



"Processo de preparação de uma vacina para protecção de aves contra infecções por Mycoplasma e de preparação de uma cultura pura, do mesmo"

para que

AKZO N.V., pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de preparação de uma vacina para o combate da infecção provocada pelo Mycoplasma em aves de capoeira, caracterizado por compreender:

- a) cultivar, durante um período de tempo adequado, células da estirpe Mycoplasma gallisepticum, possuindo as propriedades imunológicas da estirpe Intervet 6/85 num meio adequado, e
- b) recolher as células.

A vacina não é virulenta para as galinhas e não é patogénica para os perús.

O invento refere-se ainda ao processo de preparação de uma cultura microbiologicamente pura de Mycoplasma gallisepticum.

-2-

MEMÓRIA DESCRITIVA

O presente invento refere-se a um processo de preparação de uma vacina contra o micoplasma e a um processo para a protecção das aves de capoeira contra as infecções provocadas pelo Mycoplasma, pela administração dessa mesma vacina.

O Mycoplasma e mais particularmente M. gallisepticum, é uma bactéria que é infecciosa, em particular para as aves de capoeira. A infecção de aves comercialmente importantes com esta bactéria causa prejuízos económicos apreciáveis.

O síndrome que o M. gallisepticum provoca é usualmente denominado, no caso das galinhas "doença respiratória crónica" e no caso dos perús "sinusite infecciosa". A infecção por M. gallisepticum é também frequentemente acompanhada pela infecção devida a vírus respiratórios e devida a Escherichia coli.

As infecções por M. gallisepticum podem ser combatidas com certos antibióticos como eritromicina, estreptomina, clorotetraciclina, tilosina e magnamicina, os quais são geralmente misturados com a comida, mas as bactérias têm vindo a desenvolver resistências cada vez maiores a essas substâncias e consequentemente o seu combate esta-se a tornar cada vez mais difícil.

Desenvolveram-se vacinas para a protecção imunológica das aves de capoeira contra as infecções por M. gallisepticum.

Foram utilizadas bacterinas inactivadas de M. gallisepticum com resultados variáveis. Apesar de originarem uma boa resposta serológica, especialmente quando administradas em combinação com um adjuvante do tipo emulsão oleosa, estas vacinas parecem não proteger contra as infecções.

Num número limitado de estados dos EUA, especialmente nas denominadas "multiple-age egg-laying farms" (quintas de produção de ovos por galinhas poedeiras de diversas idades), a vacinação foi efectuada com M. gallisepticum vivo enfraquecido, da estirpe F. Esta estirpe é administrada pelo método de aspersão (spray) e proporciona uma protecção razoável contra as inflamações dos sacos aéreos e reduz a quebra na produção de ovos para um nível aceitável.

-3-

As desvantagens das vacinas inactivadas conhecidas são inu
meráveis. Cada animal tem que ser injectado individualmente. A
vacina é muito dispendiosa. Os animais não ficam protegidos con-
tra a infecção, isto é, após a infecção podem permanecer portado-
res do Mycoplasma (virulento).

Mesmo as vacinas vivas existentes não estão isentas de pro-
blemas. Apesar de a estirpe F ser apenas ligeiramente virulenta
para as galinhas, é extremamente patogénica para os perús. Adi-
cionalmente, após a vacinação, as galinhas permanecem portadoras
da estirpe da vacina a qual pode portanto continuar também a alas
trar-se durante um período prolongado.

Foi agora encontrada uma vacina contra o M. gallisepticum
que não apresenta as desvantagens acima referidas.

A vacina contra o Mycoplasma de acordo com o presente in-
vento caracteriza-se por ser derivada duma estirpe de M. galli-
septicum que possui as propriedades da estirpe Intervet 6/85.

A estirpe Intervet 6/85 é uma estirpe nova de M. galli-
septicum - um mutante que foi obtido por uma série de passagens
"in vitro" da estirpe S6 conhecida (ATCC Nº. 15302).

Esta nova estirpe, que foi depositada no Collection Natio-
nale de Cultures de Microorganismes do Instituto Pasteur de Paris
em 7 de Julho de 1987 sob o número I-673, faz também parte do pre
sent invento. As estirpes que possuem as mesmas propriedades
imunológicas características da referida estirpe Intervet 6/85
constituem também parte do invento. Mais particularmente, as es-
tirpes que, mantendo as propriedades imunológicas particularmen-
te favoráveis, são derivadas da estirpe Intervet 6/85 fazem tam-
bém parte do invento.

A estirpe Intervet 6/85 apresenta diversas vantagens impor-
tantes sobre as estirpes conhecidas de M. gallisepticum que a tor
nam extremamente adequada para aplicação em vacinas e que também
a distinguem das estirpes de M. gallisepticum conhecidas:

- a. não é virulenta para as galinhas: não provoca quaisquer sin-
tomias clínicas; não ocorrem virtualmente inflamações dos sa-
cos aéreos;
- b. não é virulenta para os perús;

-4-

- c. 4 semanas após a administração é ainda encontrada apenas um número desprezável de animais, enquanto a estirpe F continua a ser segregada durante um longo período de tempo por quase 100% dos animais;
- d. um modelo de endonuclease de restrição como apresentado na Figura 1.

A vacina de acordo com o invento é preferivelmente administrada às aves de capoeira na forma de uma vacina viva, se bem que, no entanto, possa ser administrada na forma de vacina inactivada.

A vacina contra o Mycoplasma pode ser administrada da maneira usual para as vacinas semelhantes, mas a presente vacina presta-se, em particular, para a administração na forma de aerossol. Os aerossóis muito finamente divididos da vacina podem ser preparados, por exemplo, por meio de um equipamento de produção de aerossóis Vineland.

A vacina contra o Mycoplasma de acordo com o invento pode ser comercializada, por exemplo, na forma liofilizada. A partir desta forma, pode preparar-se uma suspensão por adição de um líquido aquoso, por exemplo água da torneira. A vacina pode, claro, ser comercializada na forma de suspensão. Se desejado, em adição ao material Mycoplasma, podem encontrar-se presentes na vacina um ou mais estabilizantes (como leite desnatado ou hidrolisado de caseína) e/ou um ou mais antibióticos (tal como ampicilina ou polimixina).

A presente vacina é adequada para combater as infecções por Mycoplasma em aves de capoeira. Em particular é adequada para combater as infecções por Mycoplasma em galinhas e perús. A vacina deverá ser administrada no período da criação, preferivelmente a uma idade de 8-15 semanas como protecção contra uma queda na produção durante o período da postura. A vacinação deverá ser efectuada preferivelmente no período da criação porque:

- a. uma leve reacção de inoculação que possa resultar da vacinação não tem efeito sobre a produção de ovos neste estágio;
- b. a protecção deve ser adequada no instante em que os animais iniciam a postura;

-5-

c. os animais deverão ser protegidos quando são transferidos da quinta de criação para a quinta de postura onde a infecção tem usualmente lugar.

Uma das características favoráveis da vacina de acordo com o invento é a sua muito baixa virulência para as galinhas.

Isto foi demonstrado em linhagens Leghorn branca, em que se compararam os efeitos da estirpe Intervert 6/85, da estirpe R e da estirpe F. A estirpe R é encarada como uma estirpe de M. gallisepticum muito virulenta. A estirpe F é utilizada nos EUA como uma estirpe de vacina. Ambas as estirpes foram postas à disposição por S. Kleven da Universidade da Georgia. As estirpes R e F foram cultivadas no meio descrito por Frey e col. (M.C. Frey, R.P. Hanson e D.P. Anderson (1968) Amer. J. Vet. Res. 29, 2164-71), em quanto que a estirpe Intervert 6/85 foi cultivada num meio Adler modificado (H.E. Adler, R. Yamamoto e S. Bankowski, (1954) Amer. J. Vet. Res. 15, 463-5). As modificações do meio Adler consistiram na substituição do caldo Bacto PPLO por peptona protease e de soro de cavalo por soro de porco.

As galinhas utilizadas nestas experiências comparativas tinham sido previamente avaliadas como seronegativas, tanto em relação a M. gallisepticum como a M. synoviae.

Aproximadamente uma semana antes das experiências colocaram-se 10 galinhas numa câmara de isolamento de pressão reduzida. Administrou-se micoplasma a estas galinhas pelo método de aerosol. Atomizaram-se 100 ml da cultura de Mycoplasma respectiva durante 10 minutos na câmara de isolamento, cuja exaustão de ar tinha sido cortada. A suspensão de Intervert 6/85 administrada continha 10^{10} organismos viáveis por ml, enquanto que as suspensões das estirpes F e R continham apenas 10^8 organismos viáveis por ml.

Efectuou-se um exame "post-mortem" 10 e 24 dias após a administração de Mycoplasma - em ambos os casos com 5 galinhas. As galinhas foram examinadas em relação aos danos provocados nos sacos aéreos, à degeneração dos ovários e ao número de animais dos quais pode ser isolado o M. gallisepticum. Os resultados foram reproduzidos como descrito no Exemplo 2 sob a, b e c respectivamente.

Os resultados encontram-se reproduzidos nas Tabelas abaixo:

Infeção de galinhas de 27 semanas de idade

Tipo administrado	Dias após a administração	Danos nos sacos aéreos	Degeneração dos ovários	Re-isolamento (%)
Estirpe R	10	3,0	3,0	100
Intervet 6/85	10	0,6	0,2	40
-		0,0	0,0	0
Estirpe R	24	1,0	0,6	100
Intervet 6/85	24	0,0	0,2	40
-		0,0	0,0	0

Infeção de galinhas de 32 semanas de idade

Tipo administrado	Dias após a administração	Danos nos sacos aéreos	Degeneração dos ovários	Re-isolamento (%)
Estirpe R	10	3,2*	2,5	100
Intervet 6/85	10	0,3	0,8	17
-		0,0	0,0	0

* média de 6 galinhas



Infeccção de galinhas de 35 semanas de idade

Tipo administrado	Dias após a administração	Danos nos sacos aéreos	Degeneração dos ovários	Re-isolamento (%)
Estirpe R	10	2,8	2,6	100
Intervet 6/85	10	0,2	1,4	20
Estirpe F	10	2,0	1,6	100
-		0,0	0,1	0
Estirpe R	24	0,6	0,8	100
Intervet 6/85	24	0,0	0,0	0
Estirpe F	24	0,6	0,4	80
		0,0	0,0	0

Infeccção de galinhas de 39 semanas de idade

Tipo administrado	Dias após a administração	Danos nos sacos aéreos	Degeneração dos ovários	Re-isolamento (%)
Estirpe R	10	2,2	2,4	100
Intervet 6/85	10	0,0	0,8	0
Estirpe F	10	2,0	1,4	20
-	(40 semanas de idade)	0,0	0,4	0

Dos resultados acima torna-se evidente que a estirpe Intervet 6/85 provoca danos apreciavelmente menores nos sacos aéreos e nos ovários, que qualquer uma das estirpes R e F.

Adicionalmente, torna-se também evidente que a estirpe Intervet 6/85 já não se encontra presente, de forma detectável, nas galinhas infectadas após aproximadamente 4 semanas, enquanto que as estirpes R e F podem de facto ser ainda detectáveis nessa altura.

Efectuaram-se experiências semelhantes com perús brancos de

4 semanas de idade. Os resultados encontram-se reproduzidos na tabela abaixo.

Tipo administrado	Dias após a administração	Danos nos sacos aéreos	Re-isolamento (%)
Estirpe R	10	3,2	100
Intervet 6/85	10	0,2	100
Estirpe F	10	2,6	100
-	(5 1/2 semanas de idade)	0,4	0
Estirpe R	28	3,75	100
Intervet 6/85	28	0,5	0
Estirpe F	28	2,6	100
-	(8 semanas de idade)	0,2	0

É sabido que os perús são particularmente susceptíveis ao M. gallisepticum, mesmo a estirpes relativamente pouco virulentas como a estirpe F, a qual é utilizada como estirpe de vacina no caso das galinhas.

Os resultados acima demonstram, no entanto, que a nova estirpe Intervet 6/85 é também muito pouco virulenta para os perús e não produz virtualmente nenhum prejuízo.

A estirpe Intervet 6/85 foi também investigada em relação à reversão à virulência. Para este fim, a estirpe foi passada 5 vezes através de galinhas, administrando-se de cada vez às novas galinhas o Mycoplasma re-isolado por meio de raspagem da traqueia. Os resultados encontram-se reproduzidos na tabela abaixo. Não se verificou aumento na virulência após as cinco passagens.

Tipo administrado	Passagem Nº.	Dias após a administração	Idade (semanas)	Danos nos sacos aéreos	Degeneração dos ovários	Re-isolamento (%)
Intervet 6/85	2	10	29	0,75	1,2	66
-			29	0,25	0,0	0
Intervet 6/85	3	10	35	0,0	1,0	20
Intervet 6/85	0	10	35	0,2	1,4	20
Estirpe R	0	10	35	2,8	2,6	100
-			35	0,0	0,1	0
Intervet 6/85	4	10	39	0,4	1,4	20
Intervet 6/85	0	10	39	0,0	0,8	0
Estirpe R	0	10	39	2,2	2,4	100
-			39	0,0	0,4	0
Intervet 6/85	5	10	41	0,4	1,4	20
Estirpe R	0	10	41	2,2	2,2	100
-			41	0,0	0,4	0

Exemplo 1

Preparação de uma vacina viva

Reconstituiu-se uma quantidade de aproximadamente 1 ml do germe da estirpe Intervet 6/85 de Mycoplasma gallisepticum em 10 ml de meio Adler modificado e realizou-se a incubação a 37°C.

Quando já tinha ocorrido crescimento suficiente, o que foi estabelecido com base na mudança de cor de um indicador que tinha sido adicionado (vermelho de fenol), a suspensão foi inoculada num meio Adler recentemente modificado, numa proporção volumétrica de 1:20 e novamente incubada da forma descrita acima.

Este procedimento é repetido até se obter um inóculo com tamanho suficiente para inocular o fermentador a ser utilizado (são necessários cerca de 5 l de inóculo para um fermentador de 100 l).

Depois da inoculação do fermentador, a incubação é levada

a cabo durante 24-30 horas a um pH de 7,5, a uma temperatura de 37°C com uma velocidade de agitação e arejamento constantes.

Em seguida as células são recolhidas por centrifugação e tomadas em leite desnatado (10%) ao qual se adicionou previamente ampicilina.

Depois de se guardar em frascos de vidro apropriados, a vacina é liofilizada e os frascos são então selados.

Exemplo 2

Experiência de vacinação com galinhas

Vacinaram-se dois grupos de 10 galinhas pelo método de aerossol com, respectivamente, a estirpe F e a estirpe Intervet 6/85 e colocaram-se em câmaras isoladas de pressão reduzida.

Duas semanas mais tarde, os dois grupos, e também um grupo de controlo não vacinado, foram infectados com a estirpe virulenta R e mortos 10 dias depois. Os danos nos sacos aéreos, a degeneração dos ovários e a quantidade relativa de M. gallisepticum presentes nos animais mortos foram determinados da maneira descrita abaixo:

a) as graduações dos danos nos sacos aéreos foram classificadas como se segue:

0 = sacos aéreos limpos sem danos linfoliculares;

1 = ligeira turbidez num ou em dois sacos aéreos ou danos linfoliculares num ou em dois sacos aéreos;

2 = como 1, mas neste caso em ambos os sacos aéreos ou turbidez intensa num ou em dois sacos aéreos ou secreção semelhante a queijo num ou dois sacos aéreos ou aparência espessa e esponjosa de um ou dois sacos aéreos;

3 = ambos os sacos aéreos intensamente turvos ou secreção semelhante a queijo ou com aparência espessa e esponjosa;

4 = uma combinação dos sintomas de 3.

b) O grau de degeneração dos ovários foi classificado como se segue:

0 = ovários activos sem degeneração;

- 1 = degeneração de alguns folículos do ovário;
- 2 = degeneração de todos os folículos do ovário apresentando alguns hemorragias;
- 3 = degeneração de todos os folículos com hemorragias.

c) Efectuou-se uma determinação do número de galinhas nas quais o Mycoplasma gallisepticum podia ser re-isolado. O resultado foi expresso numa percentagem do número total de galinhas nos grupos respectivos.

Os resultados das experiências descritas acima, após a vacinação de galinhas de várias idades, são descritos abaixo.

I. Vacinação de galinhas de 27 semanas de idade

Grupo	Danos nos sacos aéreos	Degeneração dos ovários	Re-isolamento* (%)
Vacinação com Intervet 6/85 mais infecção com estirpe R	1,0	0,5	80
Ausência de vacinação mas infecção com estirpe R	3,0	2,8	100
Vacinação com Intervet 6/85 sem infecção com estirpe R	0,0	0,2	40
Ausência de vacinação e de infecção com estirpe R	0,0	0,0	0

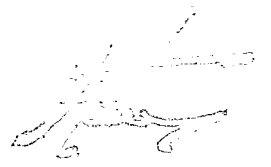
* Não se faz distinção entre as estirpes R e Intervet 6/85.



II. Vacinação de galinhas de 35 semanas de idade

Grupo	Danos nos sacos aéreos	Degeneração dos ovários	Re-isolamento * (%)
Vacinação com Intervet 6/85 mais infecção com estirpe R	1,2	2,0	100
Vacinação com estirpe F e infecção com estirpe R	1,0	1,0	100
Ausência de vacinação mas infecção com estirpe R	2,4	2,6	100
Vacinação com Intervet 6/85 sem infecção	0,0	0,0	0
Vacinação com estirpe F sem infecção	0,6	0,4	80
Ausência de vacinação e de infecção	0,0	0,0	0

* Não é feita distinção entre as estirpes R, F e Intervet 6/85.



III. Vacinação de galinhas de 39 semanas de idade

Grupo	Danos nos sacos aéreos	Degeneração dos ovários	Re-isolamento * (%)
Vacinação com Intervet 6/85 mais infecção com estirpe R	0,0	1,0	100
Vacinação com estirpe F e infecção com estirpe R	1,4	1,4	80
Ausência de vacinação e infecção com estirpe R	2,2	2,2	100
Ausência de vacinação e de infecção	0,0	0,4	0

* Não se faz distinção entre as estirpes R, F e Intervet 6/85.

Destas experiências pode concluir-se que a estirpe Intervet 6/85 proporciona uma protecção contra danos nos sacos aéreos e contra a degeneração dos ovários como consequência de uma infecção grave, protecção essa que é comparável com a obtida com a estirpe F.

-14-

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1 - Processo de preparação de uma vacina para o combate da infecção provocada pelo micoplasma em aves de capoeira, caracterizado por compreender:

a) cultivar, durante um período de tempo adequado, células da estirpe Mycoplasma gallisepticum, possuindo as propriedades imunológicas da estirpe Intervet 6/85 num meio adequado, e

b) recolher as células.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se adicionar, subsequentemente um ou mais estabilizantes, tais como leite evaporado ou hidrolisado de caseína.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por também se adicionar um ou mais antibióticos.

4 - Processo de acordo com as reivindicações 1-3, caracterizado por o material resultante ser liofilizado.

5 - Processo de acordo com as reivindicações 1-4, caracterizado por o Mycoplasma gallisepticum vivo cultivado possuir as propriedades imunológicas da estirpe Intervet 6/85.

6 - Processo de acordo com as reivindicações 1-5, caracterizado por se cultivar a estirpe Intervet 6/85.

7 - Estirpe de Mycoplasma gallisepticum, caracterizado por possuir as propriedades imunológicas da estirpe Intervet 6/85.

8 - Estirpe Intervet 6/85 de Mycoplasma gallisepticum.

9 - Processo de preparação de uma cultura microbiologicamente pura de Mycoplasma gallisepticum, caracterizado por se cultivar uma estirpe de Mycoplasma gallisepticum a qual tem as propriedades imunológicas da estirpe Intervet 6/85.

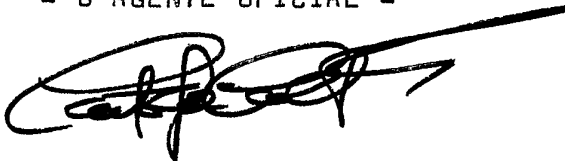
10 - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por a estirpe cultivada ser a estirpe Intervet 6/85.

68 068
OA/1352-428

-15-

Lisboa, 16. SET. 1997

Por AKZO N.V.
- O AGENTE OFICIAL -

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

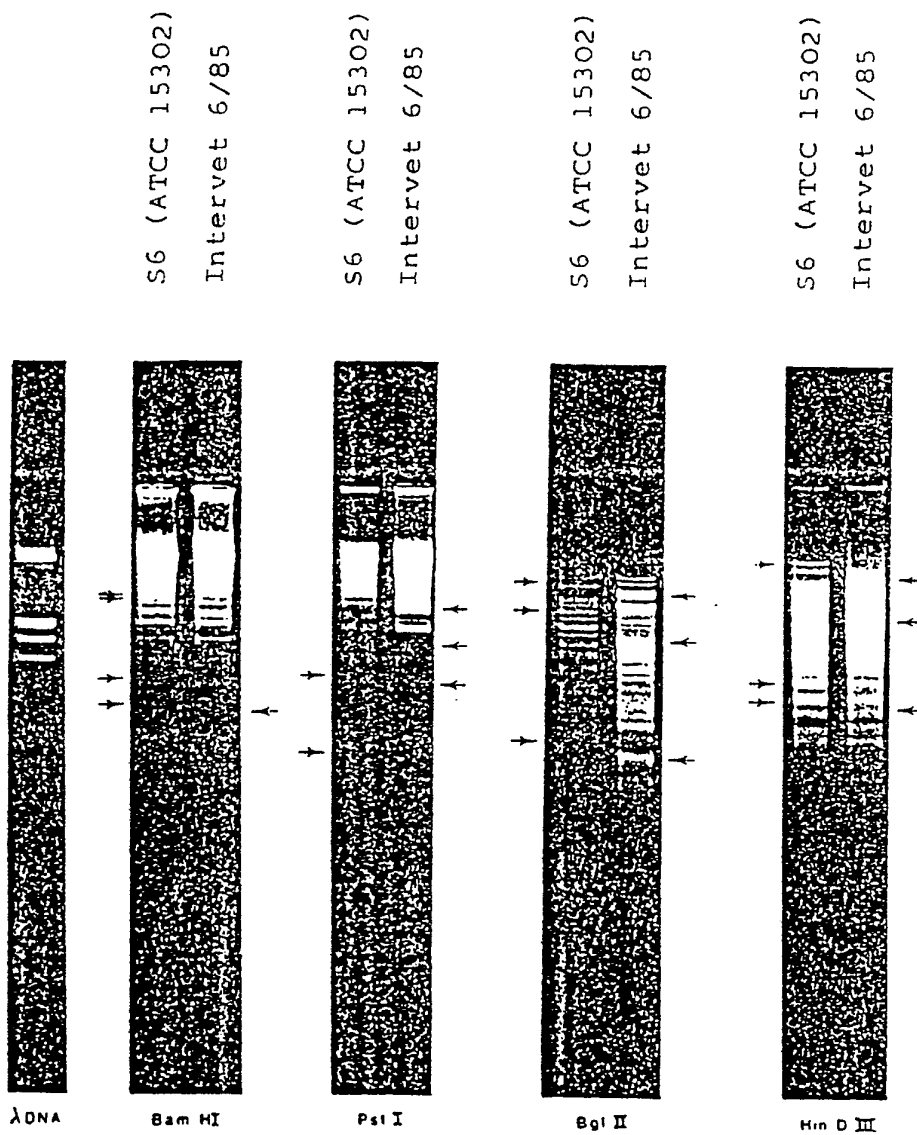


FIGURA 1