

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A01K 45/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780014511.7

[43] 公开日 2009 年 5 月 6 日

[11] 公开号 CN 101426367A

[22] 申请日 2007.2.22

[21] 申请号 200780014511.7

[30] 优先权

[32] 2006.2.23 [33] EP [31] PCT/EP2006/060243

[86] 国际申请 PCT/EP2007/051737 2007.2.22

[87] 国际公布 WO2007/096418 英 2007.8.30

[85] 进入国家阶段日期 2008.10.22

[71] 申请人 奥瓦根国际有限公司

地址 爱尔兰梅奥

[72] 发明人 L·莫兰

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 邹 锋 刘 玥

权利要求书 4 页 说明书 17 页

[54] 发明名称

生产无特定菌状态的禽蛋和禽类的改进方法

[57] 摘要

本发明提供培育无特定菌状态的禽类的改进方法。特别地,本发明提供提高当从亲代禽类获得时无菌状态的手术所得蛋的孵化率和存活率的方法。所述方法包括圈养作为亲代禽类的禽类,确定成熟前的蛋在生殖道中的位置和就蛋壳形成和钙化方面成熟前的蛋的发育阶段,在蛋转移到亲代禽类的泄殖腔之前通过手术将蛋在其壳内从亲代禽类取出,将蛋孵育并且孵化该蛋以产生蛋禽。该发明还涉及生产无特定污染状态的禽蛋及其用途。

1. 用于提高当得自亲代禽类时无菌状态的蛋的孵化率和存活率的方法，所述方法在无菌环境下在将成熟前的蛋在其壳内从亲代禽类取出之前进行，并且所述方法包括以下步骤：

(a) 圈养作为亲代禽类的禽类；

(b) 通过如下步骤判定从亲代禽类取出成熟前的蛋的时间：

(i) 在成熟前的蛋转移到亲代禽类的泄殖腔之前判定成熟前的蛋在亲代禽类的生殖道中的位置；和

(ii) 通过判定成熟前的蛋在蛋壳形成和钙化方面的发育阶段确定何时达到蛋壳形成和钙化的必需水平。

2. 权利要求 1 的方法，其中步骤(b)是通过观察和/或物理方法的组合进行。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述物理方法包括腹部和骨盆触诊、超声、X 射线和/或 MRI 扫描。

4. 前述权利要求中任一项的方法，其中所述方法使得能够在从亲代禽类取出成熟前的蛋之前判定成熟前的蛋在亲代禽类的骨盆出口之前的位置。

5. 权利要求 4 的方法，其使得能够确定成熟前的蛋是否实质上处在亲代禽类的胸骨尾侧方面和坐骨结节之间的半路上。

6. 前述权利要求中任一项的方法，其中观察方法包括监控和记录亲代禽类随时间的产蛋模式的步骤，用以估计蛋转移到远端生殖道和泄殖腔的时间。

7. 培育无菌状态的禽类的方法，包括在无菌环境下进行以下步骤：

a) 圈养作为亲代禽类的禽类；

b) 通过如下步骤判定将成熟前的蛋在其壳内从亲代禽类取出的时间：

i. 在成熟前的蛋转移到亲代禽类的泄殖腔之前判定成熟前蛋在亲代禽类的生殖道中的位置；和

ii. 通过判定成熟前的蛋在蛋壳形成和钙化方面的发育阶段确定何时达到蛋壳形成和钙化的必需水平；

c) 在已经达到所述蛋壳形成和钙化的必需水平并且在成熟前的蛋转移到亲代禽类的泄殖腔之前，将成熟前的蛋在其壳内从亲代禽类取

出；和

d) 将成熟前的蛋在其壳内孵育并且孵化成熟前的蛋以产生蛋禽。

8. 权利要求 7 的方法，其中步骤(b)是通过观察和/或物理方法的组合进行。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述物理方法包括腹部和骨盆触诊、超声、X 射线和/或 MRI 扫描。

10. 权利要求 7 到 9 中任一项的方法，其中所述方法使得能够在从亲代禽类取出成熟前的蛋之前判定成熟前的蛋在亲代禽类的骨盆出口之前的位置。

11. 权利要求 10 的方法，其中在成熟前的蛋实质上处在亲代禽类的胸骨尾侧方面和坐骨结节之间的半路上时将成熟前的蛋取出。

12. 权利要求 7 到 11 中任一项的方法，其中观察方法包括监控和记录亲代禽类随时间的产蛋模式的步骤，用以估计蛋转移到远端生殖道和泄殖腔的时间。

13. 权利要求 7 到 12 中任一项的方法，其中在蛋自然地转移到亲代禽类泄殖腔之前并且尽可能接近转移时间的时间将成熟前的蛋取出。

14. 权利要求 7 到 13 中任一项的方法，其另外包括除去当成熟前的蛋在生殖道中时感染成熟前的蛋的微生物的步骤。

15. 权利要求 14 的方法，包括以下步骤：

i. 鉴定在成熟前的蛋在生殖道中时感染成熟前的蛋的目标微生物；

ii. 选择适宜的抗微生物药例如氟喹诺酮、头孢菌素和大环内酯抗微生物药对抗目标微生物；和

iii. 将抗微生物药对亲代禽类给药和/或对成熟前的蛋卵内给药。

16. 权利要求 14 到 15 中任一项的方法，其中成熟前的蛋在生殖道中的感染通过跨卵巢的途径发生。

17. 权利要求 14 到 16 中任一项的方法，其中抗微生物药的剂量水平在卵内判定。

18. 权利要求 7 到 17 中任一项的方法，其中将亲代禽类处死、无痛处死或麻醉并且在步骤(c)中成熟前的蛋的取出是在距离亲代禽类的

处死、无痛处死或麻醉小于约 30 分钟进行。

19. 前述权利要求中任一项的方法，其中亲代禽类选自所有都在相同条件下培育的类似禽群。

20. 前述权利要求中任一项的方法，其中亲代禽类是在无菌环境下从处于相似的现存污染不存在状态的禽群自然孵化的。

21. 前述权利要求中任一项的方法，其中亲代禽类是禽群之一，所述禽群是通过适当的选择和通过在受控条件下的天然培育方法产生的处在另一污染不存在状态下的禽群，并且该方法用于提供处在不同污染不存在状态的禽类。

22. 权利要求 7 到 21 中任一项所述的方法，其中蛋禽形成禽群的一部分，并且在蛋禽孵化出之后，取得蛋禽的样品并且检验特定的污染物，以提供该群的无污染状态的量度。

23. 权利要求 7 到 22 中任一项所述的方法，其中当蛋禽中没有实现无特定污染状态时，将该蛋禽用作该方法中的亲代禽类。

24. 权利要求 7 到 23 中任一项所述的方法，其中蛋是通过手术从亲代禽类的腹部取出的。

25. 权利要求 24 的方法，包括以下步骤：

- i. 在禽类皮肤上形成切口；
- ii. 操纵子宫到表面；和
- iii. 在子宫形成切口并且将蛋取出，或者将子宫夹住并且将蛋取出。

26. 权利要求 7 到 25 中任一项的方法，其中从麻醉的、无痛处死的或处死的亲代禽类取出成熟前的蛋是在无菌环境下进行的，并且在整个过程中检查该过程的无菌性。

27. 权利要求 7 到 26 中任一项所述的方法，其中将蛋禽从无菌环境取出以产蛋，随后将蛋孵化以产生进一步的蛋禽。

28. 权利要求 7 到 27 中任一项所述的方法，其中将蛋禽从无菌环境取出并且饲喂包含正常肠道菌群的食物。

29. 前述权利要求中任一项的方法，其中禽类是鸡。

30. 权利要求 7 到 29 中任一项所述的方法，其中当禽类从无特定污染状态的蛋禽被孵化并且不是蛋禽时，将如此得到的禽类在无菌环

境下培育，用于随后使相同的或较低无污染状态的蛋禽受精。

31. 在无菌环境下提供无菌状态的蛋的方法，包括：

- i. 圈养根据权利要求 7 到 30 中任一项的方法提供的具有相同或更好的无污染状态的蛋禽；
- ii. 使用该蛋禽产蛋；和
- iii. 将蛋取出到另一个无菌环境。

32. 权利要求 31 的方法，其中，在产蛋时，将所述蛋立即取出并且将蛋的壳进行消毒。

33. 根据权利要求 31 或 32 的方法生产的蛋。

34. 从权利要求 33 的蛋孵出的禽类。

35. 根据权利要求 7 到 30 的方法孵出的禽类。

36. 从根据权利要求 7 到 30 中任一项的方法培育的蛋禽所产出的蛋孵出的禽类。

37. 根据权利要求 31 到 33 中任一项生产的蛋用于生产治疗和预防用生物学物质，例如疫苗、抗体、单克隆抗体、纤维原细胞、蛋白质和/或用于血清学试验的抗原或其它类似的蛋白产品的用途。

38. 权利要求 37 的用途，用于生产疫苗，其中蛋被注射选定的病毒株，然后将蛋孵育以生产病毒，和从其生产的病毒生产疫苗。

39. 权利要求 37 的用途，其中蛋产生外源蛋白质。

40. 用于治疗 and 预防性方法的生物制品，其使用根据前述权利要求中任一项的方法生产的蛋来制备。

41. 权利要求 40 的生物制品，其为疫苗、抗体、单克隆抗体、纤维原细胞、蛋白质和/或用于血清学试验的抗原或其它类似的蛋白产品。

42. 权利要求 41 的生物制品，其中所述制品为疫苗，优选为流感病毒疫苗。

43. 生产半无菌的蛋用于根据权利要求 7 到 30 中任一项的方法补充禽类种群的方法，其中亲代禽类得自需要补充的禽群，对由所述亲代禽类产生的蛋禽进行试验以提供无菌状态的量度，并且一旦已经获得期望的无菌状态，则所述蛋禽及其后代形成适宜的无菌状态的禽群。

生产无特定菌状态的禽蛋和禽类的改进方法

技术领域

本发明涉及一种培育无特定菌状态的禽类的改进方法。特别地，本发明涉及提高以无菌方式从亲代禽类腹腔取出的且处于无菌状态的蛋的孵化率和存活率的方法。本发明另外涉及无特定菌状态的禽蛋的生产。

在本说明书中，术语“无污染的”和“无菌的”可互换地使用。这些术语被非常广泛地使用，并且是指可以被禽类携带的许多病原体 and 传染源(infection)，所述禽类特别是家禽例如鸡、火鸡和其它禽类，这些禽类被广泛用于生产繁殖用禽群，以生产用于商业生产的受精蛋，和生产供人类消费的蛋和肉。此外，这些蛋和禽类用于生产各种各样的生物学物质，包括疫苗、抗体、单克隆抗体、纤维原细胞和蛋白质，都用于人和动物的治疗和预防应用。它们另外广泛地用于诊断性试验和生产转基因的蛋和禽类。这些应用中有许多都需要蛋和/或由它们产生的禽类不含所有的或指定的污染物，例如传染源，包括各种寄生虫、细菌、支原体、病毒、反向病毒、朊病毒、DNA 和 RNA 片段。有时，病毒可以是小病毒，包括微小核糖核酸病毒和细小病毒。经常使蛋污染的一些细菌包括梭状芽孢杆菌和肠道杆菌。有许多非病原性生物体应该被控制。同样地，许多微生物，包括寄生虫、需氧菌和厌氧菌、共生微生物，和与消化道和泄殖腔有关的微生物，都是不希望有的。同样地，支原体、病毒(包括反向病毒、朊病毒)、真菌、酵母菌和霉菌也都是不希望有的。

因此，术语“无特定污染”或“无菌状态”可以包括这些中的一些或其全部，并且比仅仅无指定的病原体的含义宽泛得多。例如，常规的无特定病原体(SPF)没有指定不含某些病毒，并且实际上可以被细菌和病毒污染。因此，对于某些应用，这些可能是足够的。蛋和禽类的预定用途决定了所述蛋或禽类必须不含哪些污染物。常规的无菌蛋和一些无特定病原体的蛋是通过用化学品(包括消毒剂和抗生素)处理自然产下的鲜蛋并且将它们置于隔离器中得到的。这种自然产下的蛋得自经过挑选的亲代种禽(parent stock birds)。尽管这些方法在生产无特定病原

体 (SPF) 的蛋方面相对成功,但是它们在生产无污染的蛋方面没有获得真正的成功。毕竟,化学品不能除去来自例如在即将产蛋前和/或刚刚产蛋之后,以及和在灭菌之前进入蛋壳孔中的细菌的污染。无论是无特定病原体的、无菌的或限菌的蛋的污染都导致不符合技术条件,并且在许多情况中导致商业价值和应用的损失。

背景技术

欧洲专利 0 295 964 描述了体外鸟禽胚胎孵化技术,其相当详细地描述了蛋的胚胎发育。该说明书涉及在胚胎被转移出蛋壳之后在一个密闭的容器中孵化。实际上,在该说明书中,使用的容器优选是蛋壳的一部分,所述蛋壳选自与被孵化蛋为同种的蛋壳,或者,根据该发明,所述蛋壳选自相似母鸡的蛋壳的一部分。该发明涉及家禽的基因工程,但也涉及研究鸟禽类发育的基本机制。相似地,欧洲专利 0 511 431 公开了母鸡的受精卵的体外孵化方法,在产蛋之后大约 1 小时内从母鸡输卵管膨大部的上部取出刚刚受精的胚胎,然后孵化。然而,这两个说明书都仅公开了蛋的人工孵化,没有涉及本发明的目的。

欧洲专利申请 01650109 涉及培育无特定污染状态的禽类的方法。在该申请中公开的一般方法包括圈养作为亲代禽类的禽类,在蛋转移到亲代禽类的泄殖腔之前将蛋从亲代禽类中无菌取出,对蛋进行孵育 (incubating) 和孵化 (hatching) 以产生蛋禽。该申请还涉及生产无特定污染状态的禽蛋。

然而,这些方法仍然需要改进。期望增加孵化率和降低活雏禽的死亡率。商业上非常期望获得稳定的结果和包括高孵化率的结果(理想地接近 >85% 的商业范围,但是确定地稳定在 >50%)。这在应对小的、稀有的和价值高的禽群诸如例如转基因禽类时具有特别的并且是关系重大的重要性。

与前述申请相比,本发明提供实现无菌蛋的稳定的高孵化率的改进方法。因此,本发明涉及欧洲专利申请 01650109 中要求保护的方法的细化和改进。

发明内容

本发明涉及培育无特定菌状态的禽类的改进方法。特别地,本发明涉及特定技术的应用,所述技术可用于确保成熟前的蛋在其壳内在进入泄殖腔之前被取出,并且根据本发明保持无菌。

根据本发明的更一般的实施方案，提供了用于确定何时可以将成熟前的蛋在其壳内从亲代禽类取出的方法。

根据本发明的第一方面，提供了提高在从亲代禽类获得时无菌状态的手术所得蛋的孵化率和存活率的方法，其中所述方法是从亲代禽类取出成熟前蛋之前在无菌环境下进行，并且包括以下步骤：

a) 圈养作为亲代禽类的禽类；

b) 通过如下步骤判定从亲代禽类取出成熟前的蛋的时间：

i. 在成熟前的蛋转移到亲代禽类的泄殖腔之前判定成熟前的蛋在亲代禽类的生殖道中的位置；和

ii. 通过判定成熟前的蛋在蛋壳形成和钙化方面的发育阶段确定何时达到蛋壳形成和钙化的必需水平。

根据本发明的第二方面，提供一种培育无菌状态的禽类的方法，所述方法包括在无菌环境下进行如下步骤：

a) 圈养作为亲代禽类的禽类；

b) 通过如下步骤判定成熟前的蛋在其壳内从亲代禽类取出的时间：

i. 在成熟前的蛋转移到亲代禽类的泄殖腔之前判定成熟前的蛋在亲代禽类的生殖道中的位置；和

ii. 通过判定成熟前的蛋在蛋壳形成和钙化方面的发育阶段确定何时达到蛋壳形成和钙化的必需水平；

c) 当已经达到所述蛋壳形成和钙化的必需水平并且在成熟前蛋转移到亲代禽类的泄殖腔之前，将成熟前的蛋在其壳内从亲代禽类取出；和

d) 将成熟前的蛋在其壳内进行孵育并且孵化成熟前的蛋以产生蛋禽。

根据本发明的第三方面，提供了在成熟前的蛋进入泄殖腔之前除去微生物的方法，所述微生物可以在成熟前的蛋处于生殖道(包括卵巢)中时感染成熟前的蛋。

根据本发明的第四方面，根据本发明产生的蛋被用于生产以治疗和预防为目的的生物物质。

根据本发明的第五方面，本发明的方法用于提供无菌禽类作为种禽(bird stocks)的补充。

发明详述

泄殖腔是禽类体内的主要污染区域。泄殖腔是与禽类的消化系统和生殖系统都相连的腔，因此蛋和粪便可能同时存在于泄殖腔中。总的来说，蛋在进入泄殖腔之前没有被污染。然而，由于蛋壳在较短时间内是多孔的，在其进入泄殖腔时的外来污染是主要的问题。因此，本发明认识到需要特定的方法从亲代禽类取出成熟前的蛋，同时保持其无菌状态。

特别地，本发明认识到有必要对判定将成熟前的蛋在其壳内从亲代禽类取出的时间的方法进行改进和细化。因此，本发明提供了用于提高当从亲代禽类获得时无菌状态的所得蛋的孵化率和存活率的方法。无菌状态的蛋的孵化率和/或存活率的任何提高都具有显著的商业重要性，即使提高的百分比是相对有限的。

本发明还认识到，在无菌蛋的生成中，去除在蛋处于生殖道中和在蛋进入泄殖腔之前能够感染蛋的微生物、细菌、支原体、病毒、反向病毒、朊病毒、寄生虫是重要的。

特别地，本发明认识到需要在成熟前的蛋在亲代禽类中发育完成之前和在其离开亲代禽类之前精确地判定成熟前的蛋在生殖道中的准确的位置和发育阶段。这保证了成熟前的蛋在准确的时间离开亲代禽类，以确保产生能够生长发育的蛋和蛋禽(laying birds)。如果太早地取出成熟前的蛋，它可能具有软的未钙化的壳，这将需要更特别专业化的培养条件并且可能不产生能够生长发育的蛋。将成熟前的蛋在进入泄殖腔之前从生殖道取出，防止了蛋和由其产生的禽类的污染。本发明提供特定的方法，用以确定何时将蛋从亲代禽类取出，并且根据蛋壳形成和钙化在准确的时间从亲代禽类取出成熟前的蛋，以产生能够生长发育的蛋和蛋禽。

通常，在取出蛋之前，记录亲代禽类随时间的产蛋模式随时间的推移被记录，以得到蛋转移到末端生殖道和泄殖腔的估计转移时间。在这个阶段，优选蛋和蛋壳完全形成。这提供了一个指导，使得蛋从腹腔被无菌的取出可以在尽可能接近估计转移时间但是在其转移之前进行。

理想地，蛋壳应该钙化到可以使用检定方法来量化的后期阶段，所述检定方法例如射线照相法，或者甚至是通过柔和的数字加压、触

诊和观察蛋壳的变形。部分钙化的壳和特别地具有低钙化水平的壳通常是软的和易碎的，并且由此具有低的孵化率水平。本发明认识到，如果希望得到蛋和禽类最佳的孵化率和存活率，不能在这个阶段取出成熟前的蛋。

根据本发明的一个实施方案，在将蛋从亲代禽类取出之前定义发育阶段的方法，特别是与壳沉积和在生殖道中的位置有关的方法，可以包括观察(通过连续观察或时间推移的视频记录)适用于种类和个体禽类的正常产蛋周期或改变的周期内的正常频率(例如每天)和产蛋时间。观察相对于排卵时间和产蛋的时间，每个蛋何时停留在生殖道包括子宫的不同部分中以及停留多久。观察的这些不同情况的相关性使得能够不仅预测例如下一个蛋何时停留在子宫中，而且能够预测其发育阶段，例如蛋壳形成和钙化的程度。

这个方法可以在某些更大的种类(例如鸡)中根据蛋在腹腔中的物理位置进行细化。这种方法对于在触诊观察、蛋发育阶段和在生殖道中的位置之间确定必要的相关性之后的常规应用特别有用。

还可以将确认蛋在生殖道中的位置和通过物理方法(包括腹部和骨盆触诊，显像技术例如超声、X射线或MRI，和/或通过全身麻醉和手术或尸体解剖直接观测)以确定壳的存在与观察技术组合，或单独使用。

显像技术通常需要使用例如氟烷和氧气将禽类全身麻醉。用于猫和狗显像的兽医设备经常在系统调整曝光设置之后适用于禽类。超声波只在腹部具有很少或没有羽毛的禽类中才是可能的。

触诊通常在禽类保持接近正常立位的情况下进行。腹部的触诊在操作者的拇指和其它手指之间进行。触诊应该轻柔地进行，以避免对禽类或腹腔内的蛋造成任何损害。

如果随后要使用广泛常规的孵育和孵化条件，则不应在壳钙化之前将蛋取出。较不成熟的蛋，例如具有软的未钙化壳的或更早的那些，需要专业化的培养条件和/或容纳蛋壳(recipient eggshells)。如果对于特定的禽类和蛋存在不确定性，则应该延迟蛋的取出，直到观察的蛋已经产出。随后的蛋然后可以被取出。

这些技术包括由执行该过程的人进行的主观评价。触诊确定蛋是否是软的和是否未钙化。这种技术可以与判定腹腔内蛋的位置的技术

相组合。蛋应该位于骨盆出口之前。优选地，蛋应该位于胸骨尾侧方面和坐骨结节之间的实质半路上。这个距离随禽类的不同而不同。优选地，触诊用于与 X 射线、MRI 或超声显像技术相组合。

根据本发明的一个实施方案，该方法包括观察和/或物理方法的组合。理想地，所述物理方法包括腹部和骨盆触诊、超声、X 射线和/或 MRI 扫描。理想地，观察方法包括如下步骤：监控和记录亲代禽类随时间推移的产蛋模式，以产生估计的转移时间。最适宜方法的选择根据触诊操作者的手熟练程度和技巧以及其它因素例如禽类的大小而定。可以通过如下方法更加细化：仔细观察个体禽类以判定在一天中禽类通常产蛋的时间；目的是在接近预期产蛋和略在其之前将蛋取出。

根据本发明的另一个实施方案，提供了在蛋处于生殖道(包括卵巢)中但在进入泄殖腔之前防止成熟前的蛋被可能感染蛋的微生物所感染的方法。这种感染类型可通过跨卵巢的途径。可以通过对亲代禽类和/或蛋给予适合于目标微生物的抗微生物药以阻止微生物进入发育的蛋或将其从未产出的蛋除去。这个实施方案提供了通过选择针对蛋中的目标微生物具有活性的抗微生物药并且将它们对亲代禽类或未产出的蛋给药而从除去未产出的成熟前的蛋的污染的方法。

正确的抗微生物药及其剂量、方案和给药途径的选择基于卵内浓度和对蛋的特定发育阶段为卵内特异性的获得时间。这些给药方案和途径可以不同于更典型地用于常见疾病的常规治疗的那些。

该方法通常包括通过使用标准的微生物鉴定实验室技术鉴定目标微生物，然后选择适宜的抗微生物药来杀死微生物。

抗微生物药、给药方案和给药途径的选择可通过在国家标准和国际标准例如 CLS 中运用的临床微生物学实验室中常规采用的标准体外敏感性结果来确定。为了得到最佳结果，应该采用测定抗微生物药在卵内的浓度和时间卵内判定相对于剂量给药剂量时间和蛋的特定发育阶段的抗微生物药的浓度和时间。单独的抗微生物药的卵内浓度需要在一系列处于不同发育阶段下的蛋的样本中判定的蛋中浓度的药代动力学数据。这可以如下判定：将已知剂量的抗微生物药给予产蛋母鸡，然后在适宜的一系列时间点(取决于抗微生物药的给药，例如给药之后的 0.5、1、2、4、8、12、20 和 24 小时)将产蛋母鸡无痛处死并且在死后收集适宜的蛋的样品。应该使用适合于并且特别有效地用于蛋类物

质的常规方法判定蛋中的抗微生物药浓度。

氟喹诺酮、头孢菌素和大环内酯抗微生物药可用于减少或除去细菌和支原体，取决于根据抗微生物药在禽类物种中的敏感性和安全性而定。应该给予氟喹诺酮抗微生物药如恩氟沙星以实现浓度依赖性的细菌或者支原体杀灭效果，并且使用的给药方案至少是用于常规治疗用途所推荐的那些。例如，恩氟沙星以 10-30 mg/kg/天在 2-5 小时的时间段中在水中给药。头孢菌素和大环内酯抗微生物药应该使用各种给药方案以确保基于时间依赖性细菌杀灭的最大暴露。还可以使用其它类型的抗微生物药。

可以通过对亲代禽类和/或蛋给予适合于目标微生物的抗微生物药阻止微生物进入发育的蛋或将其从未产出的蛋除去。抗微生物药通常口服(胃管灌食或在饲料或水中)给予，或者通过皮下、肌肉内、或静脉内途径非肠道给予。还有可能通过超声引导或腹腔直接注射到在母鸡体内发育中的蛋内。

理想地，通过手术将蛋以无菌的方式从亲代禽类的腹腔取出。

本发明另外提供无菌手术取出方法，包括以下步骤：

进行剖腹切开并且用缝线将禽类输卵管的两头系上；

在每个缝线的远端横切输卵管；

将装在输卵管中的蛋取出；

将输卵管灭菌；

将蛋取出；和

将蛋灭菌。

或者，手术无菌取出方法可以包括：

在禽类皮肤上形成切口；

操作使子宫来到表面；和

在子宫形成切口并且取出蛋和子宫，或者将子宫夹住并将蛋取出。

在将子宫被夹住并将蛋被取出时，可以将子宫修复以便该禽类可以产更多的蛋。这在其中亲代禽类是贵重的并且不能处死的情况中时特别重要。在这种情况下，禽类被麻醉。或者，可以在无菌取出蛋之前将禽类无痛处死。

蛋的无菌手术取出最好在从距离无痛处死或麻醉的时间小于约 30 分钟内迅速地完成，以避免损害胚胎存活率。麻醉剂的延长使用、或

无痛处死亲代禽类和蛋的取出之间的过度延迟会不利地影响胚胎存活率。

一旦从亲代禽类取出，将蛋在无菌环境下孵育并且孵化以产生蛋禽。

本质上，本发明提供了将来自亲代禽类的人工所得蛋用于生产蛋和由此产生的禽类以得到生微生物受控的蛋禽的用途。所述蛋和禽类适合于它们随后的应用，孵化、培育、保持和繁殖，以常规方式进行或在某种形式的隔离器或无菌环境中进行。

理想地，在无菌环境下饲养作为亲代禽类的禽类，用无菌食物喂养禽类。然后，在蛋转移到亲代禽类中可能污染的区域之前将蛋从亲代禽类取出，然后将蛋孵育和孵化，以产生保持在这种无菌环境下的蛋禽。

在本发明的一个实施方案中，亲代禽类选自全部都在相同条件下培育的相似的禽群。

在本发明的另一个实施方案中，亲代禽类是在无菌环境下从相似的现存污染不存在状态的禽群自然孵化的。

在本发明的另一个实施方案中，亲代禽类是禽群之一，所述禽群是通过适当的选择和在受控条件下的通过天然培育方法产生的另一污染不存在状态，并且该方法用于提供处于不同污染不存在状态的禽类。

优选地，蛋禽形成禽群的一部分，并且在蛋禽孵化之后，取得蛋禽的样品并且检验特定污染物，以提供该群的无污染状态的量度。理想地，当在蛋禽中未实现无特定污染状态时，将该蛋禽用作该方法中的亲代禽类。通过反复过程，有可能最终产生实质上无菌状态的禽群。

在一个实施方案中，将蛋禽从无菌环境取出用于产蛋，随后将蛋进行孵化以产生另外的蛋禽。

在另一个实施方案中，将蛋禽从无菌环境转移出并且饲喂包含非致病性的正常肠道菌群的食物。可以以低成本保持通过这种方法生产的具有正常肠道菌群的禽类并且适合于消费或用于食品工业。

在另外的实施方案中，鸡的无菌蛋或成年禽类可能感染选定的非致病性生物(包括可能的益生菌和寄生虫)，或感染有所选择的病原体或非病原体和病原体的组合。如此生产的蛋或禽类可用于例如宿主-病原体相互作用、宿主-共生物相互作用的科学研究和用于发现和开发新

疾病的治疗和预防方法，和在禽类或哺乳动物中应用的产品。

典型地，禽类是鸡。尽管这些方法可以在所有的禽类中进行。

尽管以上描述完全涉及家禽并且特别地涉及母鸡(hens)，但是应该理解，可以对其它禽类实施本发明。

优选地，当禽类是从无特定污染状态的蛋禽孵化而来并且不是蛋禽时，如此得到的禽类在无菌环境下培育，用于处在相同的或低级无污染状态下的蛋禽的随后受精。

本发明还提供通过任何本发明方法生产的蛋和禽类。

根据本发明的另一个方面，本发明另外提供一种方法，用于提供无特定污染状态的蛋，所述方法包括在无菌环境下进行以下步骤：

圈养具有本发明的方法提供的相同或更好的无污染状态的蛋禽；

使用该蛋禽产蛋；和

将蛋转移到另一个无菌环境。

理想地，在产蛋时将蛋立即取出并且将蛋壳进行消毒。

然后该蛋禽可用于产蛋，所述蛋的本身可能是最终产品，或者可将其孵化为禽类，所述禽类可以形成无菌状态的禽群，或者，如果其不是蛋禽，可用于使蛋禽受精。

优选地，将在其壳内的蛋取出之前将禽类麻醉或无痛处死或杀死。雌性亲代禽类可为活的或刚刚杀死的。基于伦理、法律、和动物福利方面的考虑，活的禽类可以是完全有意识、被镇静、或被麻醉。蛋和卵可以是受精或未受精的。

可通过本发明控制的传染性生物体包括对有关物种为致病性或非致病性的生物体。所述这些物种包括鸟禽类物种(典型地为鸡、家禽和火鸡)、人类和其它哺乳动物(典型地为狗、猫、马、牛、猪、绵羊、山羊、大鼠和小鼠)。对于本发明的目的，微生物包括寄生虫、细菌(包括厌氧菌和需氧菌、共生菌和与消化道有关的细菌)、支原体、病毒(包括反向病毒)、朊病毒、真菌、酵母菌、霉菌、以及DNA和RNA片段。

如果受精的蛋用于产生后代禽或衍生禽(derived birds)时，则可以将蛋在常规的饲养系统、无特定病原体(SPF)系统、或在隔离器中孵化、培育、保持和繁殖，以控制微生物的进入和保持无菌状态。

根据本发明，为了最大限度地除去微生物，优选将蛋从亲代母禽无菌地得到(除非它们也是无菌的或是限菌的)并且其生活周期应该在

隔离器中完成。在生产无特定病原体（SPF）的蛋和禽类时，生活周期可以在隔离器外完成。

根据本发明，蛋的无菌得到和(如果适宜)禽类的孵化、培育、维持和繁殖可以与其它控制微生物污染的方法组合。这些方法包括消毒剂、抗微生物药、抗生素、抗病毒药、抗寄生虫药、免疫调节剂和疫苗。

应该理解，在某些情况中，在将经过挑选的禽类取作亲代禽类时，产生的蛋禽可能事实上对于产生适宜质量的蛋禽来说不是充分无污染物的。这样可能需要使用由这种蛋禽生产并且从这些蛋禽人工取出的蛋再次执行相同的步骤，以提供希望是无污染的进一步的蛋禽。

应该理解，在被孵化的禽类不是蛋禽时，则可以将它们保留，用于随后使蛋禽受精。这样，整个禽群可以是无菌的。

在本发明中，有可能简单地产生用于随后应用的蛋。在蛋需要是无菌状态时，要做的第一件事是将通过手术从亲代禽类得到的蛋进行孵育。

在同时保持在无特定污染或无菌环境情况下培育和繁殖处在健康和能产蛋状态下的禽类，需要专业化的饮食以补偿某些养分的缺乏，所述养分的缺乏是由例如在常规条件中的禽类的消化道中或皮肤上发现的污染物导致的。

根据本发明的又一个实施方案，提供了从根据本发明产生的无菌蛋获得治疗和预防用生物制品的方法。这种产品包括疫苗(活疫苗和灭活疫苗)、抗体、单克隆抗体如干扰素、治疗和预防用蛋白质和其它类似的生物制品，这些都是通过公知的技术产生。还可以产生用于血清学试验或其它诊断性试验的抗原。所述蛋可用于组织/细胞培养物和培养介质的生产和研究应用。蛋用于生产例如单克隆抗体的应用具有如下益处：即产生的抗体或其它蛋白质具有高的活性，在例如糖基化作用方面具有与人类抗体相同的形式。此外，可以减少与得到的蛋白产品/单克隆抗体的纯化有关的成本，因为除去活的微生物和毒性或污染性产物需要额外的并且通常是昂贵的处理，并且所述处理经常引起目标蛋白的收率和/或效力降低。

任选地，亲代禽类可以是转基因禽类(即，经过转基因修饰以携带外源性DNA的禽类)，由其得到的蛋可以产生外源蛋白质或其它物质。

存在疫苗被由含胚蛋所传播的病原体污染的风险。过去，为了使

疫苗生产成功，使用得自无特定病原体(SPF)的群的胚胎来使该风险最小化，并且选择性地或另外地将所述群保持在非常干净的环境中。这种生产无菌状态的蛋的新方法保证了用于疫苗生产的蛋是无菌的，并且克服了可以导致疫苗被那些认为对于人类或动物应用不安全的污染和无菌性问题。这种新方法本质上提供了没有被微生物污染的无菌蛋的替代来源。这样的益处在于克服了以前在污染方面遇到的问题。

根据本发明生产的蛋可用于隔离致病性微生物；生产疫苗、抗体、单克隆抗体和其它治疗和预防用的分子例如肽和蛋白质；和生产用于血清学试验的抗原。

由蛋生产对抗微生物例如病毒的疫苗通常通过以下方法发生。选择适宜的病毒株，然后使其适于在蛋中生长。这些适于生长的病毒株被注射到受精蛋中，随后孵育以使病毒生长。然后可以在蛋达到孵化阶段之前从蛋收获大量的病毒。然后将收获的病毒混合并且通过若干步骤处理，最终生产酌情适合用于人类或动物接种的全配方疫苗。收获高达数百万只蛋的大批原料、处理并且混合，以形成疫苗产品。大量的蛋被用于制造病毒种子以引发蛋被目标病毒感染，并且还用于评价疫苗的安全性，例如用于确认没有外来试剂或目标病毒在疫苗中的不适当处理。

应该理解，疫苗可以由灭活病原性微生物、活微生物菌株、重组株、亚单位和/或分离的特异性抗原组成。

根据本发明又一个方面，提供了生产微生物学半无菌的禽类或无特定病原体的禽类，用于补充禽类种群。这在常规繁殖和/或无特定病原体(SPF)的群被破坏并且被特定病原体感染的情况中特别有价值。在这些情况中，重新产生无特定病原体群的最迅速和有效方法之一是从现有的被感染群衍生出新的群，其中通过使用这些被感染的群来产生以无菌方式从感染群筛选和选择的禽类衍生的无菌蛋。这种方法在被感染的禽类具有特殊的遗传或转基因价值时特别有价值。这特别适用于已经被例如禽流感病毒或某些细菌类例如沙门氏菌感染的禽类种群。

禽流行性感冒或“禽流感”是禽类的接触性传染病。尽管认为所有的禽类都是易受感染的，但是驯养的家禽群特别易受感染，可以迅速地达到流行病的比例。最主要的控制措施包括迅速销毁被感染的禽类、

恰当地处理尸体和对剩余的禽类种群进行隔离和严格的灭菌。本发明用于生产无菌禽类的方法适用于其中已经爆发这种病毒并且需要补充禽类种群的情况。这种方法提供了安全和可靠的方法，用于重建呈无菌或者至少是半无菌的或特定的状态(包括无包括禽流感病毒在内的特定微生物)的禽类种群。

生产无菌的、半无菌的或无特定病原体的蛋用于补充禽类种群的方法包括前述权利要求的任何方法，其中亲代禽类得自需要补充的禽群，或者得自适合的替代物，对根据本发明方法由所述亲代禽类产生的蛋禽进行试验，以提供无菌状态的量度，并且一旦已经获得期望的无菌的状态，则所述的蛋禽用于使用要求保护的方法产生后代，以形成适宜的无菌状态的禽群。

做为选择，禽类和蛋可以用于食物和人类消费者应用，或者用于动物应用，例如在指定的情况中用于通常对感染敏感的特别敏感的患者，或者用于其中期望避免感染的任何动物或人类。

应该理解，本发明应用于全部鸟禽和爬行动物类，包括但不限于鸡、火鸡、鹌鹑、鸭、鹅、珍珠鸡、雉鸡、鹧鸪、鸚鵡、和松鸡。

通过以下对本发明方法的描述可以更清楚地理解本发明。

实施例 1

方法

对已知无特定病原体 (SPF) 状态下的五十只成年雌鸡和五只成年雄鸡的鸡群保持提供经过选择的饮食并且允许自然繁殖。在两周的周期内分别记录每只母鸡产蛋(产卵)的时间。计算每只母鸡一天中产蛋的平均时间(时间, L)。计算 L-3h 的时刻并且将从 L-3 到 L 的时期命名为衍生间隔(derivation interval)。这个间隔是其中进行无菌的手术剖腹手术用于取出在每只禽类中发育程度最高的蛋的时间。

对于该过程，通过颈部脱节将禽类无痛处死，然后立刻准备。将禽类浸在消毒剂溶液中 5 分钟。从腹侧的胸部和腹部除去羽毛并且用加热到 37°C 的 50% 的碘的酒精溶液将皮肤消毒。然后将每只禽类置于专门改造的手术隔离器下，所述隔离器用 5% 过氧乙酸溶液消毒并且包含无菌装置和含碘的酒精溶液的 500 ml 烧瓶。将禽类用无菌布帘盖上，然后使隔离器的无菌进口端口置于布帘上方。制造剖腹手术切口并且使用缝线材料将输卵管(通常是子宫)在蛋的两侧系上。然后在蛋的远端

将输卵管横切并且将包含蛋的输卵管从母鸡的腹腔取出。然后将被子宫包围的蛋置于碘的酒精溶液中五分钟，其后将被输卵管包围的蛋通过进口端口从手术隔离器转移到接受隔离器。在接受隔离器中，将输卵管切开，将蛋取出，用消毒剂溶液擦洗并且转移到改造为孵卵箱的隔离器中。

在孵出的第一天内，将活鸡雏从孵化隔离器取出并且转移到适合于培育幼鸡群的两个大规模培育隔离器中。用经过辐射消毒的商业饮食饲养小鸡。在 18 日龄时，从每个饲养隔离器取出五只小鸡，无痛处死并且取样用于通过需氧和厌氧培养进行细菌学检查。样品包括肝脏、脾、心脏血、阴道/泄殖腔、盲肠和小肠消化物和粪便。

结果

从人工获得的蛋成功地孵出活鸡雏(孵化率>50%，更经常>90%)。没有从小鸡样品分离得到厌氧菌或需氧菌。

结论

在鸡中建立了安全的用于人工生产无菌受精蛋的方法。蛋是可被孵化的并且产生在隔离器中被成功保持的活的无菌小鸡。在欧洲专利申请 01650109 中公开的上述方法毫无疑问地能够生产无菌小鸡。然而，该方法的重复应用显示，结果变化显著并且经常给出通常是商业上不可接受的相对低的孵化率(例如<30%)。

实施例 2

根据实施例 1 的规程，在 2 年时间内进行了一系列其它的研究，以便改进和细化实施例 1 的方法。

将总共 106 只禽类，分为不同年龄和基因型的六个禽群，用于一系列的小型研究(各自使用 9 到 20 只禽类)来衍生出无菌蛋。在这个时间过程中，雏鸡的孵化率和微生物学无菌状态都显著变化，孵化率范围从 0 到 40%。这比以前的结果显著降低。另一个糟糕的因素是，在得到无菌状态的一些研究中，由于在获得蛋的过程中的微生物污染而导致的失败。因此，通常增加在诱导麻醉或无痛处死之后获得蛋所花费的时间，以确保无菌性。

因此进行了一系列研究(实施例 2A-D)以评价蛋取出过程中不同差异对得自衍生蛋的雏鸡雏的孵化率和微生物学状态的影响。这些变量包括从无痛处死或麻醉诱导到从亲代腹腔取出蛋的时间、和相对于产

蛋的预期时间的蛋取出时间和蛋在生殖道中的发育/成熟阶段。评定包括蛋的未成熟性(例如软的壳或蛋太不成熟以至于不能被完整取出)、孵化率、无菌和组织的操作容易程度(组织的操作容易程度引起从无痛处死/麻醉到取出蛋的时间显著增加)。分别地评价各个变量。

在这个实施例中评价影响通过无菌剖腹手术获得的受精蛋的无菌性和存活率的变量。在所述研究中进行的评价和得到的结果在以下提供。

实施例 2A

在期望的产卵和将蛋从亲代禽类无菌手术取出之间的时间差对于蛋的存活率和无菌性和手术操作容易程度的影响。

结果

孵化率: 对照(自然生产的蛋), 85-100%孵出, 80-100%无菌;

在麻醉或无痛处死 30 分钟内从子宫取出的蛋, 13-40%孵出, 80-100%无菌;

在无痛处死之后 60 分钟从子宫取出的蛋, 14%孵出, 80-92%无菌。

这些结果确定了母鸡中成熟前蛋的存活率在无痛处死之后随时间降低。

手术操作的容易程度:

对照, 不适用;

上述 30 分钟, 良好, 组织容易提升;

上述 60 分钟, 困难, 组织难以提升/早期死后僵直。

这些结果确定了通过在 30 分钟内完成手术, 使得在无菌手术隔离器中通过无菌手术取出蛋变得方便。

实施例 2B

定时产卵、触诊、这些技术的组合之间相对比, 对具有完整的壳与软壳的比例、存活率(通常是孵出时的活鸡雏)和对手术操作容易程度的影响。

结果

单独的定时, 软的壳, 不适合蛋的取出 8-71%, 存活率 13-50%, 无菌性 75-100%, 手术操作的容易程度为可变;

单独的触诊, 软的壳&不适合蛋的取出 13-71%, 存活率 13-54%,

无菌性 89-100%，手术操作的容易程度为良好；

定时与触诊组合，软的壳，不适合蛋的取出 10-23%，存活率 14-57%，无菌性 92-100%，手术操作的容易程度为良好；

这些结果提示，触诊、或触诊与定时的组合可能具有优于单独定时的优点，特别是在将蛋从腹腔取出时的操作容易程度方面。另外的分析数据显示，定时加上触诊倾向于牵涉将蛋取出的时间最短，而单独的定时所牵涉的时间最长，有可能反映出在定时加触诊组中软壳较少。软壳较少会有利于在蛋取出过程中的更容易和更迅速的操作。

实施例 2C

抗生素(例如口服给药的氟喹诺酮类)对消除跨卵巢的细菌和支原体感染的影响和对胚胎和随后鸡雏的存活率和无菌性的影响

结果

不用抗生素，存活率 22-60%，无菌性 66-92%；

用抗生素，存活率 13-57%，无菌性 89-100%。

这些结果确定了使用抗生素除去跨卵巢感染(例如沙门氏菌)的益处并且对于无菌获得的蛋的存活率没有不利影响。

实施例 2D

在无痛处死和取出蛋之间的时间(0 到 180 分钟)对存活率和操作容易程度、孵化率和无菌性的影响

结果

无菌性 100%，在 30 分钟之后操作越来越困难，

在无痛处死之后 60、40 和 20 分钟取出的蛋的孵化率为 20、40 和 80%(每个时间点 n = 10)。

这些结果确定了通过在约 30 分钟内完成手术，使得在无菌手术隔离器中从禽类腹腔无菌取出蛋变得方便。

实施例 3

对得自实施例 2A 到 2D 的研究结果的回顾提示，很可能如下得到衍生蛋的最大的孵化率和微生物无菌性：使用无痛处死的禽类(麻醉的禽类更难操作)，其中在无痛处死之后尽快地将蛋取出(在 15-30 分钟内)，和其中基于定时产蛋和手工触诊的结合以确定蛋壳坚固和充分形成(蛋的成熟充分，没有软壳)。基于用于确定对于未成熟的衍生的蛋的最佳孵育条件的其它数据，在孵育的前 18 天选择低的相对湿度(约

25%)。以下描述的这种方法是验证研究，其中将实施例 2 中确定的所有变量以最优化方式组合在一起，用以评价这些变量之间的相互作用。

方法和材料:

将已知无特定病原体 (SPF) 状态的总共 180 只成年雌性育种鸡分为 7 个连续组(具有不同的年龄和基因型)，保持供给经过选择的饮食并且允许自然地繁殖。使用定时和触诊的结合来确定从禽类腹腔取出蛋的最佳时机。

对于该过程，通过颈部脱节将禽类无痛处死并且立即准备将蛋取出。从腹侧的胸部和腹部除去羽毛并且用 50%的碘的酒精溶液将皮肤消毒。然后将每只禽类置于专门改造的手术隔离器下，所述隔离器用 5%过氧乙酸溶液消毒并且包含无菌装置。将禽类用无菌的粘性布帘盖上，然后使隔离器的无菌进口端口置于布帘上方。进行剖腹手术切口并且在小心地切开之后，从子宫 / 生殖道的远端方面和泄殖腔的近端将蛋取出。然后在无菌条件下将蛋转移到被改造为孵卵箱的隔离器中。总共 153 个具有良好蛋壳的蛋在无痛处死之后的 13-22 分钟被成功地回收，并且认为适合于孵育。

在 18-20℃ 在无振动、通风的塑料蛋托中储存约 6-24 小时之后，将蛋称重，然后将蛋置于小型振动孵育器中。孵育器保持在约 25% RH 和 37.6℃。蛋保持在最高的通风单元中并且在孵育的第 0、7 和 18 天分别称重。在第 18 天，对所有的孵育器进行调节以提供约 65% 的 RH。记录破壳的蛋数和产生有活力的活鸡雏的蛋数。

在孵出的七天内，将活鸡雏从孵化隔离器取出并且转移到适合于培育幼鸡的更大规模的培育隔离器中。用经过辐射灭菌的增补的商业饮食饲养小鸡。在小鸡达到 14-21 天时，从每个饲养隔离器取得粪便样品和药签并且取样用于进行需氧菌和厌氧菌富集培养的细菌学分析。

结果:

成功地从人工获得的成熟前蛋孵出活鸡雏。没有从样品分离得到厌氧菌或需氧菌。(在无痛处死之前 9 天内由亲代禽类自然地产出的蛋具有 86% 的活鸡雏孵化率。这证明了由雌鸡生产的蛋的正常水平或较高水平的自然受精率)。

7 组无菌蛋的孵化率范围为 60%(15 个蛋中 9 个孵化)到 77%(22 个蛋中 17 个孵化)，平均 74%。

结论:

建立一种安全和高效的用于在鸡中人工生产无菌受精蛋方法。蛋是受精的并且产生在隔离器中被成功保持的无菌的活小鸡。这项研究在 7 个连续小鸡群中使用大量的蛋证明,与以前描述的用于生产无菌受精蛋的方法相比,可以通过如下获得衍生蛋的孵化率的较小变化性和 100%稳定的无菌的微生物学状态:选择具有充分成熟的蛋的禽类(接近自然产蛋的时间;基于产蛋的时间和触诊的组合选择),将蛋从亲代母禽迅速地取出(从无痛处死或麻醉开始的 15-30 分钟)然后在约 25%的 RH 孵化(比自然产出的蛋低得多)。

使用本申请中公开的技术,能够实现更加稳定的高的孵化率,也就是说一贯地大于 60%的孵化率。这种稳定性在以前是不可能的。