

**Übersetzung der neuen europäischen
Patentschrift**

(12)

(97) Veröffentlichungsnummer: EP 1651260

(96) Anmeldenummer: 2004778282
(96) Anmeldetag: 15.07.2004
(45) Ausgabetag: 15.12.2022

(51) Int. Cl.: **A61K 39/02** (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(30) Priorität:
25.07.2003 US 490001 P beansprucht.

(97) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
03.05.2006 Patentblatt 06/18

(97) Bekanntmachung des Hinweises auf die
Patenterteilung:
09.09.2009 Patentblatt 09/37

(97) Hinweis auf Einspruchsentscheidung:
27.06.2018 Patentblatt 18/26

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB
GR HU IE IT LI LU MC NL PL PT RO SE SI SK
TR

(56) Entgegenhaltungen:
Die Entgegenhaltungen entnehmen Sie bitte der
entsprechenden europäischen Druckschrift.

(73) Patentinhaber:
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
ST. JOSEPH MO 64506-2002 (US)

(72) Erfinder:
ROOF, MICHAEL, B
AMES, IA 50016 (US)
KROLL, JEREMY, J.
URBANDALE, IW 50323 (US)
KNITTEL, JEFFREY, P.
MELBOURNE, FL 32934 (US)

(74) Vertreter:
SONN Patentanwälte OG
1010 Wien (ÖSTERREICH)

(54) **LAWSONIA INTRACELLULARIS EUROPÄISCHEN URSPRUNGS UND VAKZINE, DIAGNOSTIKA UND ANWENDUNGSVERFAHREN DAFÜR**

Technischer Hintergrund

Die vorliegende Erfindung betrifft *Lawsonia intracellularis*-Impfstoffe und beschreibt Verfahren zum Schützen gegen eine *L. intracellularis*-Infektion und zur Diagnose derselben. Die Produkte und Verfahren der Erfindung sind zum Teil das Ergebnis eines verbesserten Verfahrens zur Züchtung von *L. intracellularis* im Großmaßstab, wozu sowohl ein neues Isolat von *L. intracellularis* europäischen Ursprungs als auch ein Verfahren zur Herstellung eines lyophilisierten Produkts, das das attenuierte europäische Isolat als Impfstoffprodukt enthält, gehören.

L. intracellularis, der Erreger von porziner proliferativer Enteropathie ("PPE") befällt praktisch sämtliche Tiere, einschließlich Kaninchen, Frettchen, Hamster, Füchse, Pferde und so verschiedenartige andere Tiere, wie Strauße und Emus. *L. intracellularis* ist insbesondere für große Verluste in Schweineherden in Europa und in den Vereinigten Staaten verantwortlich.

Ein übereinstimmendes Merkmal von PPE ist das Auftreten von intrazytoplasmatischen, nicht-membrangebundenen, gekrümmten Bazillen innerhalb von Enterozyten in betroffenen Darmbereichen. Die mit PPE assoziierten Bakterien werden als "Campylobacter-artige Organismen" bezeichnet; S. McOrist et al., Vet. Pathol., Bd. 26 (1989), S. 260-264. Später wurden die Erregerbakterien als eine neue taxonomische Gattung und Spezies identifiziert und lokal als "*Ileal symbiont (IS) intracellularis*" bezeichnet; C. Gebhart et al., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Bd. 43, Nr. 3 (1993), S. 533-538. In jüngerer Zeit erhielten diese neuartigen Bakterien die taxonomische Bezeichnung *Lawsonia (L.) intracellularis*; S. McOrist et al., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Bd. 45, Nr. 4, (1995), S. 820-825. Diese drei Namen werden in austauschbarer Weise zur Bezeichnung des gleichen Organismus, der nachstehend weiter identifiziert und beschrieben wird, verwendet.

L. intracellularis ist ein abgeplattetes, intrazelluläres Bakterium, das nicht durch normale bakteriologische Methoden auf herkömmlichen zellfreien Medien gezüchtet werden kann und von dem man annimmt, dass es für sein Wachstum an Epithelzellen haften muss. S. McOrist et al., Infection and Immunity, Bd. 61, Nr. 19 (1993), S. 4286-4292, und G. Lawson et al., J. of Clinical Microbiology, Bd. 31, Nr. 5 (1993), S. 1136-1142 erörtern die Züchtung von *L. intracellularis* unter Verwendung von intestinalen IEC-18-Ratten-Epithelzellen-Monolayers in herkömmlichen Gewebekulturflaschen. Ferner erörtert H. Stills, Infection and Immunity, Bd. 59, Nr. 9 (1991), S. 3227-3236, die Verwendung von humanen, embryonalen, intestinalen "Intestine 407"-Zellmonolayers und Meerschweinchen-Kolon-Adenokarzinom-GPC-16-Zellmonolayers in herkömmlichen Gewebekulturflaschen.

Kürzlich wurde ein *L. intracellularis*-Impfstoff zur Verwendung in den Vereinigten Staaten zugelassen. Dieser Impfstoff beruht auf *L. intracellularis*-Isolaten, die in den US-Patenten 5 714 375 und 5 885 823 beschrieben und beansprucht sind. Der vorstehend beschriebene Impfstoff wird von Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph,

Missouri 64506-2002, unter der Marke ENTERISOL^R-Ileitis vertrieben und enthält lebende, attenuierte *L. intracellularis*-Bakterien nordamerikanischen Ursprungs.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

Eine Aufgabe der Erfindung ist es, einen verbesserten *L. intracellularis*-Impfstoff unter Verwendung eines Isolats europäischen Ursprungs bereitzustellen.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes Verfahren zum Züchten von *L. intracellularis* im Großmaßstab sowie verbesserte Techniken zur Herstellung von *L. intracellularis*-Impfstoffen bereitzustellen.

Zur Lösung dieser und anderer Aufgaben und in Übereinstimmung mit den hier dargestellten und ausführlich beschriebenen Zielen der Erfindung werden ein neu isoliertes *L. intracellularis* aus Europa, ein Verfahren zum Attenuieren eines derartigen Isolats und das attenuierte Isolat bereitgestellt. Ferner wird ein Impfstoff, der das attenuierte Isolat umfasst, bereitgestellt. Außerdem werden ein Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes, der das attenuierte Isolat in lyophilisierter Form zur Rekonstitution zum Zeitpunkt der Verabreichung aufweist, sowie das entsprechende lyophilisierte Produkt bereitgestellt.

Gemäß einer Ausführungsform handelt es sich beim neu isolierten *L. intracellularis* aus Europa um das Isolat DK 15540, das bei der ATCC unter der Hinterlegungsnummer PTA-4927 hinterlegt worden ist. Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird das vom Isolat DK 15540 abgeleitete attenuierte Isolat als Isolat B3903 mit der ATCC-Hinterlegungsnummer PTA-4926 bezeichnet.

Ausführliche Beschreibung

Der hier verwendete Ausdruck "*L. intracellularis*" bedeutet das intrazelluläre, gekrümmte, gram-negative Bakterium, das von C. Gebhart et al., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Bd. 43, Nr. 3 (1993), S. 533-538, und von S. McOrist et al., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Bd. 45, Nr. 4 (1995), S. 820-825 (diese Druckschriften werden jeweils vollständig durch Verweis zum Gegenstand der Beschreibung gemacht) beschrieben wird und umfasst folgendes (ohne Beschränkung hierauf): das Isolat mit der Bezeichnung DK15540, das gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrags bei der American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, am 9. Januar 2003 unter der ATCC-Hinterlegungsnummer PTA-4927 hinterlegt worden ist; die bakteriellen Erreger, die von mit PPE infizierten Schweinen oder anderen Tieren weltweit auf der Grundlage des Fachwissens und der hier vermittelten Lehre erhalten werden können; und Varianten oder Mutanten beliebiger der vorstehenden Bakterien, die entweder spontan oder künstlich erhalten werden.

Der hier verwendete Ausdruck "attenuiertes Isolat" bedeutet ein beliebiges *L. intracellularis*-Isolat, das gemäß den hier vermittelten Züchtungs- und Passagetechniken zur Erreichung eines avirulenten Zustands unter Aufrechterhaltung von immunogenen Eigenschaften bei Verabreichung an ein Wirtstier hergestellt worden ist, einschließlich (ohne Beschränkung hierauf) das attenuierte Isolat mit der Bezeichnung B-3903, das gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrags bei

der American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 am 9. Januar 2003 unter der Hinterlegungsnummer PTA-4926 hinterlegt worden ist.

Das erfindungsgemäße attenuierte Isolat kann als ein Immunogen in antimikrobiellen Impfstoffen für Tiere, einschließlich Vögel, Fische und Säugetiere, wie Rinder, Schweine, Pferde und Primaten, verwendet werden. Derartige Impfstoffe lassen sich bei Kenntnis der hier vermittelten Lehre durch dem Fachmann geläufige Techniken herstellen. Ein derartiger Impfstoff umfasst eine immunologisch wirksame Menge des attenuierten Isolats in einem pharmazeutisch verträglichen Träger. Der Impfstoff kann in einer oder mehreren Dosen verabreicht werden. Eine immunologisch wirksame Menge lässt sich ohne unzumutbaren Aufwand bei Berücksichtigung der hier vermittelten Lehre durch dem Fachmann geläufige Maßnahmen festlegen. Die Menge der avirulenten Bakterien soll ausreichen, eine Immunantwort bei gegenüber der Krankheit empfindlichen Tieren hervorzurufen, wobei noch ein avirulenter Zustand erhalten bleibt. Diese Menge hängt jeweils von den speziellen Umständen hinsichtlich Tier, Bakterium und Krankheit ab. Die empfohlene Dosis zur Verabreichung an ein empfindliches Tier beträgt vorzugsweise etwa 3,0 TCID₅₀ (50 %-Gewebekultur-Infektionsdosis, Endpunkt)/Dosis bis etwa 6,0 TCID₅₀/Dosis und insbesondere etwa 4,0 TCID₅₀/Dosis bis etwa 5,0 TCID₅₀/Dosis. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform beträgt der Titer des Impfstoffes etwa 4,9 TCID₅₀/Dosis, bei Bestimmung gemäß dem 50 %-Gewebekultur-Infektionsdosis-Endpunktverdünnungstest (TCID₅₀). Bei den Trägern handelt es sich um dem Fachmann geläufige Produkte. Sie umfassen Stabilisatoren und Verdünnungsmittel. Ein derartiger Impfstoff kann auch ein geeignetes Adjuvans enthalten. Die erfindungsgemäßen Impfstoffe können zusammen mit anderen Impfstoffen verwendet werden, z. B. als Verdünnungsmittel eines anderen Impfstoffes. Die Impfstoffpräparate können auch beispielsweise durch Gefriertrocknung für Lagerungszwecke oder für die anschließende Zubereitung zu flüssigen Impfstoffen getrocknet werden.

Demzufolge umfasst die Offenbarung auch ein Verfahren zur Induktion einer Immunantwort gegen virulente Wildtyp-*L. intracellularis*-Bakterien bei einem Wirtstier, und zwar mit dem Ziel, den Wirt vor derartigen Bakterien zu schützen. Das Verfahren umfasst die Verabreichung einer immunologisch wirksamen Menge der erfindungsgemäßen attenuierten Bakterien an den Wirt und vorzugsweise die Verabreichung des erfindungsgemäßen Impfstoffes an den Wirt.

Der hier verwendete Ausdruck "Züchtung im Großmaßstab" bedeutet einen Umfang der Züchtung von *L. intracellularis* in einer Menge von mehr als etwa 2,0 bis 3,0 Liter und umfasst die Herstellung in einem Maßstab von 100 Litern oder mehr. Der hier verwendete Ausdruck "Züchtung" bedeutet das Verfahren zur Förderung des Wachstums, der Reproduktion und/oder Proliferation von *L. intracellularis*.

L. intracellularis kann nach dem Fachmann geläufigen Verfahren gezüchtet werden, vorzugsweise gemäß den US-Patenten 5 714 375 und 5 885 823. Beispielsweise können Kulturzellen zunächst mit einem Inokulum, das *L. intracellularis*-Bakterien umfasst, inokuliert werden, um die Zellen mit den Bakterien zu infizieren. Bei der praktischen Ausübung der

Erfindung können zahlreiche Zelllinien verwendet werden, einschließlich (ohne Beschränkung hierauf) IEC-18 (ATCC 1589) - Ratten-Darmepithelzellen, HEp-2 (ATCC 23) - humane, epidermoide Karzinomzellen, McCoys (ATCC 1696) - (unspezifizierte) Mäusezellen, BGMK (Biowhittaker #71-176) - "Buffalo Green Monkey Kidney"-Zellen und intestinale Epithelzellen von Schweinen. Die bevorzugten Kulturzellen sind HEp-2-, McCoys- oder IEC-18-Zellen.

Wenn Kulturzellen verwendet werden, können die Zellen vor der Inokulation in Form einer Monolayer vorliegen. Um eine Monolayer zu bilden, können die Zellen auf herkömmliche Flaschen überimpft werden. Jede Flasche wird im Allgemeinen mit 1×10^5 Zellen bis etwa 10×10^5 Zellen pro 25, 75, 150 oder 850 cm²-Flasche oder Rollflasche im Gemisch mit Wachstumsmedium beimpft. Beim Wachstumsmedium kann es sich um ein beliebiges Medium für die Zellzüchtung handeln, das eine Stickstoffquelle, für die gewählten Kulturzellen notwendige Wachstumsfaktoren und eine Kohlenstoffquelle, wie Glucose oder Lactose, enthält. Beim bevorzugten Medium handelt es sich um DMEM mit 1-5 % fötalem Kälberserum, das mit Ham F12 verstärkt ist, obgleich auch andere handelsübliche Medien unter Erzielung von guten Ergebnissen eingesetzt werden können.

Eine erfolgreiche Züchtung von *L. intracellularis* wird durch Aufrechterhaltung der Kulturzellen in einem konstanten Wachstumszustand verstärkt. Daher soll die Kulturzellen-Monolayer zum Zeitpunkt der Inokulation bei etwa 20 % bis etwa 50 % Konfluenz vorliegen. Vorzugsweise sollen die Zellen zum Zeitpunkt der Inokulation bei einer Konfluenz von etwa 30 % bis etwa 40 % und insbesondere bei etwa 30 % vorliegen.

Alternativ können die Zellen vor der Inokulation in Suspension gezüchtet werden, wie nachstehend ausgeführt wird. Vorzugsweise werden die Zellen zunächst bis zu 100 % Konfluenz in Form einer Monolayer in einem System vom Hafttyp, z. B. einem Rollflaschensystem, gezüchtet und sodann auf 3-3000 Liter übertragen und in Suspension gezüchtet. Alternativ können die Zellen in Suspension bis zur angestrebten Zelldichte, z. B. 2×10^5 Zellen/ml, innerhalb des Gefäßes mit einem Fassungsvermögen von 3-3000 Liter (Bioreaktor, Fermenter, Rührflasche und dergl.) unter Anwendung von für das Wachstum in diesem System geeigneten Parametern vor der Inokulation gezüchtet werden.

Beim Inokulum kann es sich um eine reine Kultur von *L. intracellularis* handeln, die beispielsweise von infizierten Schweinen oder anderen Tieren erhalten worden ist. Vorzugsweise handelt es sich beim Inokulum um eine reine Kultur von *L. intracellularis*, die beispielsweise aus der ATCC-Hinterlegung PTA-4927 erhalten worden ist.

Beim Inokulum kann es sich um ein intestinales Homogenisat handeln, das durch Abschaben der Schleimhaut vom Ileum eines Schweins oder eines anderen Tiers, die mit PPE infiziert sind, hergestellt worden ist. Bei der Herstellung eines intestinalen Homogenisats zeigen für die Kultur ausgewählte ileale Schnitte schwere Läsionen mit groben Verdickungen des Darms. Aufgrund der fragilen Natur der Bakterien sollen die Proben nach der Nekropsie so rasch wie möglich vorzugsweise bei -70 °C aufbewahrt werden. Ein Antibiotikum, gegen das *L. intracellularis* resistent ist, z. B. Vancomycin, Amphotericin B oder Mitglieder der Aminoglycosid-Gruppe von

Antibiotika, einschließlich Gentamicin und Neomycin, um nur einige aufzuführen, wird vorzugsweise dem Inokulum zugesetzt, um verunreinigende Bakterien zu unterdrücken, während das Wachstum von *L. intracellularis* zugelassen wird. Unabhängig davon, ob es sich beim Inokulum um eine reine Kultur oder um ein intestinales Homogenisat handelt, kann eine Inokulation der Kulturzellen nach verschiedenen Techniken, die aus dem Stand der Technik unter Berücksichtigung der hier vermittelten Lehre bekannt sind, durchgeführt werden.

Die Bakterien und/oder inokulierten Kulturzellen werden sodann bei einer verringerten Konzentration an gelöstem O₂ inkubiert. Bei Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff von mehr als 10 % ergibt sich kein optimales Wachstum von *L. intracellularis*, wobei es bei Sauerstoffkonzentrationen außerhalb dieses Bereiches schließlich zum Wachstumsstillstand kommt. Vorzugsweise werden die inokulierten Kulturzellen bei einer Konzentration von gelöstem Sauerstoff im Bereich von etwa 0 bis etwa 10 % inkubiert. Insbesondere werden die Bakterien und/oder Zellen bei einer Sauerstoffkonzentration im Bereich von etwa 0 bis etwa 8 % inkubiert, wobei eine Sauerstoffkonzentration von etwa 0 bis etwa 3,0 % besonders bevorzugt wird.

Die geeignete Konzentration an Kohlendioxid ist ebenfalls für das einwandfreie Wachstum von *L. intracellularis* wichtig. Bei Kohlendioxidkonzentrationen von mehr als 0 % und weniger als 4 % erfolgt kein optimales Wachstum, wobei bei Kohlendioxidkonzentrationen außerhalb dieses Bereiches schließlich ein Wachstumsstillstand eintritt. Vorzugsweise liegt die Kohlendioxidkonzentration im Bereich von etwa 6 bis etwa 10 %, wobei eine Kohlendioxidkonzentration von etwa 8,8 % besonders bevorzugt wird.

Ferner werden die Zellen vorzugsweise bei einer Wasserstoffkonzentration im Bereich von etwa 4 % bis etwa 10 % inkubiert. Insbesondere werden die Zellen bei etwa 0 bis etwa 8 % O₂, etwa 8,8 % CO₂ und etwa 4 % H₂ inkubiert. Stickstoff wird als "Rest" im Gasgemisch, das Stickstoff (96 %) und Wasserstoff (4 %) oder Stickstoff (80 %), Kohlendioxid (10 %) und Wasserstoff (10 %) enthält, für das Wachstum dieses Organismus verwendet. Die Zellen werden vorzugsweise bei einer Stickstoffkonzentration im Bereich von etwa 80 bis 96 % inkubiert. Daher werden die Zellen insbesondere bei etwa 0 bis etwa 8 % O₂, etwa 8,8 % CO₂, etwa 4 % H₂ und etwa 96 % N₂ inkubiert.

Inokulierte Zellen können in einem dualen Gasinkubator oder in anderen Gaskammern inkubiert werden, die die geeigneten Konzentrationen an Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlendioxid enthalten und die es erlauben, die Zellen während der Inkubation in Suspension zu halten. Die Kammer soll Mittel, um die inokulierten Zellen in Suspension zu halten, und einen Gasmonitor und eine Gaszufuhrquelle zur Zufuhr und Aufrechterhaltung der geeigneten Gaskonzentrationen umfassen. Die Inkubationstemperaturen sollen im Bereich von 30 bis etwa 45 °C und vorzugsweise im Bereich von etwa 36 bis etwa 38 °C liegen. Insbesondere beträgt die Temperatur etwa 37 °C. Die erforderliche Ausrüstung für die erfindungsgemäßen Züchtungs- und Attenuierungsverfahren sind für den Fachmann bei Kenntnis der hier vermittelten Lehre leicht zugänglich. Ein Beispiel für eine Ausrüstung, die zur Ausübung der vorliegenden Erfindung geeignet ist, ist ein dualer

Gasinkubator, z. B. das Modell 480 (Lab-Line, Melrose Park, IL), in Verbindung mit Rührflaschen, um die Zellen in Suspension zu halten. Die derzeit bevorzugte Ausrüstung umfasst einen Fermenter, einen Bioreaktor, eine Rührplatte oder einen Drehschüttler, die mindestens etwa 2 Liter Medium enthalten und dazu befähigt sind, die Kulturzellen durch Einleiten von Gas der geeigneten Konzentration oder eine andere Einrichtung zum mechanischen Bewegen in Suspension zu halten und kontinuierlich die Konzentration an gelöstem O₂ im Medium zu überwachen. Für diesen Zweck geeignete Fermenter und Bioreaktoren werden von New Brunswick, Braun und anderen Firmen hergestellt.

Indem man die inokulierten Zellen während der Inkubation im suspendierten Zustand hält, lässt sich ein maximales Wachstum der Zellen und somit von *L. intracellularis* erreichen, wobei die Einwirkung des Wachstumsmediums und des geeigneten Gemisches aus Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlendioxid auf die einzelnen Zellen verstärkt wird. Die Kulturzellen können durch eine Reihe von aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren bewegt und in Suspension gehalten werden, wozu beispielsweise Kulturflaschen, Rollflaschen, Membrankulturen, Biobeutel, WAVE^R-Bioreaktorsysteme, Fermenter und Rührflaschen gehören. Die Zellen können während der Inkubation in Suspension gehalten werden, indem man die Zellen in einer Rührflasche im Innern eines dualen Gasinkubators oder einer ähnlichen Vorrichtung inkubiert. Der hier verwendete Ausdruck "Rührflasche" bedeutet eine Flasche oder einen anderen Behälter, der sich eines Rührarms, eines Propellers oder dergl. bedient, um die Kultur zu bewegen und die darin enthaltenen Zellen in Suspension zu halten.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die inokulierten Zellen so lange inkubiert, bis sie den konfluenten Zustand erreichen. Anschließend werden die Zellen in eine Rührflasche, die Wachstumsmedium enthält, gegeben und in einem dualen Gasinkubator unter Rühren der Flasche inkubiert. Vorzugsweise werden die inokulierten Zellen abgeschabt oder trypsiniert und in die Rührflasche gebracht. Dies kann durch eine Vielzahl von aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren erreicht werden, z. B. unter Verwendung eines Zellschabers zum Ablösen der Zellen. Nachdem die Zellen in die Rührflasche gebracht worden sind, wird der Rührarm der Rührflasche typischerweise mit etwa 5 bis etwa 500 U/min auf einem Magnetrührer rotiert, um die infizierten Zellen in Suspension zu halten.

Ein Teil des gezüchteten *L. intracellularis* wird sodann auf frische Kulturzellen passagiert, um die Erzeugung der *L. intracellularis*-Bakterien zu verstärken. Der Ausdruck "Passagieren" oder Variationen davon bedeuten den Vorgang des Übertragens eines Teils des gezüchteten *L. intracellularis* auf frische Kulturzellen, um die frischen Zellen mit dem Bakterium zu infizieren. Der hier verwendete Ausdruck "frisch" bedeutet Zellen, die noch nicht mit *L. intracellularis* infiziert worden sind. Vorzugsweise weisen derartige Zellen durchschnittlich ein Alter von nicht mehr als etwa 1 Tag auf.

Die Passage von *L. intracellularis* in Suspensionskulturen kann erreicht werden, indem man einen Teil der ursprünglichen Kultur entnimmt und diesen Teil auf eine neuen Flasche, die frische

Kulturzellen enthält, überträgt. Wenn die ursprüngliche Kultur eine große Anzahl an Bakterien/ml aufweist, z. B. mehr als etwa 10^4 Bakterien/ml, ist es bevorzugt, etwa 1 bis 10 % (Vol./Vol.) Kultur aus der infizierten Flasche in eine neue Flasche mit einem Gehalt an frischen Zellen zu übertragen. Dies wird vorzugsweise durchgeführt, wenn 50-100 % der Zellen infiziert sind. Wenn weniger als 50 % der Zellen infiziert sind, wird eine Passage vorzugsweise durchgeführt, indem man die Kultur im Verhältnis 1:2 auf eine neue Flasche aufteilt und das Volumen durch Zugabe von frischen Gewebekulturzellen und frischem Medium vergrößert. In beiden Fällen sind eine Lysis von Zellen und andere Stufen nicht erforderlich, in direktem Gegensatz zur Passage von Monolayer-Kulturen gemäß dem Stand der Technik.

Nach einem ausreichenden Wachstum der Kulturzellen und einer anschließenden Infektion durch *L. intracellularis* gemäß Bestimmung durch indirekte Fluoreszenz-Antikörper (IFA)-Färbung, TCID₅₀ oder ein anderes vergleichbares Verfahren wird mindestens ein Teil der gezüchteten *L. intracellularis*-Bakterien geerntet. Die Ernte wird typischerweise bei einer Zellinfektiosität von etwa 60 % oder mehr durchgeführt, wobei jedoch der Fachmann weiß, dass die Ernte auch bei einer Zellinfektiosität von weniger als 60 % durchgeführt werden kann. Der Ernteschritt kann durchgeführt werden, indem man die Bakterien von der Suspension durch verschiedene Techniken, die für den Fachmann angesichts der hier vermittelten Lehre ersichtlich sind, trennt. Vorzugsweise werden die *L. intracellularis*-Bakterien geerntet, indem man den Inhalt der Gesamtheit der Suspension oder eines Teils davon zentrifugiert, um die Kulturzellen zu pelletisieren, die erhaltenen Zellpellets resuspendiert und die infizierten Zellen lysiert. Typischerweise wird mindestens ein Teil des Inhalts etwa 20 Minuten mit etwa $3\,000 \times g$ zentrifugiert, um die Zellen und Bakterien zu pelletisieren. Das Pellet kann anschließend beispielsweise in einer Saccharose-Phosphat-Glutamat (SPG)-Lösung resuspendiert werden und etwa 20-mal durch eine Nr. 25-Nadel geleitet werden, um die Lysis der Zellen vorzunehmen. Wenn eine weitere Reinigung angestrebt wird, können die Proben etwa 5 Minuten bei etwa $145 \times g$ zentrifugiert werden, um Zellkerne und Bruchstücke zu entfernen. Der Überstand kann anschließend etwa 20 Minuten mit etwa $3\,000 \times g$ zentrifugiert werden, wonach das erhaltene Pellet in einem geeigneten Verdünnungsmittel, wie SPG mit fötalem Kälberserum (zur Herstellung von geernteten Bakterien, die sich für die Lyophilisation, das Einfrieren oder zur Verwendung als Inokulans eignen) oder Wachstumsmedium (zur Herstellung von geernteten Bakterien, die sich besser für die Passage auf frische Zellen eignen), resuspendiert werden kann.

Wie vorstehend erwähnt, wird das effektive Wachstum von *L. intracellularis* für eine Herstellung im Großmaßstab verstärkt, indem man die Gewebzellen in einem aktiven Wachstumszustand hält. Bei Monolayers nimmt dann, wenn die Kulturen den konfluenten Zustand erreicht haben, die Geschwindigkeit der Zellteilung erheblich ab. Versuche zur Züchtung von *L. intracellularis* auf Monolayer-Gewebekulturen hatten nur begrenzten Erfolg und eine Vergrößerung des Produktionsmaßstabs war nicht möglich. Dagegen erleichtert es die Verwendung von Suspensionskulturen in erheblichem Maße, das aktive Wachstum der Zellen aufrechtzuerhalten,

und ermöglicht eine kontinuierliche Kulturerweiterung und Maßstabsvergrößerung. Unter Verwendung eines Fermenters und bei Anwendung einer Konzentration an gelöstem O₂ von etwa 0-3 % (wie vorstehend erläutert) wird ein Wachstum von bis zu 10⁸ Bakterien/ml ermöglicht.

Bei Verwendung von IEC-18-Zellen ist es bevorzugt, Gelatine, Agarose, Kollagen, Acrylamid oder Siliciumdioxidperlen, wie poröse Cultisphere-G-Mikroträger (HyClone Laboratories, Logan, Utah), zusammen mit dem Wachstumsmedium zuzusetzen. Jedoch erfordern HEp-2-Zellen und andere Zellen beim erfindungsgemäßen Verfahren keine Mikroträger.

Zu Kultur-Aufrechterhaltungszwecken werden bei HEp-2-Kulturen in wöchentlichen Abständen vorzugsweise 25-50 % der Kultur entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Für Zellkulturen mit Mikroträgern oder Perlen werden 1- bis 2-mal wöchentlich vorzugsweise 25-50 % der Kultur entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Zu Zwecken der Vergrößerung des Produktionsmaßstabs kann die Kultur mit weiteren 25-50 % Medium oder Medium zusammen mit Mikroträgern versetzt werden.

Je nach der Geschwindigkeit, mit der die Kulturzellen infiziert werden, erfolgt die Passage auf frische Zellen im Allgemeinen etwa alle 2 bis etwa alle 7 Tage. Unter der Annahme, dass die Kulturzellen innerhalb von 2 bis 7 Tagen zu mindestens 70 % infiziert werden, erfolgt die Passage etwa alle 5 bis 7 Tage.

Die vorliegende Erfindung stellt auch Impfstoffe und Verfahren zur Erzeugung von Impfstoffen gegen ein neues Isolat von *L. intracellularis* europäischen Ursprungs bereit. Vorzugsweise wird nach Aufrechterhaltung der infizierten Zellen in Suspension für eine längere Zeitspanne (z. B. 6 bis 8 Monate) mindestens ein Teil der gezüchteten *L. intracellularis*-Bakterien geerntet und auf eine potentielle Abschwächung geprüft. Eine derartige Prüfung wird vorzugsweise durch Belastung von Wirtstieren oder Tiermodellen durchgeführt, um ein attenuiertes Isolat auszuwählen. Derartige attenuierte Isolate werden gemäß den hier beschriebenen Verfahren in Impfstoffen verwendet.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht eine rasche Kulturexpansion, eine Ausbeutesteigerung von 100- bis 1 000-fach und eine Kostenverringerung zur Erzeugung von *L. intracellularis* europäischen Ursprungs. Infolgedessen werden die in reichlichem Umfang erzeugten *L. intracellularis*-Bakterien in einfacher Weise zur Impfstoffherstellung attenuiert. Das Verfahren zur Züchtung von *L. intracellularis* in Suspension bewirkt eine Steigerung der Einfachheit und der Geschwindigkeit der Züchtung sowie der Anzahl der für diesen Zweck verfügbaren Bakterien. Je mehr Zellen vorliegen und je häufiger Zellteilungen erfolgen, desto höher ist der Grad von auftretenden Mutationen, die bei der Impfstoffentwicklung vorteilhaft sind. Somit erhöht die Züchtung in Suspension die Expression von wichtigen Immunogenen, die durch umweltregulierte Gene und deren Expressionsprodukte gesteuert werden.

Die erhaltenen abgeschwächten Isolate können in Gewebekultur-Monolayers gezüchtet werden, werden aber vorzugsweise in Suspensionskulturen gezüchtet. Zu weiteren Maßnahmen zur Attenuierung können eine chemische Attenuierung gehören, beispielsweise unter Verwendung

von N-Methylnitrosoguanidin und anderen bekannten Maßnahmen. Unabhängig davon, ob Mehrfachpassagen oder chemische Maßnahmen ergriffen werden, wird attenuiertes *L. intracellularis* erzeugt und für die Impfstoffherstellung ausgewählt. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich beim erhaltenen attenuierten Isolat um das Produkt mit der ATCC-Hinterlegungsnummer PTA-4926.

Das Impfstoff-Antigen kann gemäß den vorstehenden Ausführungen durch Zentrifugation oder Mikrofiltration geerntet werden. Anschließend wird das Antigen auf einem definierten Niveau auf der Grundlage der optimalen Wirtstier-Immunantwort, die durch eine Dosistitration in der Wirtstierspezies festgelegt wird, standardisiert. Die Bakterien können durch bekannte Verfahren inaktiviert werden, z. B. unter Verwendung von 0,3 % Formalin oder anderer Inaktivierungsmittel, um einen abgetöteten Impfstoff herzustellen. Das Antigen wird sodann einem geeigneten Adjuvans, wie Aluminiumhydroxid oder Mineralöl, einverleibt, um die Immunantwort zu verstärken. Anschließend wird das Antigen zur Impfung des Wirts durch eine intramuskuläre oder subkutane Injektion verwendet, und zwar im Fall von Schweinen in einem Alter von etwa 3 bis 4 Wochen, wobei gegebenenfalls eine Auffrischungsdosis verabreicht wird.

Vorzugsweise werden die Bakterien einer seriellen Passage unterzogen, um eine attenuierte, avirulente, lebende Kultur zu induzieren und auszuwählen. Die Kultur wird im Wirtstier auf Anzeichen von Attenuierung getestet. Die Kultur wird gemäß den vorstehenden Angaben geerntet und lyophilisiert. Schweine werden beispielsweise auf oralem Wege mit 1×10^4 bis 1×10^6 Bakterien geimpft. Etwa 28 Tage nach der Impfung werden die Schweine oral mit etwa 1×10^7 Organismen einer weniger oft passagierten (weniger als 30 in vitro-Passagen nach der ursprünglichen Isolation aus dem intestinalen Homogenisat), virulenten Kultur von *L. intracellularis* inokuliert. Die infizierten Tiere werden 21 Tage nach der Belastung einer Nekropsie unterzogen und ihr Dünndarm wird durch Inspektion auf grobe Läsionen sowie auf mikroskopische Läsionen untersucht. Auch eine PCR- und indirekte Fluoreszenz-Antikörper-Analyse (IFA) oder eine immunohistochemische Untersuchung (IHC) sollten durchgeführt werden. Etwa 80 % der Kontrolltiere zeigen grobe oder mikroskopische Läsionen und ergeben einen positiven Test auf die Anwesenheit von *L. intracellularis* in den Schleimhautzellen des Dünndarms bei Anwendung von PCR-, IFA- oder IHC-Testverfahren. Geimpfte Tiere weisen normale Schleimhautoberflächen auf, wie durch histologische Begutachtung festgestellt wird, und erweisen sich beim PCR-Test 3 bis 4 Wochen nach der Inokulation als negativ.

Im Allgemeinen wird ein attenuiertes, immunogenes *L. intracellularis*-Isolat nach kontinuierlicher Züchtung von mindestens etwa 150 bis etwa 250 Tagen erzeugt, wobei während dieser Zeitspanne die Kultur mindestens etwa 50- bis 100-mal passagiert wird. Für den Fachmann ist es jedoch ersichtlich, dass weitere attenuierte Kulturen unter Variation dieser Zahlenwerte erzeugt werden können.

Das erfindungsgemäße Impfstoffprodukt kann lyophilisiert werden. Nach dem Ernten kann das Isolat durch verschiedene bekannte Verfahren eingeengt und mit einem Stabilisator, z. B.

einem Saccharose-Gelatine-Stabilisator, vermischt werden. Das Impfstoffprodukt kann sodann eingefroren und getrocknet (lyophilisiert) werden. Im Allgemeinen umfasst die Einfrierstufe eine lineare Abkühlung auf etwa $-45 \pm 3^\circ\text{C}$ und eine Haltezeit von etwa 150 Minuten bis etwa 480 Minuten. Die Trocknungsstufe kann primäre und sekundäre Trocknungsstufen umfassen. Beispielsweise kann die primäre Trocknungsstufe folgendes umfassen: (a) eine lineare Abkühlung auf etwa -30 bis etwa -5°C und eine Haltezeit von etwa 120 bis etwa 1 000 Minuten und gegebenenfalls (b) eine Abkühlung auf etwa -5 bis etwa 5°C und eine Haltezeit von etwa 150 bis etwa 2 000 Minuten. Die sekundäre Stufe umfasst im Allgemeinen eine lineare Abkühlung auf etwa $27 \pm 5^\circ\text{C}$ und eine Haltezeit von etwa 330 Minuten bis etwa 1 120 Minuten. Für den Fachmann ist es ersichtlich, dass diese Bereiche je nach den Bedingungen, z. B. je nach dem Ausgangsvolumen, angepasst werden können.

Anschließend wird ein Impfstoff hergestellt, der eine immunologisch wirksame Menge des attenuierten *L. intracellularis* in einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst. Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst ein Impfstoff das Produkt mit der ATCC-Hinterlegungsnummer PTA-4926 in einem pharmazeutisch verträglichen Träger. Beim kombinierten Produkt aus Immunogen und Träger kann es sich um eine wässrige Lösung, Emulsion oder Suspension handeln. Eine immunologisch wirksame Menge lässt sich durch aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren ohne unzumutbaren experimentellen Aufwand bei Berücksichtigung der hier vermittelten Lehre bestimmen. Im Allgemeinen beträgt die Menge des Immunogens 5 bis 5 000 μg und $10^{2,0}$ bis $10^{9,0}$ TCID₅₀, vorzugsweise $10^{3,0}$ bis $10^{6,0}$ TCID₅₀ und insbesondere $10^{4,0}$ bis $10^{5,0}$ TCID₅₀, wenn gereinigte Bakterien verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung umfasst auch Kombinationsimpfstoffe, die das attenuierte *L. intracellularis*-Isolat mit der ATCC-Hinterlegungsnummer PTA-4926 und antigenes Material von mindestens einem anderen Pathogen enthalten, einschließlich (ohne Beschränkung hierauf): *Salmonella* spp. (z. B. *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*), *Erysipelothrix* spp. (z. B. *Erysipelothrix rhusiopathiae*), *Haemophilus* spp. (z. B. *Haemophilus parasuis*), *Mycoplasma* spp. (z. B. *Mycoplasma hypopneumoniae*), *Leptospira* spp., *Clostridium* spp. (z. B. *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*), *Streptococcus* spp. (z. B. *Streptococcus suis*), *Brachyspira* spp. (z. B. *Brachyspira hyodysenteriae*), *Bordetella* (z. B. *Bordetella bronchiseptica*), *Pasteurella* spp. (z. B. *Pasteurella multocida*), Circovirus (z. B. porcines Circovirus Typ 2), PRRS-Virus (PRRS = porcines reproduktives und respiratorisches Syndrom), Schweine-Influenzavirus (SIV), Coronavirus (z. B. übertragbares Gastroenteritis (TGE)-Virus, porcines respiratorisches Coronavirus), Parvovirus oder *Escherichia coli*; sowie einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

Gemäß einer Ausführungsform umfasst der Kombinationsimpfstoff das attenuierte *L. intracellularis*-Isolat mit der ATCC-Hinterlegungsnummer PTA-4926 und antigenes Material von *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix* spp., *Clostridium* spp., *Brachyspira* spp., übertragbares Gastroenteritis (TGE)-Virus und *Escherichia coli*; sowie einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Antigenes Material aus *Clostridium* spp. kann (ohne Beschränkung hierauf) *Clostridium*

perfringens und *Clostridium difficile* umfassen. Antigenes Material aus *Erysipelothrix spp.* kann (ohne Beschränkung hierauf) *Erysipelothrix rhusiopathiae* umfassen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kombinationsimpfstoff das attenuierte *L. intracellularis*-Isolat mit der ATCC-Hinterlegungsnummer PTA-4926 und antigenes Material aus *Salmonella choleraesuis* und *Erysipelothrix spp.*; sowie einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kombinationsimpfstoff das attenuierte *L. intracellularis*-Isolat mit der ATCC-Hinterlegungsnummer PTA-4926 und antigenes Material aus *Salmonella choleraesuis* und *Erysipelothrix rhusiopathiae*; sowie einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kombinationsimpfstoff das attenuierte *L. intracellularis*-Isolat mit der ATCC-Hinterlegungsnummer PTA-4926 und antigenes Material von mindestens einem weiteren Pathogen, einschließlich (ohne Beschränkung hierauf): *Clostridium spp.* (z. B. *Clostridium tetani*), equines Influenza-Virus (EIV) (z. B. EIV-1, EIV-2), equines Herpes-Virus (EHV) (z. B. EHV-1, EHV-2, EHV-3, EHV-4, EHV-5, EHV-6, EHV-7), Alphavirus (z. B. östliches Enzephalitis-Virus, westliches Enzephalitis-Virus, venezolanisches Enzephalitis-Virus) oder West-Nil-Virus; sowie einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

Die erfindungsgemäßen Impfstoffe werden im Allgemeinen an empfindliche Tiere, vorzugsweise Schweine, in einer oder mehreren Dosen verabreicht. Der lebende oder abgetötete Impfstoff kann 1- oder 2-mal in Abständen von 2 Wochen verabreicht werden. Für die attenuierten Lebendimpfstoffe wird eine einzige Dosis bevorzugt. Bei den bevorzugten Verabreichungswegen für attenuierte, lebende Isolate handelt es sich um eine intramuskuläre, orale oder intranasale Verabreichung, wobei intramuskuläre und subkutane Injektionswege für den abgetöteten Impfstoff bevorzugt werden.

Eine wirksame Diagnose von PPE wurde bisher auch durch den Zeitaufwand, der für die Züchtung der Erregerbakterien erforderlich war, behindert. Als Ergebnis der vorliegenden Erfindung ist nunmehr die Entwicklung von diagnostischen Werkzeugen möglich, die rasche und genaue Tests auf die Anwesenheit von *L. intracellularis* in biologischen Proben, die Schweinen oder anderen gegenüber PPE empfindlichen Tieren entnommen worden sind, fördern.

Die erfindungsgemäßen *L. intracellularis*-Bakterien europäischen Ursprungs oder von derartigen Bakterien abgeleitete Komponenten können als ein Antigen in einem ELISA-Test oder einem anderen Immunoassay, z. B. im Immunofluoreszenz-Antikörpertest ("IFA"), verwendet werden, um Antikörper gegen *L. intracellularis* im Serum und anderen Körperflüssigkeiten von Tieren mit einem Verdacht einer Infektion mit den Bakterien verwendet werden. Beim derzeit bevorzugten Immunoassay handelt es sich um einen IFA-Test, der im nachstehenden Beispiel beschrieben wird. Alternativ können die erfindungsgemäßen Bakterien in einem Western-Blot-Test verwendet werden.

Das erfindungsgemäß bevorzugte ELISA-Verfahren wird nachstehend angegeben:

1. Es wird 0,1 ml/Vertiefung Antigen in Verdünnung in Beschichtungspuffer zugesetzt. Eine 18-stündige Inkubation bei 4 °C wird durchgeführt.

2. Es wird 3-mal mit PBS gewaschen.

3. 0,25 ml Blockierungspuffer werden in die einzelnen Vertiefungen der Platte gegeben. Es wird eine 1- bis 2-stündige Inkubation bei 37 °C durchgeführt.

4. Es wird 3-mal mit Waschpuffer gewaschen.

5. Serum wird im Blockierungspuffer verdünnt und in einer Menge von 0,1 ml zu den ersten Vertiefungen der Platte gegeben. Über die Platte hinweg werden 1:2-Reihenverdünnungen durchgeführt. Eine 1-stündige Inkubation bei 37 °C wird durchgeführt.

6. Es wird 3- bis 5-mal mit Waschpuffer gewaschen.

7. Konjugat wird in Blockierungspuffer verdünnt und in einer Menge von 0,1 ml in die Vertiefungen der Platte gegeben und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

8. Es wird 3- bis 5-mal mit Waschpuffer gewaschen.

9. Substrat wird zugegeben.

10. Die Absorption von Licht wird mit einem Spektrophotometer gemessen.

11. Vertiefungen, die nicht mit Antigen versetzt worden sind, werden als Leerwerte verwendet.

12. Positives und negatives Schweinekontrollserum sollte ebenfalls bei jedem Test eingesetzt werden.

Nachstehend wird das bevorzugte Western-Blot-Verfahren angegeben:

1. Man lässt Antigen an 12 % SDS-PAGE laufen und überträgt es auf eine Nitrocellulose-Membran.

2. Man gibt die Membran 2 Stunden in Blockierungspuffer.

3. Man entfernt den Blockierungspuffer und spült 1 Minute mit PBS.

4. Serum wird in Blockierungspuffer verdünnt und zur Membran gegeben. Es wird eine 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur durchgeführt.

5. Es wird 3-mal mit Waschpuffer gewaschen (5 Minuten für jeden Waschvorgang).

6. Konjugat wird in Blockierungspuffer verdünnt und zur Membran gegeben. Es wird 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

7. Es wird 3-mal mit Waschpuffer gewaschen.

8. Substrat wird 10 Minuten oder bis zum Auftreten einer starken Bandenbildung zugegeben.

9. Es wird mit PBS gespült.

10. Nach Trocknung an der Luft erfolgt eine Lagerung im Dunkeln.

Die erfindungsgemäßen *L. intracellularis*-Bakterien europäischen Ursprungs oder von derartigen Bakterien abgeleitete Komponenten können auch zur Herstellung von Antiserum oder Antikörpern für diagnostische, prophylaktische oder therapeutische Anwendungen eingesetzt werden. Die erfindungsgemäßen *L. intracellularis*-Bakterien europäischen Ursprungs oder von

derartigen Komponenten abgeleitete Komponenten können einem nicht-humanen Tier in einer zur Herbeiführung einer Immunantwort wirksamen Menge verabreicht werden und das Antiserum oder Plasma mit einem Gehalt an Antikörpern gegen die *L. intracellularis*-Bakterien oder gegen von derartigen Bakterien abgeleitete Komponenten können nach bekannten und hier beschriebenen Verfahren gewonnen werden.

Die vorliegende Erfindung wird in den nachstehenden Beispielen, die lediglich Erläuterungszwecken dienen und nicht als Beschränkung anzusehen sind, näher beschrieben. Weitere Varianten der Erfindung sind für den Fachmann leicht ersichtlich.

Beispiel 1

Herstellung von *L. intracellularis*-Impfstoff

Isolierung und Attenuierung von *L. intracellularis* aus dem Darm von europäischen Schweinen mit porziner proliferativer Enteropathie (PPE)

Virulentes *L. intracellularis*-Isolat DK15540 (DK15540, DK-15540 und 15540 werden hier in austauschbarer Weise verwendet) wurde aus einem ilealen Homogenisat eines dänischen Schweins, das mit akuter porziner hämorrhagischer Enteropathie infiziert war, an der Universität von Minnesota isoliert. Dieses Isolat wurde gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrags bei der American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, am 9. Januar 2003 hinterlegt und erhielt die Hinterlegungsnummer PTA-4927. Das Isolierungsverfahren umfasste das Abschaben der Schleimhaut von Ileum, die Homogenisierung, die 30-minütige Trypsinierung und die Passage durch eine Gewebemühle. Das ileale Homogenisat wurde sodann durch eine Reihe von Filtern mit 5,0, 1,0 und 0,65 µm geleitet. Sodann wurde das Homogenisat in Saccharose-Phosphat-Glutamat-Puffer mit 10 % fötalem Kälberserum (FBS) verdünnt. Aliquotanteile (6x1 ml) des Homogenisats wurden hergestellt und bei Temperaturen unter -70 °C gelagert. Das Homogenisat wurde als Inokulum zur Infektion von McCoy-Zellen in T-75 cm²-Flaschen verwendet. Die Kulturen wurden täglich auf McCoy-Zellinfektion überwacht, indem McCoy-Zell-Monolayers abgeschabt wurden, Zellen durch Behandlung mit Kaliumchlorid der Lysis unterzogen wurden und das eingeeingte Zellpellet auf Mikroskop-Objektträgern platziert, die durch IFA unter Verwendung von für *L. intracellularis* spezifischen monoklonalen Antikörpern gefärbt waren. Nach 11 Passagen an verankerungsabhängigen Zellkulturen wurde Inokulum von der 11. Passage auf eine 250 ml fassende Rührflasche mit einem Gehalt an McCoy-Zellen übertragen und bis zur Ernte in Suspension gezüchtet. Das dänische Isolat von *L. intracellularis* (ATCC-Hinterlegungsnummer PTA-4927) wurde durch kontinuierliche in vitro-Passage in McCoy-Zellen für 80 Wochen attenuiert und mit monoklonalen Antikörpern auf Identität getestet. Das attenuierte Isolat erhielt die Bezeichnung B3903 (B3903, B 3903 und B-3903 werden hier in austauschbarer Weise verwendet). Das Isolat B3903 wurde gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrags bei der American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 am 9. Januar 2003 hinterlegt und erhielt die ATCC-Hinterlegungsnummer PTA-4926.

Kulturen

Identifizierung

Es wurden charakteristische Wachstumsbedingungen, PCR-Reaktionen und monoklonale Antikörperreaktionen zur Identifizierung von *L. intracellularis*-Master- und Arbeits-Anzuchtmaterialien herangezogen.

Reinheit

Die Reinheit von Master-Anzuchtmaterial und Arbeits-Anzuchtmaterial von *L. intracellularis* wurde bestimmt, indem Kulturen mit monoklonaler Antikörperfärbung, herkömmlichen Fremdmitteltests auf Bakterien und Viren und durch Sterilitäts-Mycoplasmatests geprüft wurden.

Virulenz

Master-Animpfprodukte von *L. intracellularis* waren nicht virulent, was sich dadurch zeigte, dass das Master-Animpfprodukt und das Rückpassage-Inokulum nicht die Fähigkeit besaßen, klinische Anzeichen und grobe Läsionen zu erzeugen, die bei empfindlichen Schweinen nach einer Belastung mit virulentem *L. intracellularis* beobachtet werden, wie im nachstehenden Beispiel 2 näher erläutert wird.

Bereich von Subkulturen

Am Schluss geerntetes Material aus der Erzeugung von *L. intracellularis* überstieg 11 Passagen vom Master-Anzuchtmaterial nicht.

Zusammensetzung des Mediums

EU-McCoy-Master-Zellvorratsmaterial (MCS) wurde in gemäß Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium mit Ham-Fortified F12 (DMEM/F12) und 1-10 % (Vol./Vol.) Serum von neugeborenen Kälbern (NBS) oder fötalem Kälberserum (FBS) gezüchtet und aufrechterhalten (Zellwachstums- und Aufrechterhaltungsmedium).

Master- und Arbeits-Anzuchtmaterial wurden in DMEM/F12 mit 1-10 % (Vol./Vol.) NBS oder FBS und 5-15 % (Vol./Vol.) Glycerin aufbewahrt (Master- und Arbeits-Anzuchtmaterial-Aufbewahrungsmedium).

Das schließlich geerntete Produkt wurde in Saccharose-Gelatine-Stabilisator (SGS) aufbewahrt (Endprodukt-Aufbewahrungsmedium).

Vermehrung

Master- und Arbeits-Anzuchtkulturen von *L. intracellularis* wurden in EU-McCoy-MCS unter Verwendung des vorstehend beschriebenen Zellwachstums- und Aufrechterhaltungsmediums vermehrt und bei -35 °C oder darunter aufbewahrt.

Gewebequelle

L. intracellularis-Anzucht- und Erzeugungsorganismen wurden in McCoy-Master-Zellvorratsmaterial (ATCC-Hinterlegungsnummer CRL 1696, Chargennummer F-10422) gezüchtet. Das Master-Zellvorratsmaterial wurde als 3894MMCSS bei Passage X identifiziert. Das Master-Zellvorratsmaterial wurde weitere 6-mal passagiert und als EU-McCoy-MCS X+0 identifiziert. EU-

McCoy-MCS-Passage X+0 wurde bei $-70\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ oder darunter aufbewahrt. Produktionsimpfstoff wurde in EU-McCoy-MCS-Zelllinien-Subkulturen bis zur 40. Passage hergestellt.

Kulturbedälter

EU-McCoy-MCS wurden in Gewebekulturflaschen mit einer Oberfläche von $25\text{--}150\text{ cm}^2$, Costar-Zellwürfeln, in Rollflaschen mit 850 cm^2 bis 2250 cm^2 , in Rührflaschen bis zu 40 Liter Fassungsvermögen und in Bioreaktoren mit einem Fassungsvermögen von 3 bis 500 Liter vermehrt.

Anzuchtkulturen von *L. intracellularis* wurden in Rührflaschen mit 250-40 000 ml, Rollflaschen mit 850 bis 2 250 cm^2 , Gewebekulturflaschen mit einer Oberfläche von $25\text{--}150\text{ cm}^2$ oder in Bioreaktoren mit einem Fassungsvermögen von 3 bis 500 Liter gezüchtet.

Produktionskulturen von *L. intracellularis* wurden in Rührflaschen mit einem Fassungsvermögen von 6 bis 40 Liter oder in Bioreaktoren mit einem Fassungsvermögen von 3 bis 500 Liter gezüchtet.

Verfahren zur Herstellung von Suspensionen zum Anzüchten oder Inokulieren

Anzuchtkulturen

Eingefrorene oder frische *L. intracellularis*-Master-Anzuchtmaterialien oder expandierte Arbeits-Anzuchtmaterialien wurden bei Raumtemperatur ($25 \pm 3\text{ °C}$) oder bei $37 \pm 2\text{ °C}$ aufgetaut. Bioreaktoren, Rührflaschen oder Flaschen, die vorher mit McCoy-Zellen in einer Zelldichte von 50 000 bis 500 000 Zellen/ml angeimpft worden waren, wurden mit *L. intracellularis* in einer Konzentration von 1 bis 10 % (Vol./Vol.) oder einem MOI-Wert von 0,08 bis 1,0 infiziert. Die infizierte Kultur wurde unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen inkubiert, indem sie mit einem Gasgemisch aus 86 % N_2 , 4 % H_2 und 10 % CO_2 überschichtet wurde. Die Kultur wurde 3 bis 10 Tage bei $37 \pm 2\text{ °C}$, pH-Wert 6,7-7,3, und unter kontinuierlichem Rühren (10-100 U/min) zur Aufrechterhaltung eines angemessenen Vermischens der Zellen, damit diese in Suspension blieben, inkubiert.

Produktionskulturen

Eingefrorene oder frische *L. intracellularis*-Master-Anzuchtmaterialien oder expandierte Arbeits-Anzuchtmaterialien wurden bei Raumtemperatur ($25 \pm 3\text{ °C}$) oder bei $37 \pm 2\text{ °C}$ aufgetaut. Bioreaktoren oder Rührflaschen mit einem Fassungsvermögen von 3 bis 500 Liter, die vorher mit McCoy-Zellen in einer Zelldichte von 50 000 bis 500 000 Zellen/ml angeimpft worden waren (0 bis 7 Tage) wurden mit *L. intracellularis* in einer Konzentration von 1 bis 10 % (Vol./Vol.) oder einem MOI-Wert von 0,08 bis 1,0 infiziert. Die infizierte Kultur wurde unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen inkubiert, indem sie mit einem Gasgemisch aus 96 % N_2 und 4 % H_2 überschichtet oder überstrichen wurde. Die Kultur wurde 3 bis 8 Tage bei $37 \pm 2\text{ °C}$, pH-Wert 6,7-7,3, und unter kontinuierlichem Rühren (10-100 U/min) zur Aufrechterhaltung eines angemessenen Vermischens, damit die Zellen in Suspension blieben, inkubiert.

Inokulationstechniken für Anzucht- und Produktionskulturen

Anzuchtkulturen

Bis zu 10 % (Vol./Vol.) von Master- oder Arbeits-Anzuchtmaterial werden auf Bioreaktoren, Rührflaschen oder Flaschen, die mit McCoy-Zellen 0-7 Tage in Wachstumsmedium angezüchtet worden sind, inokuliert (MOI-Wert 0,08 bis 1,0).

Produktionskulturen

Bis zu 10 % (Vol./Vol.) Produktions-Anzuchtmaterial wurde in einem geeigneten Volumen an Anzuchtmedium, das mit McCoy-Zellen 0 bis 7 Tage mit der entsprechenden McCoy-Zelldichte in Gefäßen mit einem Fassungsvermögen von 3 bis 500 Liter angezüchtet worden war, inokuliert (MOI-Wert 0,08 bis 1,0).

Inkubation von Mikroorganismen

Die Kulturen wurden 3 bis 10 Tage bei 37 ± 2 °C in einer Atmosphäre mit vermindertem Sauerstoff unter Rühren zur Aufrechterhaltung der Suspension inkubiert. Zusätzliches Medium und/oder McCoy-Zellen können zugesetzt werden, um den Wachstumsvorgang fortzusetzen.

Die Kulturen wurden während der Inkubationsdauer makroskopisch auf Anzeichen von abnormalem Wachstum oder Anzeichen einer Verunreinigung geprüft.

Ernte

Handhabung und Herstellung von Kulturen

Kulturen wurden auf Anzeichen von angemessenem bakteriellen Wachstum durch indirekte Fluoreszenz-Antikörper (IFA)-Färbung geprüft. Erntereife Kulturen zeigten eine 60 bis 100%ige Zellinfektiosität. Die prozentuale Infektiosität wurde durch Betrachtung von mindestens drei Feldern bestimmt, die jeweils eine ausreichende Menge an McCoy-Zellen, um die Fläche zu mindestens 80 % zu füllen, enthielten. Ein infizierter Zustand gilt als gegeben, wenn etwa 50 % der Zellen mit Bakterien gefüllt sind.

Die Stärke der Erntekultur wird durch Titration einer Probe an McCoy-Zellen, die unter Verwendung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers (monoklonaler anti-*L. intracellularis*-Antikörper VPM 53, Charge 31599 oder ein Äquivalent davon; anti-Mäuse-IgG-Fluorescein-Konjugat (FITC) (ICN Nr. 55499) gefärbt sind, nach 6-tägiger Inkubation bei 37 ± 2 °C getestet.

Kulturen wurden visuell auf etwaige offensichtliche Verunreinigungsanzeichen geprüft. Die Ernte erfolgte 3 bis 10 Tage nach der Inokulation.

Erntetechniken und Spezifikationen

Der Zell- und Flüssigkeitsgehalt im Produktionskultur-Bioreaktor, den Rührflaschen und der Flasche wurden partiell oder vollständig in einem sterilen Aufnahmegefäß gesammelt. Der Produktionskultur-Bioreaktor, die Rührflasche und die Flasche wurden jeweils einzeln geerntet oder der Inhalt von mehreren Gefäßen wurde unter Zugabe von SGS vereinigt und bei 1 bis 7 °C oder darunter aufbewahrt. Von der geernteten Produktionskultur wurden Proben für die Bestimmung der Stärke durch TCID₅₀ und Identifikation durch IFA-Färbung genommen.

Produktionskulturen wiesen bei IFA-Färbung einen Wert von mindestens 4,9 TCID₅₀/ml auf und waren bei mikroskopischer Betrachtung frei von jeglichen Verunreinigungszeichen.

Herstellung des Impfstoffprodukts

Einengungsverfahren

Das Impfstoffprodukt kann durch verschiedene Verfahren eingengt werden, indem man beispielsweise die Kultur sich absetzen lässt und anschließend den Überstand dekantiert, indem man eine Membranfiltration (0,22 µm oder darunter), eine Perfusion oder eine Zentrifugation vornimmt.

Saccharose-Gelatine-Stabilisator (SGS)

Eine hydrolysierte Gelatinelösung wird hergestellt, indem man Gelatine mit entionisiertem Wasser oder Wasser für Injektionszwecke bei einem endgültigen Gesamtvolumen der Ansatzgröße von 25 % SGS vermischt und 120 Minuten bei 121 °C in einem Autoklaven hydrolysiert.

Die hydrolysierte Gelatinelösung (40,0 g/Liter) wurde sodann mit entionisiertem Wasser oder Wasser für Injektionszwecke bei einem endgültigen Gesamtvolumen von 75 % SGS der Ansatzgröße vermischt. Kaliumhydroxid (AR) (0,548 g/Liter), L-Glutaminsäure (1,440 g/Liter), Dikaliumphosphat (AR) (2,508 g/Liter), Kaliumdihydrogenphosphat (AR) (1,030 g/Liter) und Saccharose (AR) (150,00 g/Liter) wurden zugegeben und die Lösung wurde gründlich vermischt. Der pH-Wert des Stabilisators wurde sodann mit Salzsäure- oder Natriumhydroxidlösungen auf 6,8 bis 7,0 eingestellt. Entionisiertes Wasser oder Wasser für Injektionszwecke wurde zum Auffüllen auf 100 % des angestrebten Endvolumens des SGS zugesetzt. Der vollständige Stabilisator wurde gründlich vermischt und die gesamte Lösung wurde durch Filtration durch ein 0,1 µm-Filter sterilisiert.

In Tabelle 1 findet sich ein Beispiel für Werte zur Bildung einer Serie.

Tabelle 1

<i>L. intracellularis</i>	200 000-300 000 ml
Saccharose-Gelatine-Stabilisator (SGS)	100 000 ml 25 % (Vol./Vol.)
DMEM/F12 (kann zur Standardisierung des Produkts zugesetzt werden)	0-150 000 ml
Gesamtvolumen	400 000 ml

Das Volumen einer durchschnittlichen Serie betrug 50 bis 500 Liter.

Lyophilisation

Das Impfstoffprodukt wurde gemäß dem in Tabelle 2 angegebenen Verfahren für einen 10 Dosen-Zyklus (6,0 ml Füllung) oder gemäß dem in Tabelle 3 angegebenen Verfahren für einen 50/100 Dosen-Zyklus (10,0 ml Füllung) lyophilisiert.

Tabelle 2

Stufen	°C	Geschwindigkeit (Minuten)	Haltezeit (Minuten)	Druck (mT)
Vorkühlung*	5°	N/A	N/A	atm
Einfrieren	-47° ± 3°	so schnell wie möglich	150	atm
Trocknung 1, 1.	-15° ± 2°	120	120	100-150
Trocknung 1, 2.	0° ± 2°	120	180	100-150
Trocknung 2, 1.	32° ± 2°	240	180	60-80
Trocknung 2, 2.	26° ± 2°	240	so schnell wie möglich	60-80

Gesamtzeit: 1352 Minuten (22,5 Stunden)

*Das Gestell wird während der Beladung des Lyophilisators auf 5 ± 2°C vorgekühlt.

N/A: nicht anwendbar

Tabelle 3

Stufen	°C	Geschwindigkeit (Minuten)	Haltezeit (Minuten)	Druck (mT)
Vorkühlung*	5°	N/A	N/A	atm
Einfrieren	-48° ± 3°	60	90	atm
Trocknung 1	-15° ± 2°	60	1500	100-150
Trocknung 2	26° ± 2°	60	600	60-80

Gesamtzeit: 2370 Minuten (39,5 Stunden)

*Das Gestell wird während der Beladung des Lyophilisators auf 5 ± 2°C vorgekühlt.

N/A: nicht anwendbar

Beispiel 2

Sicherheit von *L. intracellularis*-Impfstoff

Aufgabe

Diese Studie hatte zwei Ziele. Das erste Ziel dieser Studie bestand darin, das Auftreten der durch drei verschiedene Niedrigpassage-Isolate (zwei mit US-Herkunft und eines von europäischer Herkunft) von *L. intracellularis* bei Schweinen im Alter von 6 1/2 Wochen hervorgerufenen Krankheit zu beobachten und zu vergleichen. Das zweite Ziel bestand darin, die Sicherheit von zwei Hochpassage-Isolaten (beide europäischen Ursprungs) von *L. intracellularis* bei Schweinen im Alter von 6 1/2 Wochen festzustellen.

Materialien und Methoden

Testsubstanzen

1. *L. intracellularis*-Niedrigpassage-US-Isolat N343
2. *L. intracellularis*-Niedrigpassage-US-Isolat N101494
3. *L. intracellularis*-Niedrigpassage-EU-Isolat DK15540 p20
4. *L. intracellularis*-Hochpassage-EU-Isolat DK15540 p60

5. *L. intracellularis*-Hochpassage-EU-Isolat DK15540 p80 (Master-Anzuchtprodukt mit der Bezeichnung B3903).

Zubereitung der Testsubstanzen

Niedrigpassage-Isolate wurden 10-20 Wochen nach Isolation in McCoy-Zellsuspension kontinuierlich gezüchtet. Hochpassage-Isolate wurden kontinuierlich 60-80 Wochen nach Isolation in McCoy-Zellsuspension gezüchtet. Sämtliche Kulturen wurden durch 15-minütige Zentrifugation mit 10 000 U/min geerntet. Die McCoy-Zellkultur-Pellets mit einem Gehalt an Lawsonia wurden in Saccharose-Phosphat-Glutamin (SPG)-Lösung mit 10 % FBS resuspendiert.

Aufbewahrung der Testsubstanzen

Geerntete Kulturen wurden bis zum Belastungstag bei -70 °C aufbewahrt. Belastungskulturen des gleichen Isolats, jedoch von verschiedenen Erntedaten wurden aufgetaut und in Kunststoff-Impfstoffflaschen vereinigt, markiert und bis zum Zeitpunkt der Belastung bei 4 °C oder auf Eis aufbewahrt.

Test der Testsubstanzen

TCID₅₀-Tests wurden an sämtlichen gepoolten Belastungsisolaten zum Zeitpunkt der Belastung (Tag 0) durchgeführt. Die durchschnittlichen Titer (n=3) (TCID₅₀/ml) sind in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4

Testsubstanz	Durchschnittlicher Titer (TCID₅₀/ml)
<i>L. intracellularis</i> N343	6,4
<i>L. intracellularis</i> N101494	6,1
<i>L. intracellularis</i> DK15540 p20	6,2
<i>L. intracellularis</i> DK15540 p60	6,87
<i>L. intracellularis</i> DK15540 p80	7,4

Studienkonzept

Die Studie bestand aus 5 experimentellen Gruppen und einer Kontrollgruppe. Am Tag 0 der Studie erhielt die Gruppe 1 (10 Schweine, Alter 6 1/2 Wochen) eine 10 ml oder ein Äquivalent davon umfassende intragastrische (IG) Dosis von *L. intracellularis*-Niedrigpassage-US-Isolat N343. Die Gruppe 2 (10 Schweine, Alter 6 1/2 Wochen) erhielt eine 10 ml oder eine äquivalente Menge umfassende intragastrische Dosis von *L. intracellularis*-Niedrigpassage-US-Isolat N101494. Die Gruppe 3 (10 Schweine, Alter 6 1/2 Wochen) erhielt eine 10 ml oder eine äquivalente Menge umfassende intragastrische Dosis von *L. intracellularis*-Niedrigpassage-EU-Isolat DK15540 p20. Die Gruppe 4 (10 Schweine, Alter 6 1/2 Wochen) erhielt eine 10 ml oder eine äquivalente Menge umfassende intragastrische Dosis von *L. intracellularis*-Hochpassage-EU-Isolat DK15540 - 60 Wochen. Die Gruppe 5 (20 Schweine, Alter 6 Wochen) erhielt eine 10 ml oder eine äquivalente Menge umfassende Dosis von *L. intracellularis*-Hochpassage-EU-Isolat DK15540 p80. Die Gruppe 6 (10 Schweine, Alter 6 1/2 Wochen) mit der Bezeichnung "strikte Kontrolle" blieb unbehandelt.

Vom Beginn der Studie bis zum Tag der Belastung der entsprechenden Testtiere wurden täglich Gesundheitsbeobachtungen vorgenommen. Die klinische Gesundheit (Verhalten, Appetit, Körperzustand, Behaarung und Stuhlkonsistenz wurde täglich vom Tag der Belastung (Tag 0) bis zum Studienende (Tag 21) auf einer Skala von 1 bis 4 bewertet. Die durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme (ADWG) vom Tag der Belastung (Tag 0) bis zum Studienende (Tag 21) wurde berechnet. Die fäkale Ausscheidung von *L. intracellularis* wurden an den Tagen 0, 7, 14 und 21 bewertet. Während der gesamten Studie ging ein Tier ein (von Gruppe 1). Es wurde auf grobe und mikroskopische Läsionen geprüft. Als Todesursache wurden Läsionen in Verbindung mit PPE, die histologisch und durch PCR-Analyse bestätigt wurden, festgestellt. Das Tier wurde nicht ersetzt. Eine qualitative Analyse des Lawsonia-Gehalts im Kot wurde durch PCR zusammen mit einer histologischen Bewertung auf *L. intracellularis* am Ileum und Kolon durchgeführt. Serum wurde an den Tagen 0, 7, 14 und 21 der Studie entnommen.

Ergebnisse

Zusammenfassung der Studienergebnisse

Tabelle 5

Gruppe	Behandlung	Anzahl der Schweine	Titer (TCID ₅₀ /ml)	Serologie	Fäkale Ausscheidung	PCR	FA	Histologie	Grobe Läsionen	ADWG	Klinische Bewertung
1	N343	9	7,4	19 %	11 %	0 %	11 %	44 %	1	0,61	5,23
2	N101494	10	7,1	10 %	10 %	10 %	30 %	30 %	1,2	0,8	5,15
3	DK15540p20	10	7,2	18 %	13 %	30 %	10 %	20 %	1,2	0,86	5,01
4	DK15540p60	10	7,87	5 %	0 %	0 %	0 %	10 %	1	0,9	5
5	DK15540p80	20	8,4	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1	1,05	5
6	Strikte Kontrolle	10	0	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1,05	0,91	5

Allgemeine Beobachtungen

Tägliche Gesundheitsbeobachtungen wurden bis zur Belastung durchgeführt. Der klinische Zustand der Tiere wurde nach der Belastung für die Dauer der Studie täglich bewertet. Beobachtet wurden Verhalten, Appetit, Körperzustand, Behaarung und Stuhlkonsistenz. Der klinische Zustand dieser Tiere wurde aufgrund eines numerischen Punktesystems, das die Schwere der Krankheit wiedergibt, bewertet. Die Bewertungsskala für jeden Parameter reichte von 1 bis 4. Eine Bewertung von 1 wurde für ein Tier mit normalem, gesundem Erscheinungsbild vergeben. Eine Bewertung von 3 erhielt ein Tier, das schwere klinische Anzeichen zeigte. Die Bewertung 4 wurde für ein eingegangenes Tier vergeben. Die durchschnittliche tägliche Bewertung für die strikten Kontrollen DK15540 p60 und DK15540 p80 betrug 5,0. Für Niedrigpassage-Material ergaben sich die folgenden durchschnittlichen Tagesbewertungen: N343 = 5,23, N101494 = 5,15 und DK15540 p20 = 5,01. Die statistische Analyse dieser Ergebnisse ergab bei Anwendung des Kruskal-Wallis-Rangsummentests keine Unterschiede.

Tägliche durchschnittliche Gewichtszunahme (ADWG)

Die tägliche durchschnittliche Gewichtszunahme vom Zeitpunkt der Belastung (Tag 0) bis zum Studienende (Tag 21) wurde berechnet. Die durchschnittliche Gewichtszunahme pro Tag für die strikte Kontrollgruppe betrug 0,9 lb. Die durchschnittliche Gewichtszunahme für die Niedrigpassage-Behandlungsgruppen betrug nur 0,6 (N343), 0,8 (N101494) und 0,86 (DK15540 p20) lb/Tag. Die Hochpassage-Behandlungsgruppen zeigten die gleiche oder eine erhöhte Gewichtszunahme pro Tag, verglichen mit der strikten Kontrolle, die keine Belastung erfuhr (Werte 0,9 lb/Tag (DK15540 p60) und 1,05 lb/Tag (DK15540 p80)). Die durchschnittliche Differenz der täglichen Gewichtszunahme war bei der N343-Behandlungsgruppe signifikant niedriger im Vergleich zu den Hochpassage-Behandlungsgruppen (DK15540 p60 und p80) und zur strikten Kontrollgruppe am Tag 21 der Studie (Pearson-Chi-Quadrat $p < 0,05$).

Serokonversion

Die Serokonversion bei Lawsonia-Belastung bei Schweinen wurde gemessen, indem unter Anwendung eines IFAT-Tests die Anwesenheit von anti-Lawsonia-Antikörpern getestet wurde. Am Tag 0 zeigte nur die N343-Behandlungsgruppe eine nachweisbare Serokonversion bei 2/10 Schweinen. Am Tag 7 waren 2/9 Schweine (N343) und 1/10 Schweine (DK15540 p20) IFA-positiv auf Lawsonia-Antikörper. Am Tag 14 waren 2/9 Schweine in der N343-Behandlungsgruppe IFA-positiv und 1/10 bei DK15540 p20 und p60. Am Tag 21 waren 1/10 Schweine (N343), 4/10 Schweine (N101494) und 6/10 Schweine (DK15540 p20) IFA-positiv, während die Hochpassage-Behandlungsgruppen (DK15540 p60 und p80) keine nachweisbare Serokonversion zeigten. Die Serokonversion bei Lawsonia-Belastung erhöhte sich bei Behandlungsgruppen, die Niedrigpassage-*L. intracellularis* sowohl von den US- als auch EU-Isolaten erhalten hatten, am Tag 21 der Studie.

Fäkale Ausscheidung

Ein PCR-Test des Kots ergab eine Ausscheidung von *L. intracellularis* beginnend am Tag 14, an dem in den Niedrigpassage-Gruppen 4/9 in N343, 4/10 in N101494 und 5/10 in DK15540 p20 einen positiven Test ergaben. Die Hochpassage-Behandlungsgruppen und strikten Kontrollgruppen waren am Tag 14 PCR-negativ. Am Tag 21 war in der DK15540 p20-Behandlungsgruppe 1 Tier PCR-positiv, während sämtliche übrigen Behandlungs- und Kontrollgruppen PCR-negativ waren. Keine Anzeichen für eine Ausscheidung wurden bei Hochpassage-Isolatgruppen (DK15540 p60 und p80) während der gesamten Studie bei Anwendung von PCR beobachtet. PCR-positive Tiere, die eine aktive Ausscheidung von *Lawsonia* im Kot aufwiesen, waren in den Niedrigpassage-Isolatgruppen (N343, N101494 und DK15540 p20) am Tag 14 der Studie signifikanter als Hochpassage-Isolatgruppen und strikte Kontrollen (Pearson Chi-Quadrat $p < 0,05$).

PCR am Tag 21: Ileum und Kolon

Ein PCR-Test von Schleimhaut-Abstrichen von Ileum und Kolon wurde nach der Nekropsie (Tag 21) durchgeführt. PCR-positiv auf *L. intracellularis*-Kolonisierung waren folgende Proben in den Niedrigpassage-Isolatgruppen: 2/10 Kolon in N101494 und 2/10 Ileum und 4/10 Kolon in DK15540 p20. Sämtliche übrigen Behandlungs- und Kontrollgruppen erwiesen sich am Tag 21 der Studie in den Geweben PCR-negativ. Die Ergebnisse zeigten, dass das Ileum und das Kolon von Schweinen in DK15540 p20 signifikant stärker mit *L. intracellularis* kolonisiert waren als sämtliche Behandlungs- und Kontrollgruppen waren (*Pearson Chi-Quadrat $p < 0,05$).

Histologie

Schnitte von terminalem Ileum und Kolon wurden bei der Nekropsie (Tag 21) gewonnen und für die histologische Analyse in gepuffertes Formalin gelegt. Das Vorliegen von intrazellulären Bakterien und kryptischer Hyperplasie wurde in dem mit Hämatoxylin und Eosin (H & E) und mit Warthin-Starry-Silberreagenz gefärbten Geweben bei 4/9 Schweinen (N343), 3/10 Schweinen (N101494), 2/10 Schweinen (DK15540 p60) und 1/20 Schweinen (DK15540 p80) beobachtet. Die Läsionsentwicklung wurde durch Fluoreszenz-Antikörper-Färbung unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen *Lawsonia intracellularis* bei 1/9 Schweinen (N343), 3/10 Schweinen (N101494) und 1/10 Schweinen (DK15540 p60) bestätigt. Durch FA wurden bei sämtlichen Behandlungs- und Kontrollgruppen keine durch *Lawsonia* verursachten Läsionen im Kolon nachgewiesen. Die FA-Ergebnisse zeigten eine signifikante Läsionsentwicklung im Ileum von Schweinen bei der N101494-Behandlungsgruppe im Vergleich zu sämtlichen Behandlungs- und Kontrollgruppen. H & E/Silber-Färbung zeigte eine signifikante Läsionsentwicklung im Zusammenhang mit PPE bei der N343-Behandlungsgruppe, verglichen mit sämtlichen Behandlungs- und Kontrollgruppen (Pearson Chi-Quadrat $p < 0,05$).

Grobe Bewertung

Ileum und Kolon wurden zum Zeitpunkt der Nekropsie (Tag 21) auf Läsionen in Verbindung mit PPE bewertet. Die Gewebe erhielten eine Bewertung von 1 bei normalem Erscheinungsbild (keine Läsionsentwicklung), eine Bewertung von 2 bei Läsionen, die eine schwache Verdickung

zeigten, eine Bewertung von 3 bei mäßiger Verdickung und eine Bewertung von 4 bei schwerer Verdickung. Die strikten Kontrollen ergaben eine durchschnittliche klinische Bewertung von 1,05, N343 (1,0), N101494 (1,2), DK15540 p20 (1,2) und DK15540 p60 und p80 (1,0). Die durchschnittlichen Bewertungen von groben Läsionen ergaben keinen statistischen Unterschied zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen bei Anwendung des ANOVA-Tests für multiple Vergleiche.

Schlussfolgerungen

Auf der Grundlage der gewonnenen Daten zeigte diese Studie, dass Schweine, die mit Niedrigpassage-Dosen von N343, N101494 und DK15540 mit einem TCID₅₀-Wert von mehr als 1×10^7 Bakterien/Dosis belastet wurden, ein vermehrtes Auftreten von PPE zeigten. Hochpassage-Isolate (DK15540 p60 und p80), die an Schweine des gleichen Alters mit einem TCID₅₀-Wert von mehr als 1×10^7 verabreicht wurden, erwiesen sich sicher und zeigten eine Verringerung der Kolonisierung und Läsionsentwicklung in Verbindung mit PPE. Dieser Schluss beruhte auf der PCR-Analyse der Schleimhaut des Ileums, den histopathologischen Untersuchungen und der FA-Färbung von Gewebeschnitten.

Eine Verringerung der Ausscheidung von *L. intracellularis* im Kot bei Bestimmung durch PCR war bei Hochpassage-Isolaten im Vergleich zu Niedrigpassage-Isolaten erkennbar. Die für sämtliche Behandlungs- und Kontrollgruppen berechnete durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme stützt diese Schlussfolgerung, da sich eine positive gleichmäßige tägliche Gewichtszunahme bei Gruppen mit Hochpassage-Isolat und strikten Kontrollen ergibt, verglichen mit Gruppen, die Niedrigpassage-Isolate erhalten hatten, insbesondere bei Tieren in der N343-Behandlungsgruppe. Es wird eine verminderte Gewichtszunahme bei Tieren, denen Niedrigpassage-Material verabreicht worden ist, beobachtet, was ein angemessenes und ähnliches Wachstumsverhalten von Tieren, die Hochpassage-Material erhalten haben, und Tieren, die kein Belastungsmaterial erhalten haben, ergibt. Verglichen mit den strikten Kontrollen zeigten die Hochpassage-Isolate keine negative Auswirkung auf die Gewichtszunahme und den gesamten Gesundheitszustand, basierend auf den klinischen Bewertungen.

Beispiel 3

Wirksamkeit und minimaler Schutztiter

Aufgabe

Die Ziele dieser Studie bestanden darin, den minimalen Schutztiter eines Impfstoffes mit einem Gehalt an Isolat B3903 (lyophilisiert) (DK15540, Passage 80) ("B3903 (lyophilisiert)-Impfstoff" und "B3903-Impfstoff" werden hier in austauschbarer Weise verwendet) bei oraler Verabreichung an Schweine im Alter von 3 Wochen festzustellen und die Wirksamkeit gegen eine virulente, heterologe Reinkulturbelastung mit Niederpassage-*L. intracellularis*, dem Erreger von porziner proliferativer Enteropathie (PPE) bei Schweinen, nachzuweisen.

Materialien und Methoden

Testsubstanz: Attenuierte Lebendkultur von *L. intracellularis*, Isolat B3903

Zubereitung von B3903-Impfstoff (lyophilisiert)

DK15540-Isolate wurden kontinuierlich 80 Wochen nach Isolierung in McCoy-Zellsuspension gezüchtet. Sämtliche Kulturen wurden durch 15-minütige Zentrifugation mit 10 000 U/min geerntet. Die McCoy-Zellkultur-Pellets mit einem Gehalt an Lawsonia wurden in Saccharose-Phosphat-Glutamin (SPG)-Lösung mit 10 % FBS resuspendiert. Die Trocknung erfolgte gemäß den Angaben im vorstehenden Beispiel 1. Das lyophilisierte Produkt wird in Wasser für Injektionszwecke unter Auffüllen auf 2,0 ml rekonstituiert.

Aufbewahrung von B3903-Impfstoff (lyophilisiert)

Der Impfstoff wurde bis zur Verwendung bei 2-8 °C aufbewahrt. Nach Resuspendieren wurde der Impfstoff bis zur Verabreichung auf Eis aufbewahrt.

Dosen von B3903-Impfstoff (lyophilisiert)

1. Hohe Dosis (Behandlungsgruppe 1): 1 x 2 ml (6,0 log/Dosis) durch direkte orale Verabreichung am Tag 0 der Studie.
2. Mittlere Dosis (Behandlungsgruppe 2): 1 x 2 ml (4,9 log/Dosis) durch direkte orale Verabreichung am Tag 0 der Studie.
3. Niedrige Dosis (Behandlungsgruppe 3): 1 x 2 ml (3,8 log/Dosis) durch direkte orale Verabreichung am Tag 0 der Studie.

Testsubstanz: Placebo

Ein Placebo, das aus nicht-infizierten McCoy-Gewebekulturzellen in Suspension in DMEM/F12-Wachstumsmedium bei Verstärkung mit 5 % NBS bestand, wurde den Behandlungsgruppen 4 (Belastungskontrolle) und 5 (negative Kontrolle) am Tag 0 der Studie verabreicht. Diese Substanz wurde an Ferkel in der Behandlungsgruppe 4 durch direkte orale Verabreichung in einer Menge von 1 x 2 ml Placebo pro Testtier gegeben.

Testsubstanz: *L. intracellularis* N101494, virulente Belastung

L. intracellularis N101494 wurde aus dem Darm eines 12 Wochen alten Schweins einer Farm in Indiana erhalten (US-Patent 5 714 375).

Zubereitung von *L. intracellularis* N101494, virulente Belastung

L. intracellularis-Belastungsmaterial wurde kontinuierlich in McCoy-Zellsuspension für nicht mehr als 30 Passagen nach der ursprünglichen Isolierung aus infiziertem Darmgewebe gezüchtet. Aktive Kulturen (2 x 3 Liter) mit den Bezeichnungen SF 1422 und SF 1423 wurden zusätzlich zu (1 Liter) SF 1421 in McCoy-Zellsuspension 7 Tage bis zu einer 15-30%igen McCoy-Zellinfektion gezüchtet. Am Tag der Belastung (Tag 21) wurden aktive Kulturen durch 15-minütige Zentrifugation mit 10 000 U/min geerntet und die Zellpellets wurden in einem Gesamtvolumen von 350 ml mit SPG-Stabilisator resuspendiert. Die geernteten aktiven Kulturen wurden mit 300 ml gefrorenen 10x- bis 20x-eingeengten Belastungsvorratsmaterialien von gering passagiertem N101494 bei verschiedenen Passagen (Passage 24 bis 27 nach der Isolierung) vereinigt.

Aufbewahrung von *L. intracellularis* N101494, virulente Belastung

Die endgültigen Zubereitungen, die für die Belastung bereit waren, wurden bis zur Inokulation bei 2 bis 8 °C oder auf Eis aufbewahrt.

Titer vor und nach der Impfung und Belastungstiter

Ergebnisse des TCID₅₀-Tests bestätigten die Menge an lebendem *L. intracellularis*, das jedem Testtier pro Dosis während der Impfung und Belastung verabreicht wurde. Die durchschnittlichen Titer (n=5) von Titrationen vor und nach Gabe des B3903-Impfstoffes und des Belastungsmaterials (*L. intracellularis* N101494) sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6

Gruppe	Behandlung (log/Dosis)	Mittelwert log/Dosis (2 ml) vor der Impfung (TCID ₅₀ /ml)	Mittelwert log/Dosis (2 ml) nach der Impfung (TCID ₅₀ /ml)	Gesamtmittelwert log/Dosis
1	B3903-Impfstoff hohe Dosis	6,07	5,89	6,0
2	B3903-Impfstoff mittlere Dosis	4,94	4,84	4,9
3	B3903-Impfstoff niedrige Dosis	3,9	3,5	3,8
4	Belastungskontrolle	7,85	7,57	7,71

Studienkonzept

65 gesunde, *L. intracellularis*-negative, entwöhnte Ferkel im Alter von 3 Wochen wurden willkürlich in 5 Behandlungsgruppen eingeteilt und während der Studie getrennt gehalten. Am Tag 0 erhielt die Behandlungsgruppe 1 (15 Schweine) eine 2 ml-Dosis (6,0 log/Dosis) von B3903-Impfstoff durch direkte orale Verabreichung. Die Behandlungsgruppe 2 (15 Schweine) erhielt eine 1 x 2 ml-Dosis von B3903-Impfstoff mit einem Titerwert von 4,9 log/Dosis durch direkte orale Verabreichung. Die Behandlungsgruppe 3 (15 Schweine) erhielt eine 1 x 2 ml-Dosis von B3903-Impfstoff mit einem Titer von 3,8 log/Dosis durch direkte orale Verabreichung.

Die Behandlungsgruppen 4 und 5 (10 Schweine/Gruppe) erhielten eine 1 x 2 ml-Dosis Placebo durch direkte orale Verabreichung.

Am Tag 21 der Studie (3 Wochen nach der Impfung) erhielten die Testschweine in den Behandlungsgruppen 1 bis 4 eine 1 x 10 ml-Dosis einer virulenten, niedrig passagierten, reinen Kultur von *L. intracellularis*-Heterologisolat N101494 durch eine Magensonde.

Am Tag 42 der Studie (3 Wochen nach der Belastung) wurden sämtliche Behandlungsgruppen (1-5) getötet und einer Nekropsie für eine grobe und mikroskopische Läsionsanalyse auf PPE unterzogen.

Von Studienbeginn bis zum Tag der Belastung wurden bei jedem Testtier täglich Gesundheitsbeobachtungen gemacht. Die klinische Gesundheit (Diarrhoe, Verhalten und körperlicher Zustand) wurde täglich vom Belastungstag (Tag 21) bis zum Studienende (Tag 42)

bewertet. Gewichtsbestimmungen erfolgten am Tag der Impfung (Tag 0), am Tag der Belastung (Tag 21) und am Tag des Studienendes (Tag 42), um die durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme für jede Behandlungsgruppe zu berechnen. Die fäkale Ausscheidung von *L. intracellularis* wurde durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Testen von Kotabstrichen (f-PCR) an den Tagen 0, 7, 14, 21, 28, 35 und 42 der Studie bewertet. Sämtliche bei Studienende getöteten Tiere (Tag 42) wurden auf grobe und mikroskopische Läsionen untersucht. Eine qualitative Analyse des Bakteriengehalts in Geweben wurde durch PCR (t-PCR) zusammen mit einer histologischen Bewertung auf *L. intracellularis* im Ileum, im Kolon, in den Mandeln und in mesenterischen Lymphknoten am Tag 42 der Studie durchgeführt. Serum wurde an den Tagen 0, 7, 14, 21, 28, 35 und 42 der Studie entnommen. Das Serum wurde unter Anwendung des indirekten Fluoreszenz-Antikörper-Tests (IFAT) zum Nachweis von anti-Lawsonia-Antikörpern in den Testtieren getestet. Vergleiche der Behandlungsgruppen wurden durch Datenanalyse der durchschnittlichen täglichen Gewichtszunahme nach der Impfung und nach der Belastung, der klinischen Bewertungen, der Serokonversionsraten (IFAT), der Kolonisierung (t-PCR), der fäkalen Ausscheidung (f-PCR) sowie der Entwicklung von groben und mikroskopischen Läsionen auf immunohistochemischem Wege (IHC) durchgeführt.

Ergebnisse

Zusammenstellung von primären Ergebnissen

Tabelle 7

Behandlungs- gruppe	Schweine pro Gruppe	Behand- lungs- gruppe ID (log/Dosis)	Mittelwert der Be- wertung der groben Läsionen (Ileum)	Mittelwert der Be- wertung der groben Läsionen (Kolon)	Mittelwert der Be- wertung der Mikro- läsionen (Ileum)	Mittelwert der Be- wertung der Mikro- läsionen (Kolon)
1	15	B3903-Impf- stoff, hohe Dosis (6,0)	1,5 ab	1,2 a	0,2 ab	0,1 a
2	15	B3903-Impf- stoff, mitt- lere Dosis (4,9)	1,2 ab	1,0 a	0,4 ab	0,0 a
3	15	B3903-Impf- stoff, nied- rige Dosis (3,8)	2,5 b	1,5 b	1,0 b	0,3 a
4	10	Belastungs- kontrollen	3,6 c	2,2 b	2,4 c	1,5 b
5	10	Strikte Kontrollen	1,0 a	1,0 a	0,0 a	0,0 a

*Gleiche Buchstaben geben an, dass kein signifikanter Unterschied gegeben ist ($p < 0,05$).

Die endgültigen Testergebnisse für jede Behandlungsgruppe ergaben die Entwicklung von signifikanten groben und mikroskopischen Läsionen des Ileums und des Kolons bei nicht-geimpften Schweinen der Belastungskontrolle (Gruppe 4) im Vergleich zu geimpften Schweinen, und zwar unabhängig von der Dosis (hohe, mittlere und niedrige Dosis in den Gruppen 1, 2 und 3 ($p < 0,05$)). Die Mittelwerte der Bewertungen der groben Läsionen des Kolons bei Niederdosis-Impfstoff unterschieden sich nicht signifikant von den Belastungskontrollen. Die Gruppe mit dem Niederdosis-Impfstoff (Gruppe 3) stellt die einzige Behandlungsgruppe dar, die Impfstoff erhalten hatte und eine signifikante Läsionsentwicklung (grob und mikroskopisch) aufwies, verglichen mit der strikten Kontrollgruppe, die während der gesamten Studie keine Impfung, kein Placebo oder keine Belastung erhielt.

Klinische Bewertungen

Die klinischen Bewertungen wurden für jedes Tier täglich vom Tag der Belastung (Tag 21) bis zur Nekropsie (Tag 42) aufgezeichnet. Die klinischen Bewertungen wurden berechnet, um eine durchschnittliche tägliche klinische Bewertung, die die Schwere und die Dauer der Krankheit bei den Behandlungsgruppen aufgrund der virulenten Belastung mit *L. intracellularis* wiedergibt, zu berechnen. Die durchschnittlichen klinischen Bewertungen für jede Behandlungsgruppe sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8

Behandlungsgruppe	Gruppenbezeichnung	Durchschnittliche klinische Bewertung
1	B3903-Impfstoff - hohe Dosis	3,1 a
2	B3903-Impfstoff - mittlere Dosis	3,0 a
3	B3903-Impfstoff - niedrige Dosis	3,0 a
4	Belastungskontrolle	3,0 a
5	Strikte Kontrolle	3,0 a

*Gleiche Buchstaben bezeichnen nicht-signifikante Unterschiede unter den durchschnittlichen klinischen Bewertungen vom Tag der Belastung bis zur Nekropsie ($p < 0,05$).

Eine statistische Analyse der klinischen Bewertungen wurde durch Prüfung der Daten in Relation zu Behandlungsgruppen, die durchschnittliche klinische Bewertungen erhielten, unter Anwendung des Einweg-ANOVA-Tests vorgenommen. Es ergaben sich keine Anzeichen für signifikante Unterschiede unter ungeimpften Belastungskontrollen und strikten Kontrollen im Vergleich zu den Impfstoffgruppen mit hoher, mittlerer oder niedriger Dosis.

Durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme

Die durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme (ADWG) wurde vom Zeitpunkt der Impfstoffverabreichung (Tag 0) bis zur Verabreichung der Belastung (Tag 21) und bis zum Studienende (Tag 42) berechnet. Die statistische Analyse der Unterschiede der Gewichtszunahme

(lb) zwischen Impfstoffgruppen mit hoher Dosis und ungeimpften Belastungskontrollgruppen ergab einen signifikanten Unterschied vom Zeitpunkt der Verabreichung der Belastung bis zur Nekropsie ($p < 0,05$). Die Gewichtsdaten sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9

Behandlungsgruppe	Gruppenbezeichnung	Durchschnittliches Anfangsgewicht (lb)	ADWG (Tag 0-21) (lb)	ADWG (Tag 21-42) (lb)	Gesamte ADWG (lb) (von der Impfung bis zur Nekropsie)
1	B3903-Impfstoff, hohe Dosis	17,8 a	0,94 a	1,63 a	1,29 a
2	B3903-Impfstoff, mittlere Dosis	17,7 a	1,00 a	1,60 ab	1,30 a
3	B3903-Impfstoff, niedrige Dosis	18,0 a	0,94 a	1,48 ab	1,21 a
4	Belastungskontrollen	17,7 a	0,96 a	1,45 b	1,21 a
5	Strikte Kontrollen	17,7 a	0,94 a	1,63 ab	1,28 a

*Gleiche Buchstaben bezeichnen keine signifikanten Unterschiede zwischen Behandlungsgruppen in Bezug auf die ADWG-Werte vom Tag der Impfung bis zur Belastung und vom Tag der Belastung bis zur Nekropsie ($p < 0,05$).

Serokonversion (IFAT)

Serumproben wurden wöchentlich von sämtlichen Testtieren in jeder Behandlungsgruppe gewonnen und auf die Anwesenheit von anti-Lawsonia-IgG-Antikörpern an den Tagen 0, 7, 14, 21, 28, 35 und 42 der Studie getestet. Positive und negative IFAT-Kontrollproben waren bei sämtlichen in dieser Studie durchgeführten Tests zu 100 % korrekt. An den Tagen 0 bis 21 (3 Wochen nach der Impfung) waren sämtliche Testtiere in den einzelnen Behandlungsgruppen IFA-negativ. Am Tag 28 (1 Woche nach der Belastung) der Studie waren 1/15 (6,7 %) Testtiere in der Behandlungsgruppe mit hochdosiertem Impfstoff IFA-positiv, während alle übrigen Testtiere IFA-negativ waren. Am Tag 35 (2 Wochen nach der Belastung) der Studie waren 4/15 (26,7 %) der Schweine in der Behandlungsgruppe mit hochdosiertem Impfstoff und in der Behandlungsgruppe mit mittlerer Dosis sowie 1/10 (10 %) der Schweine in der Belastungskontrollgruppe ohne Impfstoffbehandlung IFA-positiv auf Lawsonia-Antikörper. Sowohl die Behandlungsgruppe mit niedrigdosiertem Impfstoff als auch die strikte Kontroll-Behandlungsgruppe waren am Tag 35 IFA-negativ. Am Tag 42 (3 Wochen nach der Belastung) der Studie waren 8/10 (80 %) der Schweine in

der Belastungskontrollgruppe, 6/15 (40 %) der Schweine in der Gruppe mit mittlerer Impfstoffdosis, 5/15 (33,3 %) der Schweine in der niedrigdosierten Impfstoffgruppe und 3/15 (20 %) der Schweine in der hochdosierten Impfstoffgruppe IFA-positiv. Am Studienende (Tag 42) war die strikte Kontrollgruppe IFA-negativ.

Die Serokonversionsdaten wurden unter Anwendung der Chi-Quadrat-Statistik analysiert. Für die in der strikten Kontrollgruppe erhaltenen Ergebnisse wurde eine Chi-Quadrat-Statistik aufgrund der zu 100 % negativen Reaktionen, die bei den einzelnen Testtieren während der gesamten Studie festgestellt wurde, nicht berechnet. In den Behandlungsgruppen, die einen Impfstoff oder Placebo erhielten, wurden die IFAT-Ergebnisse unter Anwendung der Chi-Quadrat-Statistik unter Ermittlung eines exakten p-Werts (Monte-Carlo) verglichen. Positive IFAT-Ergebnisse, die bei Belastungsgruppen, die eine Belastung mit einer virulenten reinen Kultur erfahren hatten, erhalten wurden, waren signifikant höher als die Gruppen mit hochdosiertem Impfstoff und niedrigdosiertem Impfstoff ($p < 0,05$) am Tag 42 (3 Wochen nach der Belastung) der Studie.

Fäkale Ausscheidung von *L. intracellularis* (PCR)

Fäkale Abstriche wurden wöchentlich von sämtlichen Testtieren in den einzelnen Behandlungsgruppen gewonnen und durch PCR an den Tagen 0, 7, 14, 21, 28, 35 und 42 der Studie auf die Anwesenheit von *L. intracellularis* getestet. Positive und negative DNA-Extraktionskontrollen und PCR-Reaktionskontrollen waren bei jedem in dieser Studie durchgeführten Test zu 100 % genau. Sämtliche Testtiere in den einzelnen Behandlungsgruppen waren im Kot PCR-negativ auf *L. intracellularis* vom Tag 0 (Impfung) bis zum Tag 21 (Belastung). Schweine in der strikten Kontrollgruppe blieben während der gesamten Studie im Kot PCR-negativ auf *L. intracellularis*. Eine fäkale Ausscheidung von *L. intracellularis* (Kot PCR-positiv) ergab sich bei verschiedenen Behandlungsgruppen in den einzelnen Wochen nach der Belastungsinokulation. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Tabelle 10

Behandlungs- gruppe	Gruppen- bezeichnung	Tag 28 (1 Woche nach der Belastung)	Tag 35 (2 Wochen nach der Belastung)	Tag 42 (3 Wochen nach der Belastung)
1	B3903-Impfstoff, hohe Dosis	0/15 (0 %) a	2/15 (13,3 %) a	0/15 (0 %) a
2	B3903-Impfstoff, mittlere Dosis	6/15 (40 %) ab	5/15 (33,3 %) a	0/15 (0 %) a
3	B3903-Impfstoff, niedrige Dosis	4/15 (26,7 %) ab	8/15 (53,3 %) ab	2/15 (13,3 %) ab
4	Belastungs- kontrollen	4/10 (40 %) b	7/10 (70 %) b	4/10 (40 %) b

5	Strikte Kontrollen	0/10 (0 %)	0/10 (0 %)	0/10 (0 %)
---	--------------------	------------	------------	------------

*Gleiche Buchstaben bezeichnen keinen signifikanten Unterschied unter den Behandlungsgruppen, die eine Belastung erfahren hatten ($p < 0,05$).

Durch statistische Analyse unter Anwendung der Chi-Quadrat-Statistik mit einer Bestimmung des exakten p-Werts (Monte Carlo) wurden die positiven Reaktionen in jeder Impfstoff-Behandlungsgruppe nur mit der Belastungskontrollgruppe ohne Impfstoff verglichen. Die Ergebnisse der strikten Kontrollgruppe wurden nicht in die Gruppenvergleiche einbezogen, da während der gesamten Studie die einzelnen Schweine zu 100 % im Kot PCR-negativ auf *L. intracellularis* waren. Am Tag 28 (1 Woche nach der Belastung) zeigten Schweine, die eine hohe Dosis des Impfstoffes erhalten hatten, eine signifikant geringere Ausscheidung von *L. intracellularis* als ungeimpfte, belastete Schweine ($p = 0,017$). Am Tag 35 (2 Wochen nach der Belastung) zeigten Schweine mit einer hohen Impfstoffdosis ($p = 0,0024$) und einer mittleren Impfstoffdosis ($p = 0,041$) eine signifikant geringere Ausscheidung von *L. intracellularis* im Kot als ungeimpfte, belastete Schweine. Am Tag 42 (Studienende) zeigten erneut Schweine, die eine hohe und mittlere Impfstoffdosis erhalten hatten ($p = 0,017$), eine signifikant geringere Ausscheidung von *L. intracellularis* im Kot als die ungeimpften, belasteten Schweine. An beliebigen Tagen nach der Belastung waren Schweine in der niedrigdosierten Gruppe nicht signifikant geringer PCR-positiv als die Belastungskontrollen.

***L. intracellularis*-Gewebekolonisierung (PCR)**

Ein Test mit der Polymerase-Kettenreaktion wurde an Gewebeschnitten von Ileum, Kolon, Mandeln und mesenterischen Lymphknoten nach der Nekropsie (Tag 42 der Studie) durchgeführt. In der hochdosierten Impfstoffgruppe waren 1/15 (6,7 %) der Schweine PCR-positiv auf eine *L. intracellularis*-Kolonisierung in den Mandeln, während alle übrigen Behandlungsgruppen PCR-negativ waren. Ein Ileitis-PCR-Test von mesenterischem Lymphgewebe ergab, dass 3/10 (30 %) der Schweine in der ungeimpften Belastungskontrollgruppe positiv auf eine *L. intracellularis*-Kolonisierung waren, während alle übrigen Behandlungsgruppen PCR-negativ waren. Ein Ileitis-PCR-Test an Schleimhautabstrichen des terminalen Ileums ergab, dass 4/10 (40 %) der Schweine in der Belastungskontrollgruppe, 4/15 (26,7 %) der Schweine in der niedrigdosierten Impfstoffgruppe, 2/15 (13,3 %) der Schweine in der Impfstoffgruppe mit mittlerer Dosis und 1/15 (6,7 %) der Schweine in der hochdosierten Impfstoffgruppe PCR-positiv auf *L. intracellularis*-Kolonisierung waren. Der Ileitis-PCR-Test des Kolons ergab, dass 3/10 (30 %) der Schweine in der Belastungskontrollgruppe, 5/15 (33,3 %) der Schweine in der niedrigdosierten Impfstoffgruppe, 1/15 (6,7 %) der Schweine in der Gruppe mit der mittleren Impfstoffdosis und 2/15 (13,3 %) der Schweine in der hochdosierten Impfstoffgruppe PCR-positiv auf *L. intracellularis*-Kolonisierung waren. In den Geweben der strikten Kontrollgruppe ergaben sich keine Anzeichen für eine *L. intracellularis*-Kolonisierung.

Durch statistische Analyse wurden die Ileitis-PCR-positiven Ergebnisse unter den Behandlungsgruppen verglichen, wobei die Chi-Quadrat-Statistik unter Monte Carlo-Näherung des

exakten p-Werts angewandt wurde. Die PCR-Ergebnisse von mesenterischen Lymphknoten zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen ungeimpften Belastungskontrollen und sämtlichen Behandlungsgruppen, die eine Impfstoffbehandlung erhalten hatten ($p=0,054$). Keine statistische Signifikanz ergab sich unter Behandlungsgruppen in Bezug auf die *L. intracellularis*-Kolonisierung in Ileum, Kolon oder Mandeln am Tag 42 der Studie.

Histologie (IHC/H & E)

Schnitte mit einer Länge von 2 bis 4 cm von Mandeln, mesenterischen Lymphknoten, terminalem Ileum und Kolon wurden bei der Nekropsie (Tag 42) hergestellt und für die histologische Analyse in 10 % gepuffertes Formalin gelegt. Durch IHC-Färbung von Mandelschnitten wurde bei sämtlichen Behandlungsgruppen bei der Nekropsie *Lawsonia intracellularis* nicht nachgewiesen. Die strikte Kontrollgruppe erwies sich bei IHC in sämtlichen bei der Nekropsie entnommenen Gewebeproben negativ auf *L. intracellularis*. Eine Anwesenheit von *L. intracellularis* und mikroskopische Läsionen in Verbindung mit PPE wurden im Ileum von 9/10 (90 %) der Schweine der ungeimpften Belastungskontrollen, 6/15 (40 %) der Schweine der niedrigdosierten Impfstoffgruppe, 3/15 (20 %) der Schweine in der Gruppe mit mittlerer Impfstoffdosis und 1/15 (6,7 %) der Schweine der hochdosierten Impfstoffgruppe gefunden. Mikroskopische Läsionen zeigten sich im Kolon von 8/10 (80 %) der Schweine in der Belastungskontrollgruppe, 3/15 (20 %) der Schweine in der niedrigdosierten Impfstoffgruppe und 1/15 (6,7 %) der Schweine in der hochdosierten Impfstoffgruppe. Die Impfstoffgruppe, die eine mittlere Dosis erhalten hatte, war im Kolon IHC-negativ auf *L. intracellularis*. Gefärbte Schnitte von mesenterischen Lymphknoten ergaben nur 1/10 (10 %) Schweine in der Belastungskontrollgruppe, die *L. intracellularis* aufwiesen. Positive IHC-Ergebnisse in den Schnitten von Ileum und Kolon unter den Behandlungsgruppen korrelierten gut mit dem Vorliegen einer ausgeprägten kryptischen Hyperplasie, wie durch H & E-Methodik nachgewiesen wurde.

Eine statistische Analyse von quantitativen IHC-Daten wurde unter Anwendung des Einweg-ANOVA-Tests und des Kruskal-Wallis-Ranksummentests unter anschließender spezifischer Gegenüberstellung von p-Werten zwischen der Belastungsgruppe und strikten Kontrollgruppe mit den einzelnen Impfstoffdosierungsgruppen durchgeführt. Eine statistische Analyse ergab am Tag 42 der Studie Anzeichen für eine signifikante Läsionsentwicklung aufgrund von *L. intracellularis* in Ileum und Kolon der Belastungskontrollgruppe im Vergleich zu geimpften Schweinen unabhängig von der Dosis ($p<0,001$). Bei der Bewertung der durchschnittlichen IHC-Läsionen von Ileum und Kolon in geimpften Tieren, die eine hohe oder mittlere Impfstoffdosis erhalten hatten, zeigte sich keine statistische Signifikanz im Vergleich zur strikten Kontrollbehandlungsgruppe ($p>0,05$). Schweine, die eine niedrige Dosis des Impfstoffes erhalten hatten, zeigten höhere Mittelwerte der Bewertungen der mikroskopischen Läsionen aufgrund von *L. intracellularis* im Ileum, verglichen mit der strikten Kontrollgruppe ($p<0,05$).

Grobe Bewertung

Ileum und Kolon der einzelnen Testtiere wurden zum Zeitpunkt der Nekropsie (Tag 42) auf grobe Läsionen in Verbindung mit PPE bewertet. Gewebe von Testschweinen in der strikten Kontrollgruppe waren normal, enthielten keine Läsionen und erhielten eine durchschnittliche Läsionsbewertung von 1,1 (Ileum) und 1,0 (Kolon). Gewebe von Testtieren in der ungeimpften Belastungskontrollgruppe erhielten unter den Behandlungsgruppen die höchste Bewertung der durchschnittlichen groben Läsionen für das Ileum (3,6) und das Kolon (2,0). Testschweine in der niedrigdosierten Impfstoffgruppe erhielten Bewertungen der durchschnittlichen groben Läsionen von 2,5 (Ileum) und 1,5 (Kolon). Testschweine aus der Gruppe mit mittlerer Impfstoffdosis erhielten eine Bewertung der durchschnittlichen groben Läsionen von 1,5 (Ileum) und 1,0 (Kolon). Gewebe der hochdosierten Impfstoffgruppe erhielten eine durchschnittliche Bewertung der groben Läsionen von 1,5 (Ileum) und 1,2 (Kolon).

Eine statistische Analyse der Bewertung der durchschnittlichen groben Läsionen unter den Behandlungsgruppen wurde unter Anwendung des Einweg-ANOVA-Tests durchgeführt. Die Bewertungen der durchschnittlichen groben Läsionen zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen dem Ileum in der ungeimpften Belastungskontrollgruppe und dem Ileum in der Gruppe mit mittlerer Impfstoffdosis und in der Gruppe mit hoher Impfstoffdosis ($p < 0,001$). Ein signifikanter Unterschied wurde bei den durchschnittlichen Bewertungen der groben Läsionen des Ileums bei der Belastungskontrollgruppe im Vergleich mit der niedrigdosierten Impfstoffgruppe ($p < 0,01$) festgestellt. Die durchschnittlichen Bewertungen der groben Läsionen des Kolons waren in der Belastungskontrollgruppe signifikant höher als in der Gruppe mit mittlerer Impfstoffdosis und der Gruppe mit hoher Impfstoffdosis ($p < 0,05$). Zusätzlich wurde eine signifikante Entwicklung von groben Läsionen im Ileum der niedrigdosierten Impfstoffgruppe im Vergleich zur strikten Kontrollgruppe festgestellt ($p < 0,001$). Es ergaben sich keine Anzeichen für eine statistische Signifikanz der durchschnittlichen Bewertungen der groben Läsionen (Ileum und Kolon) in der Gruppe mit mittlerer Impfstoffdosis und der Gruppe mit hoher Impfstoffdosis bei Vergleich mit der strikten Kontrollgruppe.

Schlussfolgerungen

Diese Studie belegte, dass bei 3 Wochen alten Schweinen ein Schutz gegen PPE erreicht wurde, wenn sie eine orale Verabreichung einer 2 ml-Dosis von B3903-Impfstoff (lyophilisiert) mit einem Mindestgehalt an 4,9 log lebendem *L. intracellularis* pro Dosis erhalten hatten. Ein ähnlicher, wenn nicht geringfügig besserer Schutz ergab sich in der Behandlungsgruppe mit hoher Impfstoffdosis, die 3 Wochen vor der Belastung 6,0 log/Dosis erhalten hatte. Die Gruppe mit niedriger Impfstoffdosis (3,8 log/Dosis) ergab keinen angemessenen Schutz gegen eine heterologe Belastung mit einer virulenten reinen Kultur, verglichen mit den Testtieren, die eine hohe oder mittlere Dosis des experimentellen Impfstoffes erhalten hatten. Statistische Unterschiede ergaben sich zwischen der Gruppe mit niedriger Impfstoffdosis und der ungeimpften Belastungskontrollgruppe in Bezug auf die Schwere der mikroskopischen Läsionen im Ileum und im Kolon ($p < 0,001$) und in Bezug auf die durchschnittlichen Bewertungen der groben Läsionen des

Ileums ($p < 0,01$). Jedoch wurden signifikante PPE-Läsionen im Ileum (mikroskopische Läsionen) und im Kolon (grobe Läsionen) dieser Gruppe im Vergleich zur strikten Kontrollgruppe, die weder Impfstoff erhalten hatten, noch belastet worden waren, festgestellt.

Insgesamt belegen die Daten dieser Studie folgendes: (1) der minimale Schutztiter einer einzigen oralen Verabreichung von B3903-Impfstoff (lyophilisiert) an 3 Wochen alte Schweine beträgt 4,9 log/Dosis; (2) B3903-Impfstoff (lyophilisiert) ist wirksam gegen eine virulente, niedrigpassagierte, reine Kultur von *L. intracellularis*, heterologes Isolat N101494; und (3) B3903-Impfstoff (lyophilisiert) unterstützt eine Verringerung der groben und mikroskopischen Läsionen, der Gewebekolonisierung und der fäkalen Ausscheidung von *L. intracellularis* bei geimpften Schweinen im Vergleich zu ungeimpften Schweinen.

Patentansprüche

- 5 1. Lebendimpfstoff zur Immunisierung eines Tiers, umfassend eine pharmazeutisch wirksame Menge eines avirulenten lebenden *Lawsonia intracellularis*-Isolats und einen pharmazeutisch verträglichen Träger, wobei es sich beim avirulenten lebenden Isolat um das *Lawsonia intracellularis*-Hinterlegungsisolat ATCC Nr. PTA-4926 oder um ein beliebiges avirulentes lebendes *Lawsonia intracellularis*-
10 Isolat europäischen Ursprungs handelt, dadurch gekennzeichnet, dass das avirulente lebende *Lawsonia intracellularis* 14 Tage nach einer Impfung keine fäkale Ausscheidung verursacht.
- 15 2. Lebendimpfstoff nach Anspruch 1, wobei die pharmazeutisch wirksame Menge des avirulenten lebenden Isolats von *Lawsonia intracellularis* 10^3 TCID₅₀ bis 10^6 TCID₅₀ pro Dosis beträgt.
- 20 3. Lebendimpfstoff zur Immunisierung eines Tiers, umfassend ein avirulentes lebendes Isolat von *Lawsonia intracellularis* und antigenes Material von mindestens einem der folgenden Pathogene: *Salmonella* spp, *Erysipelothrix* spp., *Haemophilus* spp., *Mycoplasma* spp., *Leptospira* spp., *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Brachyspira* spp., *Circovirus*, porcines reproduktives und respiratorisches Syndrom (PRRS)-Virus, Schweineinfluenzavirus (SIV), Virus der übertragbaren Gastroenteritis (TGE), Parvovirus und *Escherichia coli*; und einen
25 pharmazeutisch verträglichen Träger, wobei es sich beim avirulenten lebenden Isolat um das *Lawsonia intracellularis*-Hinterlegungsisolat ATCC Nr. PTA-4926 oder um ein beliebiges avirulentes lebendes *Lawsonia intracellularis*-Isolat europäischen Ursprungs handelt, dadurch gekennzeichnet, dass das avirulente lebende *Lawsonia intracellularis* 14 Tage nach einer Impfung keine fäkale
30 Ausscheidung verursacht.
4. Lebendimpfstoff zur Immunisierung eines Tiers, umfassend ein avirulentes lebendes Isolat von *Lawsonia intracellularis* und antigenes Material von *Salmonella*

choleraesuis, Erysipelothrix spp., Virus der übertragbaren Gastroenteritis (TGE), Escherichia coli, Clostridium spp. und Brachyspira spp.; und einen pharmazeutisch verträglichen Träger, wobei es sich beim avirulenten lebenden Isolat um das Lawsonia intracellularis-Hinterlegungsisolat ATCC Nr. PTA-4926 oder um ein beliebiges avirulentes lebendes Lawsonia intracellularis-Isolat europäischen Ursprungs handelt, dadurch gekennzeichnet, dass das avirulente lebende Lawsonia intracellularis 14 Tage nach einer Impfung keine fäkale Ausscheidung verursacht.

5. Lebendimpfstoff zur Immunisierung eines Tiers, umfassend ein avirulentes lebendes Isolat von Lawsonia intracellularis und antigenes Material von Salmonella choleraesuis und Erysipelothrix spp.; und einen pharmazeutisch verträglichen Träger, wobei es sich beim avirulenten lebenden Isolat um das Lawsonia intracellularis-Hinterlegungsisolat ATCC Nr. PTA-4926 oder um ein beliebiges avirulentes lebendes Lawsonia intracellularis-Isolat europäischen Ursprungs handelt, dadurch gekennzeichnet, dass das avirulente lebende Lawsonia intracellularis 14 Tage nach einer Impfung keine fäkale Ausscheidung verursacht.

6. Lebendimpfstoff zur Immunisierung eines Tiers, umfassend ein avirulentes lebendes Isolat von Lawsonia intracellularis und antigenes Material von mindestens einem der folgenden Pathogene: Clostridium spp., equines Influenzavirus (EIV), equines Herpesvirus (EHV), Alphavirus und West Nile-Virus; und einen pharmazeutisch verträglichen Träger, wobei es sich beim avirulenten lebenden Isolat um das Lawsonia intracellularis-Hinterlegungsisolat ATCC Nr. PTA-4926 oder um ein beliebiges avirulentes lebendes Lawsonia intracellularis-Isolat europäischen Ursprungs handelt, dadurch gekennzeichnet, dass das avirulente lebende Lawsonia intracellularis 14 Tage nach einer Impfung keine fäkale Ausscheidung verursacht.

7. Avirulentes lebendes Isolat von *Lawsonia intracellularis* zur Verwendung als Impfstoff, wobei es sich beim avirulenten lebenden Isolat um das *Lawsonia intracellularis*-Hinterlegungsisolat ATCC Nr. PTA-4926 oder um ein beliebiges avirulentes lebendes *Lawsonia intracellularis*-Isolat europäischen Ursprungs handelt, dadurch gekennzeichnet, dass das avirulente lebende *Lawsonia intracellularis* 14 Tage nach einer Impfung keine fäkale Ausscheidung verursacht.
8. Avirulentes lebendes Isolat von *Lawsonia intracellularis* nach Anspruch 7 zur Verwendung als Impfstoff zum Schutz eines Tiers gegen porcine proliferative Enteropathie.
9. Verfahren zur Herstellung eines Lebendimpfstoffes zur Induktion einer Immunantwort gegen *Lawsonia intracellularis*-Bakterien bei einem Tier, umfassend folgende Stufen:
- (a) Inkubieren eines avirulenten lebenden *Lawsonia intracellularis*-Isolats in Kulturzellen, die sich in Suspension bei einer Sauerstoffkonzentration von weniger als 10 Prozent befinden, um die Bakterien zu züchten, wobei es sich beim avirulenten lebenden Isolat um das *Lawsonia intracellularis*-Hinterlegungsisolat ATCC Nr. PTA-4926 oder um ein beliebiges avirulentes lebendes *Lawsonia intracellularis*-Isolat europäischen Ursprungs handelt, dadurch gekennzeichnet, dass das avirulente lebende *Lawsonia intracellularis* 14 Tage nach einer Impfung keine fäkale Ausscheidung verursacht; und
- (b) Mischen der gezüchteten Bakterien mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.