i vaccini vivi per la salmonellosi negli uccelli acquatici non si trovano descritti in letteratura.

Ciò che si richiede è un nuovo vaccino vivo per la prevenzione della salmonellosi nei volatili domestici il quale sia altamente immunologicamente efficace, e sicuro e semplice da fabbricare, conveniente nell'uso, con una lunga vita di magazzino, in grado di stabilire una forte resistenza immunologica alla salmonellosi nei volatili.



E così l'invenzione fornisce un nuovo vaccino vivo per la prevenzione della salmonellosi negli uccelli acquatici che consiste nella sospensione di una coltura viva preparata dalla razza *Salmonella typhi-murium* n. 3 attenuata depositata presso la All-Union State Research Control Institute for Veterinary Preparations, the USSR Ministry of Agriculture, in una concentrazione di 2-4 bilioni di cellule microbiche per 10 cm³ di acqua potabile. Per sostenere le cellule microbiche nello stato vitale il vaccino della presente invenzione comprende un mezzo protettivo della seguente composizione, espresso in per cento in peso:

saccarosio	da 4 a 12,0
gelatina	da 0,6 a 3,0
acqua	il rimanente

in una quantità di un centimetro cubo del mezzo protettivo per 30-40 bilioni di cellule microbiche vitali.

Ciò che è analogamente nuovo ed utile è un procedimento per fabbricare il vaccino della presente invenzione. Il procedimento per produrre il vaccino vivo per la prevenzione della salmonellosi in uccelli acquatici mediante l'accrescimento della razza *Salmonella typhi-murium* in un mezzo di coltura contenente fonti di carbonio, azoto, sali minerali e sostanze biologicamente attive, per produrre il massimo accumulo ottenibile di massa biologica, con susseguente essiccamiento ed ottenimento del vaccino secondo l'invenzione,



utilizza come coltura di accrescimento la razza *Salmonella typhi-murium* n. 3 depositata presso All-Union State Research Control Institute for Veterinary Preparations, the USSR Ministry of Agriculture, il procedimento di accrescimento essendo condotto ad una temperatura di 37-38°C per la durata di 10-14 ore. Prima dell'essiccamento la massa biologica è preferibilmente mischiata ad un mezzo protettivo della seguente composizione, espressa in per cento in peso: saccharosio da 4 a 12,0, gelatina da 0,6 a 3,0, ed il resto essendo acqua, in una quantità di mezzo protettivo di un centimetro cubo per 30-40 bilioni di cellule microbiche.

Il vaccino della presente invenzione è innocuo, possiede un'alta capacità immunogena e, nella somministrazione orale, può essere impiegato come mezzo di profilassi specifica contro la salmonellosi negli uccelli acquatici, per esempio in allevamenti infettati.

La razza attenuata *S. tiphy-murium* n. 3 usata per produrre il vaccino si distingue per il fatto che il suo genoma comprende due mutazioni che, l'una indipendentemente dall'altra, hanno l'azione di ridurre la virulenza e garantiscono una virulenza residua costantemente bassa.

La razza attenuata è caratterizzata dalle seguenti proprietà:

caratteristiche morfologiche: si presenta come piccoli microorganismi altamente motili, gram-negativi, a for-

ma di barretta, non aventi nè spore nè capsule e della misura di 1,5-2 micromillimetri per 0,3-0,5 micromillimetri;

caratteristiche della coltura: produce un intorbidimento uniforme nel brodo di carne-peptone, dopo 8-10 ore di accrescimento ad una temperatura di 37°C, cioè presenta una velocità di crescita alquanto inferiore a quella delle razze di salmonella virulenti, le quali producono un marcato intorbidimento del brodo in 4-5 ore. Su carne-peptone-agar forma colonie trasparenti, circolari, lisce, leggermente convesse (a forma di S) con una struttura generale fine del diametro di 1-3 mm. La razza è resistente alla streptomicina (300 unità/ml);

caratteristiche di fermentazione: fa fermentare glucosio, maltosio, mannitolo, arabinosio, furbite, xilosio, producendo acido e gas; forma H_2S , non può fermentare saccharosio, lattosio, raffinosio, non fa coagulare il latte, non diluisce la gelatina, non forma indolo;

struttura dell'antigene: si agglomera sotto l'influenza dei sieri "O" del monoricettore sieri: 1, 4, 5, 12 e H del primo stadio (i) e del secondo stadio (1,2).

La razza attenuata, scelta dalla popolazione della razza virulenta S. tiphy-murium n. 415 sensibile alla streptomicina, è strettamente simile alla razza affine negli aspetti morfologici, nelle caratteristiche di fermentazione e nella struttura dell'antigene. Delle caratteristiche della



cultura quelle che sono pertinenti esclusivamente alla razza attenuata in contrasto con la varietà epizotica sono una bassa velocità di riproduzione ed un'alta resistenza alla streptomomicina.

La virulenza residua della razza espressa in LD_{50} per topi bianchi del peso di 14-16 g dopo inoculazione intradermica è $8,08 \times 10^8 \pm 1,28 \times 10^8$, mentre la LD_{50} della razza di partenza (virulenta) è $18,9 \pm 8,4$ cellule microbiche. Perciò, la virulenza residua della razza attenuata in topi bianchi è 4×10^7 volte inferiore a quella della razza di partenza.

La stabilità della virulenza residua è stata accertata per mezzo di una serie di 10 passaggi in topi bianchi e di 5 passaggi in vitelli. La virulenza residua della razza attenuata con cambiava dopo ripetuti passaggi.

I dati sono riassunti nella Tavola 1

LD_{50} di razze di *S. typhi-murium* prima e dopo i passaggi.

TAVOLA 1

Numeri	R A Z Z E	LD_{50}	LD_{50}	dopo
		prima del passaggio	una serie di 10 passaggi in topi bianchi	una serie di 5 passaggi in vitelli
1		2	3	4
2	attenuata	$8,08 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$7,94 \times 10^8$
3	virulenta	18,9	10	10

La differenza dei valori LD₅₀ per la razza attenuata prima e dopo i passaggi è statisticamente trascurabile (P < di 0,01).

Si studiava la capacità immunogena della razza attenuata in confronto ad un vaccino riscaldato preparato dalla razza virulenta su topi bianchi del peso di 14-16 g sottoposti ad una singola immunizzazione con una dose subcutanea di un milione di cellule microbiche. 21 giorni dopo l'immunizzazione i topi venivano infettati con la razza virulenta in dosi di 0,01, 0,1, 1 e 10 migliaia di cellule microbiche ciascuna di queste dosi venendo somministrata a 10 animali. Si valutava la capacità immunogena mediante l'indice di efficacia che è in sostanza il rapporto fra LD₅₀ nel gruppo in esame e LD₅₀ nel gruppo di controllo.

La capacità immunogena della razza attenuata era in media 9 volte quella presentata da cellule uccise della razza virulenta (indici di efficacia rispettivamente di 92 e 10,4).

Quella che segue è una descrizione particolareggiata del procedimento per preparare il vaccino della presente invenzione.

La coltura è fatta crescere in reattori in un mezzo di coltura quale per esempio il brodo di Hottinger per 10-12 ore ad una temperatura di 37-38°C mentre viene costantemente mescolata (50-60 giri al minuto) e costantemente aera-

ta per produrre l'arricchimento di ciascun litro del mezzo di coltura con aria nella proporzione di 1:2.

La coltura in brodo così sviluppata viene precipitata per centrifugazione, poi diluita in bottiglie da 18-19 litri con un mezzo protettivo fino ad una concentrazione di 100-120 bilioni di cellule microbiche secondo lo standard visuale di standard, viene posta in fiale ed essiccata per sublimazione sotto vuoto ed infine si saldano le fiale. Il conteggio dei batteri vivi per un cm^3 di vaccino dopo l'essiccamento è di 30-40 bilioni.

La determinazione del totale di salmonella viva per un cm^3 di vaccino viene condotta nel modo seguente. Si preparano due campioni, ciascuno comprendente tre fiale del vaccino. Il vaccino nelle fiale viene diluito fino al volume iniziale con soluzione salina fisiologica, quindi viene mescolato e valutato per la concentrazione di salmonella in entrambi i campioni mediante lo standard di opacità. La concentrazione batterica nel vaccino deve essere 100 bilioni di cellule microbiche per un cm^3 . I due campioni sono poi usati per preparare con pipette separate diluizioni dieci volte tanto fino a 10^{-9} in un brodo sterile di carne-peptone. Da tali diluizioni a 10^{-8} e 10^{-9} di ciascuno dei due campioni si preleva un cm^3 e lo si pone in 5 capsule contenenti carne-peptone-agar. Si distribuisce uniformemente il materiale della coltura inclinando la capsula.



Si pongono poi le capsule in un termostato ad una temperatura di 37°C per un periodo di 24 ore, dopo di che si determinano il numero di colonne sviluppatesi e la concentrazione di salmonella viva (x) in bilioni per un cm³ mediante la formula

$$x = \frac{\frac{p}{q} + \frac{p_1 \cdot 10}{q_1}}{2} \cdot 10^8$$

in cui

x è la concentrazione di salmonella viva per 1 cm³

p è il numero di colonie in tutte le capsule contenenti la diluizione 10⁻⁸

q è il numero di capsule con diluizione 10⁻⁸

p_I è il numero di colonie in tutte le capsule contenenti la diluizione 10⁻⁹

q_I è il numero di capsule con diluizione 10⁻⁹

Si sommano gli indici di concentrazione per ciascun campione e si divide la somma per il numero di campioni arrivando in tal modo alla concentrazione media di salmonella viva nel vaccino, espressa in bilioni di cellule microbiche per un cm³.

Per la determinazione della sicurezza si scioglie l'estratto di vaccino essiccato in soluzione salina fisiologica fino ad una concentrazione di 20 milioni di cellule microbiche per un cm³ secondo lo standard visuale di opacità e poi si somministra a topi bianchi del peso di 16-18 g subcutaneamente nella regione dorsale utilizzando una dose



di 10.000.000 di cellule microbiche in un volume di 0,5 cm³.

Il vaccino è dichiarato sicuro se dei 10 topi originali 8 sono tuttora vivi al termine di un periodo di 10 giorni.

La prova dell'attività del vaccino richiede lo uso di tre fiale. Ogni fiala con il vaccino viene riempita con soluzione salina fisiologica fino al volume di partenza. Si trasferisce poi il vaccino completamente disciolto in una provetta sterile, il campione comune venendo usato per preparare una diluizione del vaccino in soluzione salina fisiologica ad una concentrazione di 300 milioni di batteri vivi per un cm³.

Per esaminare l'immunogenicità si scelgono 20 porcellini d'India del peso di 350-400 g e di questo numero di animali 10 ricevono il vaccino subcutaneamente nella regione inguinale in una dose di 300 milioni di cellule microbiche vive per un cm³. Dopo 14-16 giorni sia i porcellini immunizzati che i 10 porcellini di controllo vengono infettati con una dose letale di una coltura titolata della razza di controllo S.tiphy-murium. L'osservazione degli animali da esperimento continua 10 giorni dopo la morte di metà degli animali di controllo. Durante il periodo di osservazione tutti i porcellini d'India del gruppo di controllo od almeno otto di essi devono morire mentre dei dieci animali immunizzati almeno otto devono sopravvivere.

Nell'uso il vaccino è una sospensione di cellule



microbiche della razza attenuata S. typhi-murium n. 3 in una concentrazione di 2-4 bilioni di batteri vivi per 10 cm^3 di acqua potabile. Il vaccino è impiegato nella prevenzione della salmonellosi in uccelli acquatici, per esempio in anatroccoli e paperini, in allevamenti che siano infettati. Il vaccino è dato da anatroccoli e paperini partendo dal terzo giorno di vita ed è somministrato oralmente ad un intervallo di due giorni in una dose di due bilioni di cellule microbiche la prima volta e 4 bilioni la seconda. L'immunità è indotta da 3 a 5 giorni dopo la somministrazione della seconda dose di vaccino, è conservata per un periodo pari a 6 mesi.

Illustrano ulteriormente l'invenzione i seguenti esempi di preparazione e di esame del vaccino.

Esempio I

Preparazione di una singola serie del vaccino

Questo procedimento per produrre il vaccino comprende i seguenti stadi:

ottenimento di una coltura di accrescimento. A questo scopo si travasa una fiala contenente la razza attenuata essiccata S. typhi-murium n. 3 in due o tre palloni da $100-200 \text{ cm}^3$ contenenti brodo di Hottingers (volume della coltura uguale metà volume del pallone) accompagnata da una coltura di controllo in bicchieri contenenti carne-peptone-agar, brodo di carne-peptone, brodo di carne-peptone-fegato sotto vasellina. La coltivazione era condotta per 14-16 ore ad una temperatura di 37°C .

Si



ispezionava la coltura per le impurezze mediante esame microscopico delle macchie colorite secondo il metodo di Gramm.

Si poneva la coltura pura in palloni da 200 cm³ contenenti brodo di Hottinger facendo in modo che vi fossero 10 cm³ di coltura per 100 cm³ di mezzo e si sottoponeva a accrescimento ad una temperatura di 37°C per 14-16 ore. Il numero dei palloni coltivati dipendeva dal volume della coltura madre richiesto. Si conducevano anche delle colture di controllo in carne-peptone-agar, brodo di carne-peptone, brodo di carne-peptone-fegato (MPA, MPB, MPLB) sotto vasellina.

Per ottenere la coltura madre si trasferiva il contenuto di un pallone in una bottiglia contenente 10 litri di brodo di Hottinger con simultanea coltura di controllo in bicchieri contenenti MPA, MPB, MPLB sotto vasellina ed in capsule di Petri contenenti il mezzo Endo al fine di evitare la contaminazione da microflora estranea.

La coltivazione nelle bottiglie era condotta per 10-12 ore ad una temperatura di 37°C in una quantità necessaria alla coltivazione nel reattore. Il prodotto così ottenuto era usato per la coltivazione in bicchieri contenenti mezzi di coltura od in capsule di Petri contenenti il mezzo Endo ed inoltre per la microscopia e per la determinazione della concentrazione di microorganismi secondo lo standard visivo, detta concentrazione dovendo essere di almeno 500 milioni di cellule microbiche per un cm³.

La coltura di accrescimento, esaminata per la assenza di impurezze, veniva posta nel reattore contenente un mezzo di coltura sterile raffreddato a 38°C, in modo da stabilire una proporzione di 8-10% di coltura sul volume complessivo del mezzo mentre simultaneamente si aggiungeva 0,1% (in peso di sostanza secca) di soluzione sterile di glucosio al 40%.

La coltivazione nel reattore continuava per 10-12 ore ad una temperatura di 37°C, la coltura essendo costantemente mescolata (50 giri al minuto) ed essendo continuamente aerata per produrre l'arricchimento di ciascun litro del mezzo di coltura in una proporzione di 1:2 per minuto.

Mentre si conduce la coltivazione si prelevava un campione di coltura ogni 1-2 ore per verificare il pH, la purezza del prodotto e la concentrazione delle cellule microbiche. Nel caso di un pH elevato durante la coltivazione, alla coltura si aggiungeva soluzione sterile di glucosio al 40% (0,1% in peso di sostanza secca). Il processo di coltivazione era terminato al raggiungimento dello stato stabile nel quale il totale dei microbi vivi cessava di aumentare.

La coltura così ottenuta era raffreddata a 6-8°C, ed esaminata per le impurezze al microscopio ed effettuando colture in bicchiere con MPA, MPB, MPLB sotto vasellina od in capsule con mezzo Endo. La coltura conteneva da 30 a 40 bi-

lioni di cellule microbiche per un cm^3 secondo lo standard visuale, aveva un valore del pH tra 7,4 e 7,6 e si aggiungeva sotto l'influenza di sieri "O" del monoricetto-re:sieri 1,4, 5,12 e H (i, 1, 2). Dopo raffreddamento si trasferiva la coltura pura in brodo, attraverso un tubo flessibile sterile, nella supercentrifuga al fine di concentrarla.

Per mantenere le condizioni di sterilità il rotore della centrifuga veniva trasferito nel compartimento manuale in cui la massa batterica coltivata era raccolta dal rotore in vasi da 3 litri precedentemente pesati e sterilizzati contenenti perline. Successivamente ogni vaso era pesato di nuovo, la differenza di peso dando la quantità effettiva in peso della coltura batterica concentrata raccolta.

La coltura batterica così raccolta era diluita in bottiglie da 18-20 litri con un mezzo protettivo fino ad una concentrazione di 100-120 bilioni di cellule microbiche per 1 cm^3 secondo lo standard visuale di opacità.

Il mezzo protettivo veniva preparato con la seguente sequenza di processi: si usava acqua bollente, distillata o demineralizzata, per sciogliere gelatina in una concentrazione di 1,5-2%, dopo di che essa si aggiungeva a 10% di saccarosio, si sottoponeva ad ebollizione per un massimo di 5-6 minuti, quindi si filtrava attraverso un filtro di tela e si portava il valore del pH a 7,6-7,8 aggiungendo una soluzione al 4%



di soda causatica, quindi si sterilizzava ad una temperatura di 110°C per 30 minuti. Dopo la sterilizzazione si esaminava il mezzo protettivo per la sterilità sottoponendolo a coltura in MPA, MPB, MPLB sotto vasellina.

Si mescolava a fondo la sospensione della coltura microbica con il mezzo protettivo e si poneva in fiale sterili che venivano chiuse con tamponi di cotone laschi.

Mentre veniva distribuito il vaccino era continuamente mescolato. Le fiale contenenti il vaccino erano inserite in un caricatore per essere immagazzinate e congelate nel refrigeratore ad una temperatura di -40 -50°C per 8-14 ore.

Completato il congelamento, si trasferivano le fiale contenenti il vaccino nel dispositivo di sublimazione dove essi erano sottoposti ad essiccamiento.

Il completamento del processo d'essiccamiento era indicato dal raggiungimento della determinata temperatura terminale del materiale coltivato (25°C) e della pressione minima entro la camera, tali valori essendo mantenuti uguali durante le ore finali dell'essiccamiento. L'attivazione del riscaldatore a scaffale, delle pompe a vuoto e del dispositivo di scarico del vaccino essiccato veniva attuata in conformità alle norme operative fissate sull'impianto di sublimazione.

Le fiale con il vaccino secco erano saldate su una unità collettrice a tamburo ad una pressione massima di 0,2 mm di mercurio. Le fiale saldate erano esaminate macroscop-



picamente per la presenza di impurezze estranee, mentre lo stato di vuoto all'interno delle fiale veniva determinato usando gli strumenti progettati da D'Arsonvalle o da Tesla. Le fiale erano poi contrassegnate con cartellini elencanti il numero della sostanza ed il numero di serie.

Il vaccino contenuto nelle fiale era sottoposto alle seguenti prove:

aspetto,

purezza e caratteristiche della coltura,

concentrazione visuale per un cm^3

conteggio delle cellule microbiche vive e numero delle dosi di vaccino per un cm^3

contenuto di umidità in per cento in peso

solubilità

presenza di vuoto nelle fiale

sicurezza operativa

immunogenicità.

ESEMPIO 2

Prova di laboratori sul vaccino vivo

Si esaminava la sicurezza del vaccino su anatrocoli e paperini dell'età di 2-5 giorni applicando la somministrazione subcutanea ed usando dosi rispettivamente di 1,2,5,10 e di 2,5,10,20 bilioni di cellule microbiche.

Il tempo di sopravvivenza della razza contenuta nel vaccino nel corpo degli animali veniva determinato con

esame battereologico delle strutture interne dei tessuti degli uccelli vaccinati condotto ad un intervallo di 5-10 giorni per un periodo di 2 mesi dopo l'inoculazione.

Le proprietà immunogene del vaccino erano studiate nella somministrazione subcutanea, nella combinata (subcutanea e orale) nonché nella somministrazione orale attuata una volta o due volte. Nella somministrazione subcutanea il vaccino era introdotto in una dose di due bilioni, laddove nel modo orale ed in quello combinato si somministravano un bilione e due bilioni di cellule microbiche ad un intervallo di 2 giorni.

Gli esperimenti dimostravano che il vaccino vivo, sia che fosse somministrato subcutaneamente sia due volte oralmente nelle dosi succitate, non produceva alcuna reazione indebita negli anatroccoli e nei paperini di 2-5 giorni e l'uccisione di controllo degli uccelli eseguita 5, 10 e 20 giorni dopo l'inoculazione non mostrava segni di variazioni patologiche nelle strutture interne.

Nella tecnica orale di immunizzazione, l'escrezione completa delle cellule microbiche avveniva a partire dal 35esimo giorno negli anatroccoli e a partire dal 40esimo giorno nei paperini. Nella tavole 2 e 3 sono elencati i risultati di studi sperimentali sulle proprietà immunogene del vaccino vivo applicato in modi diversi in confronto con quello del vaccino ucciso noto. Come si può evedere dalla tavola



2, 15 giorni dopo l'inoculazione con il vaccino vivo somministrato in uno qualsiasi dei modo in esame, gli anatroccoli venivano resi immuni ad una infezione subcutanea con la razza virulenta *S. typhi-murium* in una dose di 3 LD_{50} , il coefficiente di efficacia immunologica (CIE) essendo 100.

Al tempo stesso una singola vaccinazione orale conferiva una immunità di intensità alquanto inferiore a quella della somministrazione ripetuta due volte. Così, per esempio, 15 giorni dopo l'inoculazione, consistente in una somministrazione singola, il valore CIE era 100 in risposta ad una infezione con 3 LD_{50} , e 80 e 60 rispettivamente dopo un intervallo di 30 e 45 giorni in risposta a una infezione con 6 LD_{50} della razza virulenta.

Il vaccino ucciso presentava proprietà immunogene notevolmente meno potenti.

La capacità immunogena del vaccino era anche sufficientemente pronunciata negli esperimenti condotti su parerini (tavola 3). I valori CIE rispettivamente 15, 30, 45, e 60 giorni dopo la vaccinazione orale ripetuta due volte erano 80, 80, 73, 73 rispettivamente, in risposta ad una infezione con 3 LD_{50} della razza virulenta.

I corrispondenti indici per il vaccino ucciso erano 48, 33 e 10.

ESEMPIO 3

Prova del vaccino vivo in condizioni industriali;



Si conduceva una serie di esperimenti industriali con il vaccino in allevamenti di pollame infettati da salmonellosi. L'inoculazione era effettuata secondo lo schema succitato su un numero totale di 107.400 anatreccoli. A titolo di confronto si usava il vaccino già noto la cui somministrazione era effettuata seguendo le istruzioni appropriate.

Nella Tavola IV sono riassunti i risultati medi di una serie di tre esperimenti industriali. Il livello di sopravvivenza nei gruppi in esame inoculati con il vaccino vivo o con l'ucciso era in media rispettivamente 96,5% e 88%, laddove questo valore nel gruppo di controllo era 83%.

Gli indici di aumento di peso nel pollame erano rispettivamente 42,7, 36,0 e 34,8 g, mentre i costi per ogni 100 kg di aumento di peso erano 4,5, 5,8 e 6,6 unità di alimentazione.

Le differenze degli indici di efficacia immunogena presentate dai vaccini vivo ed ucciso erano verificate statisticamente ($P < 0,01$).

Il risparmio industriale generale derivava dalla prevenzione della mortalità nel pollame, del maggior aumento di peso, dai minori costi di alimentazione e di medicazione.

(seguono tavole)

TAVOLA 2

Proprietà immunogene del vaccino in anatreccoli

Num ri	Tecnica di immu- nizzazio- ne	Infezione susseguente all'inoculazione						9
		15 giorni dopo			30 giorni dopo			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Vaccino del la presente invenzione	Subcutanea singola	20	3LD ₅₀	100	30	10LD ₅₀	100
2		orale - subcuta- nea	20	3LD ₅₀	100	30	10LD ₅₀	100
		orale singola	20	3LD ₅₀	100	25	3LD ₅₀	80
		orale doppia	20	3LD ₅₀	100	30	10LD ₅₀	100
3	Vaccino ucciso noto	Subcutanea doppia	20	3LD ₅₀	52	20	10LD ₅₀	40
		orale doppia	20	3LD ₅₀	48	20	10LD ₅₀	33
4	Controllo		10	3LD ₅₀	-	10	3LD ₅₀	-

TAVOLA 2 (continuazione)

45 giorni dopo				60 giorni dopo				90 giorni dopo			
Numero di uccelli	Dose di infezione	CIE	Numero di uccelli	Dose di infezione	CIE	Numero di uccelli	Dose di infezione	CIE	Numero di uccelli	Dose di infezione	CIE
10	11	12	13	14	15	16	17	18	10	20	100
30	15LD ₅₀		100	20	3LD ₅₀	100	20		3LD ₅₀		100
35	15LD ₅₀		100	20	3LD ₅₀	100	20		3LD ₅₀		100
30	6LD ₅₀		60	-	-	-	-	-	-	-	-
35	15LD ₅₀		100	20	3LD ₅₀	100	20		3LD ₅₀		100
20	15LD ₅₀		20	-	-	-	-	-	-	-	-
20	15LD ₅₀		10	-	-	-	-	-	-	-	-
10	3LD ₅₀	-	10	3LD ₅₀	-	10	3LD ₅₀	-			

TAVOLA 3

Proprietà immunogene del vaccino in paperini

Numeri	Vaccino	Tecnica di immunizzazione	Infezione susseguente alla inoculazione					
			15		30		CIE	CIE
			numero di uccelli	dose di infezione	numero di uccelli	dose di infezione		
1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	Vaccino del la presente invenzione	Subcutanea singola	10	3LD ₅₀	80	15	3LD ₅₀	60
		orale doppia	10	3LD ₅₀	80	15	3LD ₅₀	80
3	Vaccino ucciso noto	Subcutanea doppia	10	3LD ₅₀	30	15	3LD ₅₀	22
		orale doppia	10	3LD ₅₀	25	15	3LD ₅₀	20
4	Controllo		10	3LD ₅₀	-	10	3LD ₅₀	-

TAVOLA 3 (continuazione)

45 giorni dopo			60 giorni dopo		
Numero di uccelli	Dose di infezio ne	CIE	Numero di uccelli	Dose di infezio ne	CIE
10	11	12	13	14	15
15	3LD ₅₀	60	15	3LD ₅₀	60
15	3LD ₅₀	73	15	3LD ₅₀	73
15	3LD ₅₀	12	-	-	-
15	3LD ₅₀	7	-	-	-
10	3LD ₅₀	-	-	-	-

TAVOLA 4

Risultati di esperimenti industriali del
vaccino su anatroccoli (medii di una serie
di tre prove)

<u>Numere</u>	<u>Vaccino</u>	<u>Tecnica</u> <u>di immu-</u> <u>nizzazio-</u> <u>ne</u>	<u>Numero di</u> <u>anatroccoli</u> <u>in esame</u>	<u>Mortalità</u>	
1	2	3	4	5	6
2	Vaccino vivo della presente invenzione	orale doppia	107400	3759	3,5
3	Vaccino ucciso noto	subcutanea doppia	3000	360	12
4	Controllo	-	34800	5916	17,0

TAVOLA 4 (continuazione)

Sopravvivenza %	Aumento di peso medio giornalie ro	Consumo di alimentazione per ogni 100 kg di aumento di pe so, unità di alimentazione
7	8	9
96,5	42,7	4,5
88,0	36,0	5,8
83,0	34,8	6,6



R I V E N D I C A Z I O N I

1. Vaccino vivo per la prevenzione della salmonellosi in volatili acquatici, caratterizzato dal fatto che detto vaccino è sostanzialmente una sospensione di coltura viva della razza attenuata *Salmonella typhi-murium* n. 3 depositata presso la All-Union State Research Control Institute for Veterinary Preparations, the USSR Ministry of Agriculture, in una concentrazione di 2-4 bilioni di cellule microbiche per 10 cm^3 di acqua potabile.

2. Vaccino vivo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che per preservare la vitalità delle cellule microbiche detto vaccino comprende un mezzo protettivo della seguente composizione, espressa in % in peso: saccharosio da 4 a 12,0, gelatina da 0,6 a 3,0, acqua il rimanente, in una quantità di un cm^3 del mezzo protettivo per 30-40 bilioni di cellule microbiche vive.

3. Procedimento per produrre il vaccino vivo secondo le rivendicazioni 1-2 mediante la coltivazione della *Salmonella typhi-murium* in un mezzo di coltura contenente fonti di carbonio, d'azoto, sali minerali, sostanze biologicamente attive, per produrre il massimo accumulo ottenibile di massa biologica, con susseguente essiccamiento ed ottenimento del vaccino, caratterizzato dal fatto che la coltura scelta è la razza attenuata *Salmonella typhi-murium* n. 3 depositata presso la All-Union State Research Control Institute

for Veterinary Preparations, the USSR Ministry of Agriculture, detto procedimento di produzione venendo effettuato ad una temperatura di 37-38°C per la durata di 10-14 ore.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 3, caratterizzato dal fatto che prima dell'essiccamento la massa biologica è mischiata ad un mezzo protettivo della seguente composizione, espressa in % in peso: da 4 a 12,0 di saccarosio, da 0,6 a 3,0 di gelatina ed il resto essendo acqua, in una quantità di un centimetro cubo del mezzo protettivo per 30-40 bilioni di cellule microbiche vive.

Il Mandatario:

~~- Dr. Ing. G. MODIANO -~~



l'Ufficiale Rogante
(Pietro Tessineo)