



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

199 865

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 10 01 77
(21) PV 143-77

(51) Int. Cl.³ C 12 N 7/00

(40) Zveřejněno 30 11. 79
(45) Vydáno 30 08 82

(75)

Autor vynálezu

KORYCH BOHUSLAV doc.MUDr.CSc., PRAHA

(54) Kombinovaná vakcína proti Aujeszkyho chorobě a G-střevním pathogenním mikrobům
a způsob jeho výroby

1

Předmětem vynálezu je kombinovaná adjuvantní inaktivovaná vakcína proti Aujeszkyho chorobě (AD) a G-střevním pathogenním mikrobům, která navozuje rezistenci imunizovaných zvířat, nebo jejich potomstva pasivně předanou protilátkou a způsob výroby této vakcíny.

Virus Aujeszkyho choroby (AV) vyvolává u postižených vnímavých zvířat onemocnění centrálního nervového systému a dýchacího traktu se smrtelnými důsledky, především u mladých jedinců. Výskyt tohoto onemocnění, hlavně ve velkochovech zvířat, zejména u selat a norků. Z G-mikroorganismů vyvolávajících onemocnění zažívacího traktu je u prasat nejčastější příčinou onemocnění skupina enteropathogenních E coli, které kromě infekce zažívacího traktu mohou vést i k celkovému septickému stavu, často končícímu úhynem.

Některé serotypy mikrobů rodu Escherichia jsou spojeny s infekčním onemocněním častěji, což je podmíněno výraznými faktory virulence, jako např. tvorbou enterotoxinu. Povrchová struktura - stěna - těchto bakterií představuje jednak biologicky aktivní složku mikroba, umožňující přilnutí ke sliznici střeva, jednak je výrazným antigenem. Z řady vlastností biologických je významná schopnost lipopolysacharidového komplexu, tzv. endotoxinu nespecificky potencovat antigenní podnět. Mnohočetnost a variabilita biologických vlastností včetně virulace a antigenní struktura předpokládají pro úspěšnou prevenci chorob vyvolávaných mikroby rodu Escherichia předpokládá užití kombinovaných antigenů. Separátní imunizace jednotlivými antigenními typy je v terénu nerealizovatelná.

Rezistence proti infekcím, kromě faktorů podmiňujících přirozenou rezistenci, je dána přítomností protilátek neutralizujících schopnost vyvolat infekční proces a imunitou zprostředkovanou buňkami. Jednotlivé faktory rezistence proti danému infekčnímu činiteli se uplatňují u různých živočišných druhů v různém rozsahu v závislosti na genetických vlastnostech hostitele odrážejících se ve složení buněčných povrchů a způsobů metabolismu, přítomností nespecifických inhibitorů a jejich nespecificky působících mechanismů a pathogeneze příslušného infekčního onemocnění.

V aktivní imunizaci proti infekcím je zásadní podmínkou aplikace určité minimální antigenní masy vhodnou cestou, která by vyvolala dostačující protilátkovou odpověď, přičemž mikrobiální antigen musí mít zachovanu složku podmiňující indukci syntézy protilátek, schopných neutralizovat rozvoj infekčního onemocnění. U virových infekcí se předpokládá, že podmínkou pro vyvolání infekce je přilnutí viru na buňku v místě odpovídajícího receptoru "HOLLAND J.J. Enterovirus enhance into specific host cells, and subsequent alterations of cell protein and nucleic acid synthesis, *bact. Rev.* 1964, 28 : 3 ", tedy protilátka neutralizující virus musí blokovat determinanty povrchu virové části odpovídající těmto receptorům. V ojedinělých případech lze účinně zasáhnout do rozvoje infekčního procesu neutralizací složek uplatňujících se i v jiném stupni replikačního cyklu viru, jako např. imunizací proti neuraminidáze myxovirů.

V aktivní imunizaci je možno využít tzv. adjuvantního účinku některých látek, které jednak umožní produkci protilátek do vyšších titrů, jednak stimulují tzv. buňkami zprostředkovanou imunitu.

Z přehledu světové literatury o možnosti použití inaktivované vakciny k prevenci a tlumení AD je možno se pokusit o některá zobecnění:

- 1) předpokladem účinnosti virového antigenu je šetrná inaktivační procedura, ponechávající povrchové struktury virionu bez poškození " BORGES H.C., ESPENSEN L. : Immunizing effect of photoinactivated pseudorabies virus *Zbl. Bakt. Parasit* kde I.Orig. 1970, 214 : 13 až 16 ".
- 2) Vakcína musí představovat dostatečný antigenní impuls, který je dán koncentrací viru Borgen H.C., Espensen L. 1970, " ŠKODA R., WITTMANN G. : Die Immunisierung vom Schweinen mit Vakzinen aus inaktivierten Aujeszky-Virus *Zbl.Vet. med.* 1973, Heft 2 : 127 až 138".
- 3) O výsledku imunizace rozhoduje i zvolené imunizační schéma " ŠKODA R., JAKUBÍK J. : Immunisierung von Schweinen mit Aujeszky-virus-Vakzinen, hergestellt aus zwei Plaguenvarianten des Virus *Zbl.Vet. med.* 1974, B 21, 234 až 241 ".

Inaktivovaná vakcína vypracovaná s ohledem na uvedené předpoklady se ve své účinnosti může vyrovnat, měřeno titem neutralizačních protilátek, vakcínám attenuovaným " BORGES H.C., ESPENSEN L. : Immunizing effect of photoinactivated pseudorabies virus *Zbl. Bakt.Parasit* kde I. Orig.1970, 214 : 13 až 16 ", bez rizika pro novorozená selata a vysokobřeží prasnice " BOYADZHIEV S., GENEV Kh., GENOV I., VACHEN B., STOYANOV V., KALCHEV I. : Studies on Aujeszky's disease. I. Comparison of vaccines. *Vet.med.Nauki* (Sofia) 1967, 4/9 : 19 až 26, MASIĆ M., PETROVIĆ M. : Kann durch Kristalvioleto-vakzine gegen Schweinepest die Aujeszky'sche Krankheit übertragen werden ? *Zbl.Bakt. Parasitkde.* 1962, I.Orig.

185 :145 až 154 " a bez omezení její aplikace na ohniska infekce.

V žádném případě není možno souhlasit již s tvrzením MANNINGER R., MOCSY J. : *Traité des maladies internes des animaux domestiques* Paris: Vigot Frères 1959, pp. 457 až 464 ", že aktivní imunizace proti AD není možná. Nelze souhlasit ani s názorem KRETZSCHMARK C. : *Untersuchungen zur Epizootologie der Ausjeszkyschen Krankheit beim Schwein und daraus sich ergebende Schlüsfolgerungen für Prophylaxie und Bekämpfung*. Mh.Vet.Med.:1964, 17 : 248 až 257 " a " ŽUFFA A. : *Versuch zur Immunisierung von Laboratoriumstieren und Schweinen mittels Formaldehyd- und-UV Strahlen - inaktivierten Ausjeszyk-Virus* Arch.exp.Vet.med. 1963, 17 :595 až 613 ", že infikovaná vakcína proti AD je neúčinná.

V posledních letech vypracovaná tkáňová inaktivovaná adjuvantní vakcína proti Aujeszkyho chorobě výrazným způsobem řešila problematiku likvidace a prevence Aujeszkyho choroby, zvláště ve velkochovech. Přes svou účinnost zvyšovala počet již tak četných vakcinačních zákroků. Jako monovatelní vakcína neměla výhody dané případnou potencí antigenního impulsu, který se uplatní u kombinovaných vakcín.

Uvedené nevýhody odstraňuje kombinovaná vakcína proti Aujeszkyho chorobě a G-střevním pathogenním mikrobům a způsob její výroby podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že v jednom ml obsahuje $10^{8,5}$ až $10^{9,5}$ TCID₅₀ inaktivované mutanty viru Aujeszkyho choroby, CNCTC AO 5/78, a 10^5 až 10^8 inaktivovaných bakteriálních G-jedinců například enteropathogenních *Escherichia coli* anebo salmonel, v lipoidnom adjuvans.

Způsob výroby kombinované vakcíny kde virus Aujeszkyho choroby CNCTC AO 5/78, se kultivuje na tkáňových kulturách, nejvýhodněji na buňkách stabilní linie vepřové ledviny (PK v bezserovém udržovacím médiu, při teplotě 36 až 37 °C po dobu 18 až 48 hodin, v závislosti na úplném rozpadu infikovaných buněk a potom se oddělené buněčné drti inaktivují beta propiolaktonem, homogenizuje se při teplotě do 42 °C s lipoidním adjuvans a s 10^5 až 10^8 inaktivovanými G-jedinci, především enteropathogeními *Escherichia coli* nebo salmonel. Ve vakcině užitý adjuvans je tvořeno vstřebatelnou lipoidní směsí, která se smíchá s virovou suspenzí nejvýhodněji při teplotě 30 až 37 °C s přidáním bakteriální suspenze G-mikrobů, jejichž antigení potence byla zvýrazněna opakovaným rozrušením jejich těl opakovaným zmrazením a rozmrazením.

Jednou z výhod kombinované vakcíny je použití mutanty AV podle vynálezu. Tato mutanta viru Aujeszkyho choroby byla získána trojnásobnou klonizací laboratorního kmene AV1 z SVÚ Praha - Lysolaje, selekcí plaků morfologicky distinktních po proběhnutí dvou replikačních cyklů na buňkách linie PK kultivovaných pod agarovou pokrývkou za teploty 36 °C. Získaný klonus je charakterizován :

- a) zachovanou antigenní strukturou
 - b) zachovanou virulencí pro prase, králíka, morče a myš
 - c) schopnost rychlé tvorby nekrotických ložisek v buňkách PK (plaky do 24 hod.)
 - d) schopnost dosáhnout v infekčním médiu vysoké koncentrace (titry TCID₅₀ $10^9 \log. 10$ a vyšší na ml média). Účinný antigenní podnět je zajištěn velice šetrnou inaktivační procedurou představovanou použitím propiolaktonu v konečných koncentracích 0,05 až 0,25 %.
- Imunizační účinek je podstatně zvýšen přidáním vstřebatelného lipoidního adjuvans, které

kromě potenciace účinku vakciny má výhodu v tom, že nevyžaduje nucený výsek partií jatečných zvířat, kde byla vakcína aplikována a která svou konzistencí odpovídá požadavku technických možností pro masovou aplikaci a přítomnost Lipopolisacharinového komplexu ve vakcině přítomných bakteriálních členů. Kromě stimulace humorálních protilátek adjuvans a Lipopolisacharidový komplex kladně ovlivňuje i buňkám zprostředkovanou imunitu. Výsledek imunizace je ovlivněn vhodně zvolenou pozologií, dávkováním a revakcinací. Otevřené imunizační schéma prokázalo výhody vnitrosvalového podání očkovací látky proti podání striktně podkožnímu a do podkožního tuku, především při alamenstické odpovědi. Vakcinace kombinovanou vakcinou AV a vybranými kmeny E.coli vede k potenciaci antigenního impulsu AV a současně tvorbě protilátek proti bakteriálním kmenům, které se s výhodou uplatní v kolostrální imunitě.

Pro hladinu protilátek je vhodná revakcinace v období tří až pěti týdnů po primovakcinaci. Revakcinace oplodněných samic, např. 7 až 14 dní před porodem, vede k ochraně selat kolostrem po dobu prvních týdnů po porodu, tedy v době největší vnímavosti zvířete na AV a enteropatogenní coli. Zásadní výhodou aplikace kombinované vakciny podle vynálezu proti vakcinám s živým AV je možnost jejich použití v prevenci AD, především v oblastech s jejich výskytem, bez rizika vnesení živého viru do stáda. Aplikace inaktivované vakciny vede k zastavení projevu infekce 3 až 5 dnů po imunizačního zákroku. Tento rychlý účinek je vysvětlitelný "boosterovacím efektem" vakciny v promořeném chovu. Jedinci nereagující na aplikaci vakciny jsou výjimkou. Vakcína nevyvolává místní ani celkovou reakci a lze je bez rizika použít i u vysokobřezích zvířat. Uvedené výhody se vztahují i na bakteriální kmeny zahrnuté v kombinované vakcině. Protilátky proti těmto kmenům chrání novorozence v rizikovém období před enteropathogenními mikroby odpovídajících serotypů. Účinnost vakciny je zaručena po dobu alespoň 6. měsíců při skladování při teplotě 3 až 7 °C.

Vakcína co do účinnosti byla ověřena na prasatech, morčatech, králících a výsledky, které ukazují na obecnou schopnost této vakciny indukovat tvorbu protilátek. Výroba vakciny předpokládá použití běžných ingrediencí a samotný výrobní postup se obejde bez náročnějšího přístrojového vybavení. V podstatě zahrnuje vybavení laboratoře tkáňových kultur a při velkovýrobě možnost sterilního doplnění výrobku.

Směs enteropathogenních E.coli potencuje účinnost infikovaných vakcín proti AD, používajících jiné adjuvans oproti vynálezu.

Příklad způsobu výroby kombinované vakciny - předpis pro 1000 ml.

Earlovým roztokem s 0,5 % laktalbuminhydrolyzátem o pH 7,6 propláchnuté kultury buňek linie vepřové ledviny PK se infikují objemem 1 ml vysokotitráží mutanty viru Aujeszkyho choroby - CNCTC AO 5/78 - mající titr alespoň $10^{8,5}$ /ml a virus se ponechá absorbovat na buňky 20 minut při teplotě 36 °C. Po adsorpci se přidá udržovací médium v objemu 100 na Roux láhev 1200 ml - Earlov roztok s 0,5 % laktalbuminhydrolyzátem pH 7,6 po úpravě 7,5 % NaHCO_3 - a kultury se ponechají inkubovat při teplotě 36 až 37 °C do doby jejich úplného rozpadu, který se zpravidla objeví mezi 20 až 48 hodinami od infekce.

V době úplného citopathického poškození kultur virovou replikací se médium jednotli-

vých infikovaných kultur smíchá, centrifuguje se při 6000 ot/min po 10 minut za použití úhlové hlavy v centrifuse T 23 Janetzki a supernatanty se opět smíchají.

Virová centrifugovaná suspenze se temperuje na teplotu 37 °C a inaktivuje se přidáním desetiprocentního, na chladničkovou teplotu předchlazeného, betapropiolaktonu do konečné koncentrace 0,15 %. Inaktivace probíhá při teplotě 36 až 37 °C po dobu 30 minut, během kterých se suspenze alespoň 2x promíchá a podle potřeby se upraví pH, které zpravidla po přidání betapropiolaktonu poklesne. Po 30 minutách inaktivace se kontroluje pH, případně se upraví na 7,6 a k virové suspenzi se přidá 1/5 objemu gramnegativních střevních tyčinek pomnožených v Earlově roztoku s 0,5 % laktalbuminhydrolyzátu dvacetihodinovou inkubací při teplotě 36 °C, obsahující v 1 ml 10^8 bakteriálních jedinců, které byly vystaveny dvojnásobnému cyklu mražení a rozmražení a inaktivovány formolem v konečné koncentraci 0,4 % po dobu 48 hodin při 36 °C. Vakcína pro očkování prasnic zahrnuje obvykle stejné objemy kmenů 157, 147, 64, 149, 141 typizovaných podle O antigenu, přičemž alespoň dva z těchto kmenů mají přítomný LT enterotoxin a antigen fimbriální K 88, *Salmonella choleraesuis*.

Inaktivovaná virová suspenze se směsí inaktivovaných bakteriálních kmenů předeřtává na 37 °C se za neustálého intenzivního míchání v mixeru nebo za použití míchačky smíchá s 85 ml rozehrátého Aguasorbu a to nejprve přidáním adjuvans s 250 ml směsí, vyčká se vazby suspenze na adjuvans, což se projeví zhoustnutím směsi přibližně po jednodominutovém míchání a dále se za neustálého míchání pozvolna přidává zbytek suspenze. Současně se do vakcíny přidávají antibiotika penicilin a streptomycin do konečné koncentrace aa 500 j resp. gamma/ml vakcíny, a fungizon 5 ug/ml. Celková doba mísení dostačující k dokonalé homogenizaci nepřekračuje 5 minut, obvykle dostačují 4 minuty. Adjuvanstní vakcína se sterilně plní do lékovek a uzavírá gumovými zátkami a kovovými oblímkami. Až do doby použití se uchovává při chladničkové teplotě 4 až 6 °C.

Vakcína podle vynálezu má toto složení :

1. Udržovací médium kultur obsahující v 1 ml $10^{8,5}$ TCID₅₀ mutanty viru

Aujeszkyho choroby-CNCTC Ao 5/78, inaktivované 0,15% betapropiolaktonu	72 díly
Směs <i>E.coli</i> mající O antigeny 157, 147, 64, současně s přítomností LT enterotoxinu a K 88 antigenu, inaktivovaných 0,4% formolem	20 dílů
Aguasorb hydrofilní bezvodý	8 dílů
Penicilin a streptomycin aa 500 j resp. gamma/ml Fungizon	5 um/ml
2. Udržovací médium tkáňových kultur obsahující v 1 ml $10^{9,0}$ TCKD₅₀
mutanz viru Aujeszkyho choroby CNCTC Ao 5/78, inaktivované 0,35% betapropiolaktonu

	73 díly
Směs <i>E.coli</i> mající O antigeny 149, 141, 147 a <i>Salmonella choleraesuis</i> , přičemž alespoň jeden z kmenů <i>E.coli</i> (O149 : K 88 a,c,) produkuje LT enterotoxin a má K 88 antigen, inaktivovaných 0,4% formolem	20 dílů
Aguasorb hydrofilní bezvodý	7 dílů
Penicilin a streptomycin aa 1000 j, resp. gamma/ml Fungizon	15 ug/ml

Neškodnost vakcíny se ověřuje jednak v průběhu její výroby, jednak u hotového produktu. V průběhu výroby se kontrolují testy sterility v bujonu a na krevním agaru za aerobních a anaerobních podmínek kultivace sterilita bakteriální suspenze a to pro každý kmen ve vakcíně použitý (ověřováno 1 % objemu každého kmene). Bezpečnost kombinované adjuvantní vakcíny se ověřuje testem na třech králících, kterým se intramuskulárně aplikuje 2 ml vakcíny a sleduje se klinický stav zvířete, vč. teplotní křivky. Očkování králíci slouží i pro ověření účinnosti vakcíny a to současně vyhodnocením titrů neutralizačních protilátek alespoň 1 : 16 a jsou-li pokusná zvířata ochráněna před infekční zátěží po revakcinaci (titry 128 až 256). Titry aglutinačních protilátek se hodnotí přímou aglutinační reakcí s jednotlivými kmeny jednak považnými, jednak inaktivovanými formoulem. Za vhodnou je pokládána vakcína, která vede k titrům aglutinačních protilátek alespoň 1 : 80 proti jednotlivým kmenům přítomným ve vakcíně (kalkulováno na vlastní ředění séra bez přidání antigenu), přičemž největší důraz je kladený na reakce s formalizovanými antigeny.

Přítomnost LT enteroxinu v preparátu je hodnocena kvantitativně před inaktivací titrací bakteriálního filtrátu na VERO v buňkách. Za vhodný je pokládán preparát mající titr alespoň 64.

Pro použití kombinované vakcíny proti viru Aujeszkyho chorobě a G-tyčkám, která byla aplikována v průběhu hromadného onemocnění selat a prasnic došlo k tomuto průběhu poklesu ztrát :

I. čtvrtletí 1977 - 700 ks úhynu	27,25 % z počtu narozených
II. čtvrtletí 1977 - 259 ks úhynu	11,10 % z počtu narozených
III. čtvrtletí 1977 - 162 ks úhynu	6,03 % z počtu narozených

V dalším období již nedocházelo k výskytu nákazy.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Kombinovaná vakcína proti Aujeszkyho chorobě a G-střevním pathogenním mikrobům, vyznačující se tím, že v 1 ml obsahuje $10^{8,5}$ až $10^{9,5}$ TCID₅₀ inaktivované mutanty viru Aujeszkyho choroby CNCTC AO 5/78 a 10^5 až 10^8 inaktivovaných bakteriálních G-jedinců, např. enteropathogenních *Escherichia coli* a nebo salmonel, v lipidodnom adjuvans.

2. Způsob výroby kombinované vakcíny podle bodu 1, vyznačující se tím, že virus Aujeszkyho choroby CNCTC AO 5/78 se kultivuje na tkáňových kulturách, nejvýhodněji na buňkách stabilní linie vepřové ledviny (PK) v bezsérovém udržovacím médiu při teplotě 36 až 37 °C po dobu 18 až 48 hodin v závislosti na úplném rozpadu infikovaných buněk a potom se po oddělení buňčné drti inaktivuje betapropiolaktonem, homogenizuje se při teplotě do 42 °C s lipidním adjuvans a s 10^5 až 10^8 inaktivovanými G-jedinci, především enteropathogenními *Escherichia coli* nebo salmonel.

3. Způsob výroby podle bodu 2, vyznačující se tím, že ve vakcíně užitý adjuvans je tvořen vstřebatelnou lipidní směsí, která se smíchá s virovou suspenzí nejvýhodněji při

teplotě 30 až 37 °C s přidáním bakteriální suspenze G-mikrobů, jejichž antigenní potence byla zvýrazněna opakovaným rozrušením jejich těl opakovaným zmrazením a rozmrazením.