



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **282 393 A5**

5(51) A 61 K 39/02

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP A 61 K / 319 874 4	(22)	16.09.88	(44)	12.09.90
(31)	87.02232	(32)	18.09.87	(33)	NL

(71)	siehe (73)
(72)	Storm, Paul K., NL
(73)	AKZO N. V., 6824 BM Arnheim, NL
(74)	Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes zur Bekämpfung von Mykoplasmainfektionen bei Geflügel

(55) Herstellungsverfahren; Impfstoff; Mykoplasmainfektionen; Hühner; Truthühner; Mykoplasma-Stamm

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes zur Bekämpfung von Mykoplasmainfektionen bei Geflügel. Dieser Impfstoff ist für Hühner avirulent und für Truthühner nicht pathogen. Er enthält speziell den Mykoplasma-Stamm Intervat 6/85 (Deponie-Nr. I-673 am CNCM, Pasteur-Institut, Paris, Frankreich).

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes zur Bekämpfung von Mykoplasmainfektionen bei Geflügel, **gekennzeichnet dadurch**, daß Bakterien eines Mykoplasma gallisepticum-Stammes, der die immunologischen Eigenschaften des Stammes Intervet 6/85 hat, zu einem pharmazeutischen Präparat mit Immunisierungsaktivität entwickelt werden, wobei wahlweise ein Stabilisator und/oder Adjuvans und/oder Antibiotikum und/oder ein Inaktivierung der Bakterien hinzukommen können.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß Bakterien eines Mykoplasma gallisepticum-Stammes verwendet werden, die vom Stamm Intervet 6/85 abgeleitet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß Bakterien des Stammes Intervet 6/85 verwendet werden.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Mykoplasma-Impfstoffes zum Schutz von Geflügel vor Mykoplasmainfektionen durch Verabreichung eines solchen Impfstoffes.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Mykoplasma, und insbesondere M. gallisepticum, ist eine Bakterie, die insbesondere für Geflügel infektiös ist. Die Infektion kommerziell wichtiger Vögel mit der genannten Bakterie verursacht erhebliche wirtschaftliche Verluste. Das durch M. gallisepticum verursachte Syndrom wird bei Hühnern als „chronische Atmungs-erkrankung“ und bei Truthühnern als „infektiöse Sinusitis“ bezeichnet. Die Infektion durch M. gallisepticum ist auch oft durch eine Infektion mit Viren der Atemwege und durch Escherichia coli begleitet.

Infektionen durch M. gallisepticum können mit bestimmten Antibiotika bekämpft werden, beispielsweise Erythromycin, Streptomycin, Chlorotetrazyklin, Tylosin und Magnamycin, die in der Regel dem Futter beigemischt werden, aber im wachsenden Maße entwickeln die Bakterien eine Resistenz gegen diese Substanzen, wodurch die Bekämpfung der Erkrankung immer schwieriger wird.

Es wurden Impfstoffe für den immunologischen Schutz von Geflügel vor Infektionen mit M. gallisepticum entwickelt. Inaktivierte M. gallisepticum-Bakterienimpfstoffe wurden mit unterschiedlichem Ergebnis eingesetzt. Diese Impfstoffe ergaben zwar, besonders bei Verabreichung in Verbindung mit einem Öl-Emulsion-Adjuvans, eine gute serologische Reaktion, schienen aber nicht vor den Infektionen zu schützen.

In einigen wenigen Staaten der USA, vor allem in den sogenannten „Eierfarmen“, wurden Impfungen mit geschwächten, lebenden M. gallisepticum des F-Stammes durchgeführt. Dieser Stamm wird nach der Spritzmethode verabreicht und bietet einen angemessenen Schutz von Luftsackentzündungen und verringert den Rückgang in der Eierproduktion auf ein annehmbares Maß.

Die bekannten inaktivierten Impfstoffe haben zahlreiche Nachteile. Jedes Tier muß einzeln gespritzt werden. Der Impfstoff ist sehr teuer. Die Tiere sind nicht gegen die Infektion geschützt, d. h., nach der Infektion können sie Träger von (virulentem) Mykoplasma bleiben.

Selbst die vorhandenen Lebendvakzine sind nicht problemlos. Obwohl der F-Stamm für Hühner ziemlich avirulent ist, ist er für Truthühner sehr pathogen. Außerdem bleiben die Hühner nach der Impfung Träger des Impfstammes, der sich somit auch über eine längere Zeitspanne weiter ausbreiten kann.

Ziel der Erfindung

Mit der Erfindung wird ein Mykoplasma-Impfstoff zur Verfügung gestellt, der Geflügel vor Mykoplasmainfektionen schützt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, einen Impfstoff zum Schutz von Geflügel vor Mykoplasmainfektionen bereitzustellen. Es wurde nun ein M. gallisepticum-Impfstoff gefunden, der nicht die oben genannten Nachteile aufweist.

Der Mykoplasma-Impfstoff nach der Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß er von einem M. gallisepticum-Stamm abgeleitet wird, der die immunologischen Eigenschaften des Stammes Intervet 6/85 hat.

Der Stamm Intervet 6/85 ist ein neuer M. gallisepticum-Stamm – ein Mutant, der durch eine Reihe von In-Vitro-Passagen des bekannten S6-Stammes (ATCC No. 15302) gewonnen wurde.

Dieser neue Stamm, der am 7. Juli 1987 unter der Nummer I-673 bei der Collection Nationale de Cultures de Microorganismes des Pasteur-Instituts in Paris deponiert wurde, ist damit Teil der Erfindung. Zur Erfindung gehören auch Stämme, welche dieselben charakteristischen immunologischen Eigenschaften wie der Stamm Intervet 6/85 haben. Insbesondere sind auch Stämme, welche unter Beibehaltung der besonders günstigen immunologischen Eigenschaften vom Stamm Intervet 6/85 abgeleitet wurden, Teil der Erfindung.

Der Stamm Intervet 6/85 hat eine Reihe wichtiger Vorteile gegenüber den bekannten Stämmen von *M. gallisepticum*, durch die er für Impfstoffanwendungen außerordentlich geeignet ist und durch die er sich von den bekannten *M. gallisepticum*-Stämmen unterscheidet:

- a) er ist nicht virulent für Hühner; keinerlei klinische Symptome; Luftsackentzündungen treten faktisch nicht auf;
- b) nicht virulent für Truthühner;
- c) vier Wochen nach der Verabreichung wird er nur noch bei einer unbedeutend geringen Zahl von Tieren festgestellt, während der F-Stamm über eine lange Zeitspanne von fast 100% der Tiere ausgeschieden wird;
- d) er hat ein Endonuklease Restriktionsschema, wie es in der Abb. 1 gezeigt wird.

Der Impfstoff nach der Erfindung wird an Geflügel vorzugsweise in Form eines Lebendvakzins verarbeitet, obwohl er auch als inaktivierter Impfstoff verwendet werden kann.

Der Mykoplasma-Impfstoff kann auf die für ähnliche Impfstoffe übliche Weise verabreicht werden, besonders aber eignet sich der vorliegende Impfstoff für die Verabreichung als Aerosol. Sehr fein verteilte Aerosole des Impfstoffes können beispielsweise mit einem Vineland-Aerosolgerät hergestellt werden.

Der Mykoplasma-Impfstoff nach der Erfindung kann beispielsweise in gefriergetrockneter Form auf den Markt gebracht werden. Daraus kann durch den Zusatz einer wäßrigen Flüssigkeit, beispielsweise von Leitungswasser, eine Suspension hergestellt werden. Der Impfstoff kann natürlich auch als Suspension auf den Markt gebracht werden. Auf Wunsch können in dem Impfstoff neben dem Mykoplasma-Material auch ein oder mehrere Stabilisatoren (wie Magermilch oder Kaseinhydrolysat) und/oder ein oder mehrere Antibiotika (wie Ampicillin oder Polymycin) vorhanden sein.

Der vorliegende Impfstoff ist für die Bekämpfung von Mykoplasma-Infektionen bei Geflügel geeignet. Besonders geeignet ist er für die Bekämpfung von Mykoplasma-Infektionen bei Hühnern und Truthühnern. Der Impfstoff kann am besten in der Aufzuchtperiode, vorzugsweise im Alter von 8 bis 15 Wochen, verabreicht werden, als Schutz gegen einen Rückgang der Produktion während der Legezeit. Die Impfung sollte aus folgenden Gründen vorzugsweise während der Aufzuchtperiode durchgeführt werden:

- a) weil eine leichte Impfreaktion, die aus der Impfung resultieren könnte, in dieser Phase keine Auswirkungen auf die Eierproduktion hat;
- b) weil der Schutz zu dem Zeitpunkt, an dem die Tiere zu legen beginnen, angemessen sein muß;
- c) weil die Tiere geschützt sein sollten, wenn sie aus der Aufzuchtfarm in die Legefarm gebracht werden, wo in der Regel die Infektion erfolgt.

Eine der vorteilhaften Eigenschaften des Impfstoffes nach der Erfindung ist seine sehr geringe Virulenz für Hühner.

Das wurde mit Leghorn-Zuchtieren nachgewiesen, bei denen die Wirkungen des Stammes Intervet 6/85, des R-Stammes und des F-Stammes verglichen wurden. Der R-Stamm wird als ein sehr virulenter *M. gallisepticum*-Stamm betrachtet. Der F-Stamm wird in den USA als Impfstamm verwendet. Beide Stämme wurden von S. Kleven von der University of Georgia zur Verfügung gestellt. Der F- und der R-Stamm wurden in den von Frey u. a. beschriebenen Medien (M. C. Frey, R. P. Hanson und D. P. Anderson [1968], Amer. J. Vet. Res. 29, 2164–2171) gezüchtet, während der Stamm Intervet 6/85 in einem modifizierten Adler-Medium (H. E. Adler, R. Yamamoto und S. Bankowski [1954], Amer. J. Vet. Res. 15, 463–465) kultiviert wurde. Die Modifikation des Adler-Mediums bestand darin, daß Bacto PPLO-Brühe durch Proteasepepton und Pferdeserum durch Schweineserum ersetzt wurden. Bei den für diese Experimente verwendeten Hühnern wurde vorher festgestellt, daß sie sowohl für *M. gallisepticum* als auch für *M. synoviae* seronegativ waren.

Etwa eine Woche vor den Experimenten wurden 10 Hühner in einen Isolationskäfig mit vermindertem Druck gebracht. Diesen Hühnern wurde nach der Aerosolmethode Mykoplasma verabreicht. Im Isolationskäfig wurden 100 ml der entsprechenden Mykoplasma-Kultur für die Dauer von 10 min zerstäubt, die Luftabgabevorrichtung war ausgeschaltet. Die verabreichte Suspension von Intervet 6/85 enthielt 10^{10} lebensfähige Organismen je Milliliter, während die Suspensionen des F- und des R-Stammes jeweils nur 10^8 lebensfähige Organismen je Milliliter enthielten.

Zehn und 24 Tage nach der Verabreichung des Mykoplasmas wurde eine Post-mortem-Untersuchung durchgeführt – in beiden Fällen mit 5 Hühnern. Die Hühner wurden auf Luftsackschäden, Eierstockdegeneration und die Anzahl der Tiere untersucht, aus denen *M. gallisepticum* isoliert werden konnte. Die Ergebnisse wurden reproduziert, wie das im Beispiel 2 unter a, b bzw. c beschrieben wird.

Die Ergebnisse werden in den untenstehenden Tabellen gezeigt.

Infektion von 27 Wochen alten Hühnern

Verabreicht	Tage nach der Verabreichung	Luftsack-schäden	Eierstock-degenerat.	Reisolat. (%)
R-Stamm	10	3,0	3,0	100
Intervet 6/85	10	0,6	0,2	40
–		0,0	0,0	0
R-Stamm	24	1,0	0,6	100
Intervet 6/85	24	0,0	0,2	40
–		0,0	0,0	0

Infektion von 32 Wochen alten Hühnern

Verabreicht	Tage nach der Verabreichung	Luftsack-schäden	Eierstock-degenerat.	Reisolat. (%)
R-Stamm	10	3,2*	2,5	100
Intervet 6/85	10	0,3	0,8	17
–		0,0	0,0	0

* Durchschnitt von 6 Hühnern.

Infektion von 35 Wochen alten Hühnern

Verabreicht	Tage nach der Verabreichung	Luftsack-schäden	Eierstock-degenerat.	Reisolat. (%)
R-Stamm	10	2,8	2,8	100
Intervet 6/85	10	0,2	1,4	20
F-Stamm	10	2,0	1,6	100
–		0,0	0,1	0
R-Stamm	24	0,6	0,8	100
Intervet 6/85	24	0,0	0,0	0
F-Stamm	24	0,6	0,4	80
–		0,0	0,0	0

Infektion von 39 Wochen alten Hühnern

Verabreicht	Tage nach der Verabreichung	Luftsack-schäden	Eierstock-degenerat.	Reisolat. (%)
R-Stamm	10	2,2	2,4	100
Intervet 6/85	10	0,0	0,8	0
F-Stamm	10	2,0	1,4	20
–	(40 Wo. alt)	0,0	0,4	0

Aus den obenstehenden Daten geht hervor, daß der Stamm Intervet 6/85 erheblich geringere Luftsack- und Eierstockschäden erzeugt als sowohl der F- wie auch der R-Stamm.

Außerdem wird offensichtlich, daß der Stamm Intervet 6/85 in den infizierten Hühnern nach etwa 4 Wochen nicht mehr feststellbar ist, während sowohl der R- als auch der F-Stamm zu diesem Zeitpunkt tatsächlich noch häufig nachgewiesen werden konnte.

Ähnliche Experimente sind mit vier Wochen alten weißen Truthühnern durchgeführt wurden. Die Ergebnisse werden in nachstehender Tabelle gegeben.

Verabreicht	Tage nach der Verabreichung	Luftsackschäden	Reisolation (%)
R-Stamm	10	3,2	100
Intervet 6/85	10	0,2	100
F-Stamm	10	2,6	100
–	(5 1/2 Wo. alt)	0,4	0
R-Stamm	28	3,75	100
Intervet 6/85	28	0,5	0
F-Stamm	28	2,6	100
–	(8 Wo. alt)	0,2	0

Es ist bekannt, daß Truthühner besonders anfällig gegen *M. gallisepticum* sind, selbst gegenüber relativ wenig virulenten Stämmen, wie dem F-Stamm, die bei Hühnern als Vakzin-Stämme verwendet werden.

Die obigen Ergebnisse zeigen jedoch, daß der neue Stamm Intervet 6/85 für Truthühner ebenfalls nur sehr wenig virulent ist und tatsächlich keine Schäden erzeugt.

Der Stamm Intervet 6/85 wurde auch auf Reversion zu Virulenz untersucht. Zu diesem Zweck wurde der Stamm fünfmal Hühnern zugeführt, wobei das durch „Trachealtupfer“ reisolierte Mykoplasma jeweils neuen Hühnern verabreicht wurde. Die Ergebnisse werden unten in der Tabelle gezeigt. Selbst nach fünf Wiederholungen wurde keine Virulenz festgestellt.

Verabreicht	Durchgang Nr.	Tage nach Verabr.	Alter (Wo.)	Luftsack-schäden	Eierstock-degen.	Reisola-tion (%)
Intervet 6/85	2	10	29	0,75	1,2	66
			29	0,25	0,0	0
Intervet 6/85	3	10	35	0,0	1,0	20
Intervet 6/85	0	10	35	0,2	1,4	20
R-Stamm	0	10	35	2,8	2,6	100
–			35	0,0	0,1	0
Intervet 6/85	4	10	39	0,4	1,4	20
Intervet 6/85	0	10	39	0,0	0,8	0
R-Stamm	0	10	39	2,2	2,4	100
–			39	0,0	0,4	0
Intervet 6/85	5	10	41	0,4	1,4	20
R-Stamm	0	10	41	2,2	2,2	100
–			41	0,0	0,4	0

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1:

Herstellung eines Lebendvazins

Eine Menge von etwa 1 ml Brutmaterial des Stammes Intervet 6/85 von *Mykoplasma gallisepticum* wird in 10 ml modifiziertem Adler-Medium rekonstituiert und bei 37°C inkubiert.

Nachdem ein ausreichendes Wachstum erfolgt ist, was auf der Grundlage der Farbänderung eines Indikators, der zugesetzt wurde (Phenolrot) eingeschätzt wurde, wird die Suspension in einem Volumenverhältnis von 1:20 in ein frisches, modifiziertes Adler-Medium inokuliert und erneut in der beschriebenen Weise inkubiert.

Diese Skalierung nach oben wird so lange fortgesetzt, bis man ein Inokulum erhält, das ausreichend groß ist, um den zu verwendenden Fermenter zu inokulieren (für 100-l-Fermenter werden etwa 5 l Inokulum gebraucht).

Nach der Inokulation des Fermenters erfolgt über eine Zeitspanne von 24 bis 30 Stunden bei einem pH-Wert von 7,5 die Inkubation, wobei die Temperatur 37°C beträgt und mit einer konstanten Rührgeschwindigkeit und mit Belüftung gearbeitet wird.

Dann werden die Zellen durch Zentrifugieren aufgefangen und in Magermilch (10%) aufgenommen, der Ampicillin zugesetzt worden war.

Nach dem Einfüllen in geeignete Phiole wird das Vakzin gefriergetrocknet, und anschließend werden die Phiole versiegelt.

Beispiel 2:

Impfungsexperimente mit Hühnern

Zwei Gruppen von 10 Hühnern wurden nach der Aerosolmethode mit dem F-Stamm bzw. dem Stamm Intervet 6/85 geimpft und in Isolationskäfige mit vermindertem Druck gebracht.

Zwei Wochen später wurden die beiden Gruppen und eine ungeimpfte Kontrollgruppe mit dem virulenten R-Stamm infiziert und 10 Tage später getötet. Luftsackschäden, Eierstockdegeneration und die relative Menge von *M. gallisepticum*, die in den getöteten Tieren vorhanden war, wurde auf die unten beschriebene Weise bestimmt:

a) Die Abstufungen bei der Luftsackschädigung wurden folgendermaßen klassifiziert:

- 0 = klarer Luftsack ohne lymphofollikuläre Schäden;
- 1 = leichte Trübung in einem der beiden Luftsäcke oder lymphofollikuläre Schäden in einem oder beiden der Luftsäcke;
- 2 = wie 1, aber in diesem Fall in beiden Luftsäcken oder intensive Trübung in einem oder beiden der Luftsäcke oder käseartige Sekretion an einem oder beiden der Luftsäcke oder einer oder beiden der Luftsäcke sind dick und fleischig geworden;
- 3 = beide Luftsäcke intensiv trübe oder käseartige Sekretion oder verdickt und fleischig;
- 4 = Kombination der Symptome unter 3.

b) Der Grad der Eierstockdegeneration wurde folgendermaßen klassifiziert:

- 0 = aktive Eierstöcke ohne Degeneration;
- 1 = einige der Follikel im Eierstock degeneriert;
- 2 = alle Follikel degeneriert und einige mit Blutungen;
- 3 = alle Follikel mit Blutungen degeneriert.

c) Es wurde die Anzahl der Hühner bestimmt, aus denen wieder *Mykoplasma gallisepticum* isoliert werden konnte. Sie wurde als Prozentsatz der Gesamtzahl der Hühner in den jeweiligen Gruppen ausgedrückt.

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Experimente nach der Impfung von Hühnern unterschiedlichen Alters werden unten beschrieben.

I. Impfung von 27 Wopchen alten Hühnern

Gruppe	Luftsack- schäden	Eierstock- degeneration	Reisolation* (%)
Impfung mit Intervet 6/85 plus Infektion mit R-Stamm	1,0	0,5	80
Keine Impfung, aber Infektion mit R-Stamm	3,0	2,8	100
Impfung mit Intervet 6/85, keine Infektion mit R-Stamm	0,0	0,2	40
Keine Impfung, keine Infektion mit R-Stamm	0,0	0,0	0

* Es wurde keine Unterscheidung zwischen R-Stamm und Stamm Intervet 6/85 vorgenommen.

II. Impfung von 35 Wochen alten Hühnern

Gruppe	Luftsack- schäden	Eierstock- degeneration	Reisolation* (%)
Impfung mit Intervet 6/85 plus Infektion mit R-Stamm	1,2	2,0	100
Impfung mit F-Stamm plus Infektion mit R-Stamm	1,0	1,0	100
Keine Impfung, aber Infektion mit R-Stamm	2,4	2,6	100
Impfung mit Intervet 6/85, keine Infektion	0,0	0,0	0
Impfung mit F-Stamm, keine Infektion	0,6	0,4	80
Keine Impfung, keine Infektion	0,0	0,0	0

* Es wurde keine Unterscheidung zwischen R-Stamm, F-Stamm und Stamm Intervet 6/85 vorgenommen.

III. Impfung von 39 Wochen alten Hühnern

Gruppe	Luftsack- schäden	Eierstock- degeneration	Reisolation* (%)
Impfung mit Intervet 6/85 plus Infektion mit R-Stamm	0,0	1,0	100
Impfung mit F-Stamm plus Infektion mit R-Stamm	1,4	1,4	80
Keine Impfung, aber Infektion mit R-Stamm	2,2	2,2	100
Keine Impfung, keine Infektion	0,0	0,4	0

* Es wurde keine Unterscheidung zwischen R-Stamm, F-Stamm und Stamm Intervet 6/85 vorgenommen.

Aus diesen Experimenten kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß der Stamm Intervet 6/85 Schutz vor Luftsackschäden und Eierstockdegenerierung infolge einer ernsthaften Infektion bieten kann, welcher vergleichbar ist mit dem durch den F-Stamm erreichten Schutz.

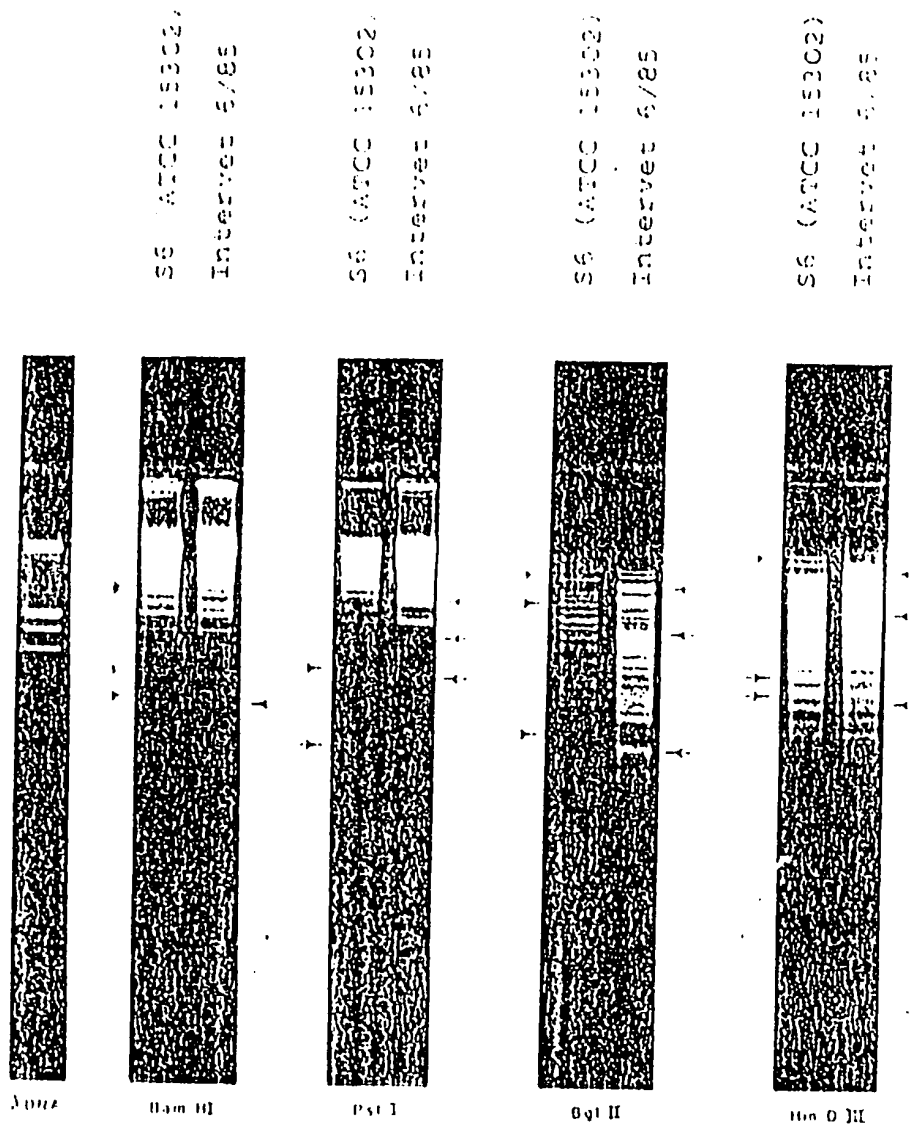


FIGURE 1