

ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11)
181993

Bejelentés napja : (22) 1979. XI. 29. (21) (WE—609)

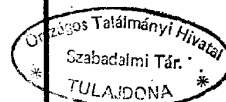
Elsőbbsége : (33) 1978. (32) XI. 30. (31) (78 46603)
Nagy-Britannia

Közzététel napja : (41) 1983. (42) I. 28.

Megjelent : (45) 1986. VI. 30.

Nemzetközi osztályozás :

(51) NSZO₃
C 12 N 7/08
A 61 K 39/215



Feltalálók : (72)

Fishman, Bernard, mikrobiológus, Gillingham,
Hitchcock, Louise Mary, mikrobiológus, Bromley,
O'Reilly, Kevin Joseph, állatorvos, Milland
Nagy-Britannia

Szabadalmaz : (73)

The Wellcome Foundation Ltd.,
London, Nagy-Britannia

(54) Eljárás legyengített peritonitis vírus-törzs előállítására

1

A találmány tárgya eljárás a macskafélék fertőző hashártyagyulladását (feline infectious peritonitis, rövidítve: FIP) okozó vírus legyengített törzsének az előállítására. A találmány kiterjed az említett fertőző hashártyagyulladás ellen a macskafélék fajához tartozó állatoknak immunitást biztosító vakcinának a találmány szerint legyengített vírustörzs felhasználásával történő előállítására is.

A macskafélék fertőző hashártyagyulladása mind a házi, mind a vadon élő macskaféle állatok (Felidák) fontos betegsége, amely csaknem minden esetben az állat elhullásához vezet. Ezt a betegséget először 1950 táján ismerték fel és írták le „peritonitis chronica fibrinosa” elnevezéssel [J. Amer. Vet. Med. Assoc. 144, 1409—1420 (1963)]. Azóta ezt a betegséget Észak-Amerikában, Európában, Dél-Afrikában, Ausztrál-Ázsiában és Japánban is észlelték. Újabb időben a kórokozó organizmust is leírták, még pedig coronavirus-típusú vírusként [Nature, 266, 682 (1977)].

Az ezzel a betegséggel fertőzött állatok letargiássákká és étvágytalanokká válnak, a hashártya üregében (cavum peritonei) folyadék gyülemlik fel, ami a has megduzzadását eredményezi; az állat végül is sárgaságszerű állapotban pusztul el. Gyógykezelés és ápolás meghosszabbíthatja a betegség lefolyását, végül azonban az említett klinikai tüneteket mutató valamennyi állat elpusztul [J. Amer. Vet. Med. Assoc. 154, 26—35 (1969)].

Már régóta felismerték, hogy vakcinára van szükség a macskafélék fertőző hashártyagyulladására járványszerű kitérőseinek megelőzésére [J. Amer. Vet. Med. Assoc.

2

155, 1728—1733 (1969)], eddig azonban a betegség kórokozó vírusának elkülönítése és tenyésztése irányuló számos kísérlet eredménytelen maradt. Újabbban beszámoltak ugyan arról, hogy sikerült vékonybél-szövetkultúrán tenyésztetni a macskafélék fertőző hashártyagyulladásának vírusát [The Cornell Veterinarian, 68, 411—417 (1978)], a leírt módszer azonban nem alkalmas sem a vírus legyengítésére, sem pedig vakcina gyakorlati célokra történő előállítására.

10 Azt találtuk, hogy elő lehet állítani a macskafélék fertőző hashártyagyulladását vírusának oly legyengített törzsét, amely szérum-antitestek fejlődését idézi elő a fertőzésre hajlamos állatokban, emellett mellékhatásokat csak igen csekély mértékben vagy egyáltalán nem idéz elő. A vírust tartalmazó, negatív festésű készítmények elektronmikroszkópiai vizsgálata azt mutatta, hogy a vírus morfológiai szempontból a coronavirusokhoz hasonló; különösen a madarak fertőző bronchitis vírusával mutat morfológiai rokonságot.

25 A macskafélék fertőző hashártyagyulladásának vírusa azonban abban különbözik a fertőző madár-bronchitis vírusától, hogy embrionáló tojásban nem tenyésztethető. Viszont a macskafélék fertőző hashártyagyulladásának vírusa az emberi coronavirus mellett az egyetlen olyan emlős-coronavirus, amely szövetkultúrán tenyésztethető és amely (nyilvánvaló) citopathogen (sejtkárosító) hatást mutat. A humán coronavirusok általában a sejtréteg lassú és részleges degenerálódását okozzák, míg a macskafélék fertőző hashártyagyulladásának ví-

rusa legyengített állapotban 48—72 óra alatt teljesen elroncsolja az egyréteges sejt-kultúrát.

A jelen találmány szerint tehát a macskafélék fertőző hashártyagyulladás vírusának olyan legyengített törzset állítjuk elő, amely antitestek fejlődését váltja ki a fertőzésre hajlamos állatokban, anélkül hogy a fertőző hashártyagyulladás jellemző tüneteinek fellépését eredményezné, amely továbbá morfológiailag hasonló a koronavírusokra, különösen a fertőző madár-bronchitis kórokozó vírusára, de ez utóbbitól fejlődési tulajdonságaiban különbözik annyiban, hogy emlős szövetkultúrán fejlődni képes, embrionált tojásban azonban nem fejlődik és amely a szövetkultúra sejtjeinek megfertőzése esetén jellegzetes citopátiás hatást okoz, amelyben a sejtek a mikroszkópos vizsgálat során szabálytalan alakot mutatnak nedves készítményekben, végül azonban kigömbölyödnek és/vagy elválnak attól a szilárd felülettől, amelyen fejlődtek.

A koronavírusok osztályába tartozó vírusok lényegileg gömbalakúak, 80—160 nm átmérővel, körülbelül 25 nm hosszúságú kiálló nyúlványokkal, amelyek oly külső megjelenést adnak a vírusnak, mintha azt fénykioszorú vagy korona övezné.

Az ilyen legyengített fertőző macska-hashártyagyulladás-vírusok törzseinek előállítása oly módon történik, hogy valamely virulens fertőző macska-hashártyagyulladás-vírust elkülönítünk és macska-embrió sejt-kultúrákban sorozatos passzázsokon (átoltásokon) visszük át körülbelül 100 alkalommal, hogy ezáltal a vírus patogén tulajdonsága csökkenjen, fertőzőképességét és immunogenitását azonban megtartsa. Macska-embrió sejt-kultúrájaként bármely macska-fajtájú állat embrióiból nyert sejtvonal vagy sejt-törzs alkalmazható.

A találmány további tárgyát oly eljárás képezi a fertőző macska-hashártyagyulladás virulens vírusainak legyengítésére, amelynek során valamely elkülönített macska-hashártyagyulladás-vírust macska-embrió sejt-kultúrákban sorozatos passzázsokon viszünk keresztül körülbelül 100 alkalommal és adott esetben az így kapott legyengített vírust valamely erre alkalmas sejt-kultúrában tenyésztjük, hogy vakcina előállítására elegendő mennyiségű vírust kapjunk.

A fertőző macska-hashártyagyulladás virulens vírusának az elkülönítése az említett betegségben szenvedő macska peritoneális folyadékából, véréből, vizeletéből vagy különféle szerveiből történhet. Peritoneális folyadék vagy vizelet e célra való alkalmazása esetén az eljárás céljaira választott sejt-kultúrákat közvetlenül beolthatjuk a fertőző vírust tartalmazó folyadékkal. A vírusnak a fertőző állat véréből történő elkülönítése céljából az állatot a juguláris vénából vagy bármely más alkalmas vénából véreztetjük; az így kivett vérmintát megalvadni hagyjuk, az alvadékat például mozsárban eldörzsöljük és valamely erre alkalmas közegben, például foszfáttal pufferezett sóoldatban szuszpendáljuk. A szuszpenziót azután centrifugáljuk a durva szövet-törmelékek eltávolítása céljából, a szupernatáns folyadékot elkülönítjük és ezt használjuk fel a sejt-kultúrák beoltására.

Kinyerhetők a vírusok a fertőző macska vagy egyéb macska-fajtájú állat más szerveiből, például a májból, lépéből vagy csepleszből (omentumből) is; a sejt-kultúrák beoltására szolgáló vírus-készítmény előállítása ebben az esetben is lényegileg úgy történik, amint ezt a megalvadott vér esetében leírtuk, tehát a szervet eldörzsöljük,

alkalmas közegben szuszpendáljuk, a szuszpenziót centrifugáljuk és a szupernatáns folyadékot alkalmazzuk a sejt-kultúrák beoltására.

A virulens vírusok sorozatos passzázsának végrehajtására alkalmas macska-embrió sejt-kultúrákat a macskafélék fájához tartozó bármely állat embriójának tüdejéből, veséjéből, szívéből, májából, beléből vagy más alkalmas szervéből vagy ilyen szervek keverékéből vehetjük; alkalmas szövetek nyerhetők erre a célra a bőrből, izmokból, placentából vagy a nyelvből is. A sejt-kultúráknak a macska-embrió különböző részeiből, vagy akár az egész embrióból történő előállítása olyan módszerekkel történhet, amilyeneket az 1 177 625 és 1 286 250 sz. brit szabadalmi leírások, valamint a J. Hygiene, 67, (1969), 115—124. közlemény ismertetnek. Az idézett szabadalmi leírások a diploid sejt-törzsek előállítására alkalmas eljárást ismertetnek, míg az utóbb idézett közlemény heteroploid sejtvonalak előállítására szolgáló eljárást ír le. A módszerek lényege az, hogy az embriót vagy annak az e célra választott részét mechanikai vagy enzim úton felaprítjuk, a kapott sejt-szuszenziót valamely a sejt-kultúra tenyésztésére szolgáló közegbe magába fogadó edénybe visszük és 32—39 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A szubkultúra-tenyésztés megkönnyítésére célszerű az egybefolyó sejt-lapokat tripszinnel vagy valamely ártalmatlan kelátképző anyaggal kezelni az újabb friss közegbe történő átvitel előtt. Alkalmazhatunk azonban a fertőző macska-hashártyagyulladás-vírus tenyésztésére primer macska-sejt-kultúrákat is; ezek előállítási módja a szakmabeliek számára jól ismert és bármely virológiai kézikönyvben megtalálható.

Az elkülönített virulens fertőző macska-hashártyagyulladás vírus tenyésztése oly módon történhet, hogy az e célra választott macska-embrió sejtek egysejt-rétegét vagy sejt-lapját beoltjuk a fertőző állatból származó vírus-készítménnyel, majd a beoltott sejt-kultúrát 35 °C és 39 °C közötti, előnyösen 37 °C hőmérsékleten 3—10 napig, előnyösen 5—8 napig inkubáljuk valamely erre alkalmas közeg jelenlétében.

Közegként célszerűen valamely kémiaiilag definiált anyagot alkalmazunk biológiai adalékok, például szérum hozzáadása nélkül. Ilyen célra alkalmas közegek példáulként az Eagle-féle alap-közeg [Eagle H., Science, 130, 432 (1959)] vagy a „199” fenntartó-közeg [Morgan J. F. és munkatársai, Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.), 73 1 (1950)] említethetők. A közeghez adhatunk valamely baktériumellenes szert, például penicillint és/vagy sztreptomicint is. Az inkubálás befejezése után a vírust mechanikai módszerekkel, például fagyasztással és felolvasztással különíthetjük el; az így kapott vírus-készítményt azután a szokásos szövetkultúra-módszerekkel (vö.: A Manual of Basic Virological Techniques, G. C. Ro-vozzo és C. N. Burk, Prentice-Hall Inc., Eaglewood Cliffs, N. J., USA, 1973) alkalmazzuk a macska-embrió sejtek egysejt-rétegű kultúráinak sorozatos passzázsolására.

A vírus első néhány, rendszerint körülbelül 5 passzázs során nem tapasztalható nyilvánvaló citopátiás hatás a sejteken. Az ezután következő további passzázsokban azonban a fertőző macska-hashártyagyulladás-vírussal történő fertőzés a fentebb ismertetett jellemző citopátiás hatásokat idézi elő az egyrétegű sejt-kultúrákon; ez a hatás körülbelül 48—72 órai inkubálás után mutatkozik. A sejtek végülis elválnak a tenyésztő-edény felületéről. A nyilvánvaló citopátiás hatás megjelenése

határozza meg az egyes passzázsok inkubálási idejét, amely 1 naptól 5 napig terjedhet. Az egyes passzázsokból kapott vírusok titere $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml és $10^{10.0}$ TCID₅₀/ml között változhat. TCID₅₀ a sejt-kultúrának azt a fertőző adagját jelenti, amely a vírus-fertőzésnek kitett kultúra sejtjeinek 50%-án okoz citopátiás hatást.

Körülbelül 100 passzázs után a fertőző macska-hashártyagyulladás-vírus már legyengítettnek tekinthető, minthogy ebben az állapotában a vírus szérumszemlegető antitestek termelését váltja ki a fertőzésre hajlamos állapotban, anélkül azonban, hogy számottevő mellékhatások vagy nyilvánvaló betegség-tünetek lépnének fel.

Az ilyen módon legyengített fertőző macska-hashártyagyulladás-vírus mintáinak nagyüzemi termelése céljából a rendszerint törzs-vírusként tárolt vírust frissen készített macska-embrió sejt-kultúrán tenyésztjük, amely erre alkalmas közegben, például szérumszemes Eagle-féle „Minimum Essential Medium” vagy „199 Maintenance Medium” közegben. Ha 1–5 napi inkubálás után már csaknem teljes citopátiás hatás mutatkozik, akkor a sejteket és a közeget összegyűjtjük. Az így termelt vírus valamennyi adagját vizsgálni kell sterilizálhatóságra, toxikusságra és hasonló gyakorlati tulajdonságok szempontjából; az ilyen vizsgálatokat a British Pharmacopoeia (Veterinary) 1977 (Brit állatorvosi gyógyszerkönyv, 1977) 149. oldalán ismertetett irányelvek szerint végezzük. A kapott vírus-szuszpenziót azután célszerűen ampullákban vagy üvegcsékben megfagyaszthatjuk és cseppfolyós nitrogénben tároljuk. Adhatunk azonban a vírus-szuszpenzióhoz stabilizálószereket, például szorbitot és/vagy fehérje-hidrolizátumokat (például a „Sol-U-pro” készítményt) is és az így stabilizált vírus-készítményt liofilizált állapotban tárolhatjuk.

A találmány egyik további tárgyát tehát oly vakcina előállítására képezi, amely immunitást fejleszt ki az állatokban a fertőző macska-hashártyagyulladással szemben; a találmány szerinti vakcina egy a fentebb adott meghatározásnak megfelelő legyengített macska-hashártyagyulladás-vírust tartalmaz hatásos adagban vagy ennek többszörösében, gyógyászati szempontból elfogadható hordozó kíséretében. A vakcinálás szempontjából hatásos adag $10^{4.0}$ – $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml, előnyösen $10^{5.0}$ – $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml lehet.

A vakcina gyógyászati szempontból elfogadható hordozója valamely folyadék lehet; alkalmas erre a célra például az olyan vízszelvény, amely tápanyagokat és stabilizálószereket tartalmaz; ilyen például a Hank-féle kiegyensúlyozott sóoldat vagy más hasonló közegek. A hordozó egyes esetekben egy lezárt steril edény, például ampulla vagy üvegcsé is lehet.

A találmány szerinti vakcinát intraperitoneális, szubkután vagy intramuszkuláris injekcióban, vagy pedig orális, nazális vagy intraokuláris úton adhatjuk be a macska-fajtájú állatoknak. A kívánt adag-mennyiséget egy adagban, vagy időben elosztva, több kisebb adagban adhatjuk be. Előnyösen úgy járunk el, hogy a legyengített macska-hashártyagyulladás-vírus hatásos mennyiségét tartalmazó, 1–2 ml térfogatú készítményt egyetlen adagban adjuk be az állatnak.

A találmány szerint előállított vakcina a legyengített fertőző macska-hashártyagyulladás-vírus mellett tartalmazhat egyéb, más mikroorganizmusokból származó antigén anyagokat is; az ilyen kombinált vakcinákban a macska-fajtájú állatok más kórokozó vírusaiként pél-

dául parvovírusokból, mint fertőző macska-bélgyulladást (macska-panleucopenia), macska-veszettséget, leukémiát, macska-herpest okozó vírusokból, továbbá macska-calci-vírusból, retrovírusból és hasonlókból nyert antigén anyagokat alkalmazhatunk előnyösen. Különösen előnyös kombináció az olyan nedves készítmény, amely egy steril edényben legyengített macska-hashártyagyulladás-vírust és egy további edényben liofilizált száraz készítmény alakjában egy vagy több további macska-vakcinát tartalmaz; az ilyen kombinált készítmény alkalmas arra, hogy felhasználás előtt a készítmény két komponensét egyesítsük és ebben az alakban alkalmazzuk.

A találmány szerinti legyengített macska-hashártyagyulladás-vírust liofilizált alakban is alkalmazhatjuk, amikor is a készítmény másik alkotórészét képező vakcina folyékony alakban van. További lehetőségként a legyengített FIP-vírust liofilizált alakban alkalmazzuk a készítményben egy- vagy többfajta fentebb említett másféle vakcinával kombináltan és a készítményhez egy steril vizet tartalmazó edényt is csomagolunk, amelynek tartalmával a liofilizált vakcinát alkalmazás előtt rekonstituálhatjuk, vagyis beadásra alkalmas alakba hozhatjuk. Az említett edényeket egy közös dobozba vagy tartályba csomagoljuk, megfelelő használati utasítással együtt, amelyben leírjuk a liofilizált vakcinának a nedves készítménnyel vagy steril vízzel történő rekonstituálását felhasználás előtt.

A találmány további tárgyát egy oly módszer képezi, amellyel a macskaféle állatokat immunissá tehetjük a fertőző hashártyagyulladással szemben; e módszer lényege az, hogy az állatoknak a fentebb leírt vakcina hatásos adagját adjuk be.

A találmány szerinti eljárás gyakorlati kiviteli módjait közelebbről az alábbi példák szemléltetik; megjegyzendő azonban, hogy a találmány köre semmilyen szempontból nincsen e konkrét példák tartalmára korlátozva.

1. példa

Fertőző macska peritoneális folyadékából származó FIP-vírus elkülönítése és sorozatos átvitelével történő tenyésztése

Egy fertőző hashártyagyulladásban elhullott 3–4 hónapos macska peritoneális folyadékát pipettával, aseptikus körülmények között kivesszük és diploid macska-embrió-tüdősejtek összefolyó egysejt-rétegét tartalmazó sejt-készítményre oltjuk. Beoltás előtt az egysejt-réteget foszfáttal pufferezett nátrium-klorid-oldattal kétszer mossuk; majd szérumszemes „199” fenntartó tápközzel tápláljuk a sejteket.

A fertőző egysejt-réteget 37 °C hőmérsékleten körülbelül 7 napig inkubáljuk, majd megfagyaszthatjuk és újból felérésztés útján összegyűjtjük a vírust. Az így szétválasztott fertőző sejteket tartalmazó közeg egy alikvot részét diploid macska-embrió-tüdősejtek friss egysejt-rétegeit tartalmazó, „199” közegben fenntartott kultúrájára oltjuk és 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk.

A vírust azután hasonló módon 3–5 sorozatos passzázsra visszük át, míg a jellegzetes citopátiás hatás nem kezd mutatkozni, ami azt jelenti, hogy a fertőző sejtek előbb szabálytalan alakokat kezdenek mutatni, majd

végül kerek alakot öltenek, ami a nedves készítmény mikroszkópos vizsgálatával figyelhető meg. Az 5. passzázstól kezdődően a citopátiás hatás már igen határozottan mutatkozik és rövid idő alatt, 48–72 órán belül szétroncsolja a sejtréteget.

Az így kapott vírust azután 100 sorozatos passzázsra visszük keresztül, amikor is a vírus $10^{4.0}$ – $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml titert mutat.

2. példa

A fertőzött macska májából kapott FIP-vírus elkülönítése és sorozatos átoltásokkal történő tenyésztése

Egy fertőző hashártyagyulladásban elhullott 11 hónapos macska máját kivesszük és a máj-szövetet egy „Stomacher 80 (Colworth)” szövet-dezintegrátorban 60 másodpercig trituráljuk foszfáttal pufferezett nátrium-klorid-oldattal. A kapott szuszpenziót ezután 1108 g-vel centrifugáljuk, majd a szupernatáns folyadékot dekantáljuk és ráoltjuk egy heteroploid macska-embrió-tüdősejtek összefolyó egysejt-rétegét szérumentes „199” közegben tartalmazó sejt-készítményre.

A vírust ezután az 1. példában leírt módon elkülönítjük és sorozatos passzázsokon visszük keresztül, aminek során a készítmény az előző példában leírttal azonos módon mutatja a citopátiás hatást az egyes passzázsokban.

3. példa

A fertőző hashártyagyulladás akut stádiumában levő fertőzött macska véréből származó FIP-vírus elkülönítése és sorozatos átoltásokkal történő tenyésztése

Egy fertőző hashártyagyulladásban szenvedő 6 hónapos macskától (a betegséget lázas állapot és a szervezet leromlása alapján diagnosztizálhatjuk) vért veszünk a juguláris vénából. A vért 20 percig állni hagyjuk, hogy megalvadjon.

A szérumot és a plazmát elkülönítjük az alvadékból, majd az alvadékot egy „Stomacher” szövet-dezintegrátorban 60 másodpercig trituráljuk foszfáttal pufferezett nátrium-klorid-oldatban. A kapott szuszpenziót azután 1108 g-vel centrifugáljuk, a szupernatáns folyadékot dekantálással elkülönítjük és az így kapott folyadékkal diploid macska-embrió-tüdősejtek összefolyó egysejt-rétegeit szérumentes „199” közegben tartalmazó sejt-kultúrát oltunk be, majd a beoltott sejt-kultúrát 5–8 napig inkubáltatjuk 37 °C hőmérsékleten.

A vírust azután az 1. példában leírt módon elkülönítjük és sorozatos passzázsokon visszük keresztül; a leírt citopátiás hatást tapasztaljuk az egyes passzázsokban.

4. példa

A 2. példa szerint kapott vírust egy az 1 286 250 sz. brit szabadalmi leírásban ismertetett módon készített heteroploid macska-embrió-tüdősejtvonalon passzázsoltatjuk. (Heteroploid sejtvonalat akkor kapunk, ha a

sejteket a primer kultúrából kiindulva legalább 70-szer sikeresen passzázsoltatjuk.)

A fenti művelet során ugyanolyan citopátiás hatást tapasztalunk a megfelelő passzázsokban, mint az 1. példában leírt eljárás során. Az így kapott vírus títere ezáltal is $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml és $10^{10.0}$ TCID₅₀/ml között van.

5. példa

10

Az 1. példában leírt módon történő sorozatos átoltások után a 100. passzázsából kapott sejteket megfagyasztjuk és újból föleresztjük a legyengített FIP-vakcina kinyerése céljából. Az így kapott vakcinát olyan 12 hetes macskáknak adjuk be, amelyek az előzetes vizsgálat során a fertőző hashártyagyulladás antitestjeiből menteseknek bizonyultak. A beadást intraperitoneális injekcióval végezzük, egyetlen, 10^6 TCID₅₀/ml vírustiterű 2 ml-es adaggal. 21 nap múlva a macskákból vért veszünk és a szérumot megvizsgáljuk, hogy tartalmaz-e semlegesítő antitesteket. Azt találjuk, hogy a szérumban már szignifikáns mennyiségű semlegesítő antitest van jelen, amint ezt az alábbi titer-értékek mutatják: antitest-titer vakcinálás előtt: kisebb mint 10, antitest-titer vakcinálás után: 160.

6. példa

30

Egy a macskaféle állatok fertőző hashártyagyulladás, fertőző bélgyulladás és vírusos rhinotracheitis elleni immunizálására alkalmas vakcina-készítmény a következő alkotórészekből áll: egy ampulla, amely liofilizált élő legyengített, fertőző bélgyulladás elleni vakcinát és élő módosított, vírusos rhinotracheitis elleni vakcinát tartalmaz, továbbá egy második ampulla, amely az 1. példa szerint előállított inaktivált FIP-vírus-szuszenziót tartalmaz, továbbá használati utasítás beadásra kész készítménynek a liofilizált vakcinából, a folyékony készítmény felhasználásával történő előállítására.

7. példa

45

A macskaféle állatok fertőző hashártyagyulladás, fertőző bélgyulladás és veszettség elleni immunizálására alkalmas vakcina-készítmény a következő alkotórészekből áll: egy ampulla, amely liofilizált élő, legyengített, fertőző hashártyagyulladás elleni vakcinát (amelyet az 1. példában leírt módon állítottunk elő) és ugyancsak liofilizált fertőző bélgyulladás elleni élő, legyengített vakcinát tartalmaz, továbbá egy második ampulla, amely veszettség elleni inaktivált vírus szuszpenzióját tartalmazza, végül egy használati utasítás a liofilizált vakcinának a folyékony szuszpenzió felhasználásával beadásra kész készítménnyé való alakítására.

Szabadalmi igénypontok

60

1. Eljárás a macskafélek fertőző hashártyagyulladását okozó vírus (feline infections peritonitis, rövidítve: FIP) legyengített törzsének előállítására (amely 80–160 mm átmérőjű, lényegileg gömbalakú, körülbelül 25 mm hosszúságú kiálló nyúlványokkal rendelkezik,

65

serkenti az antitestek képzését a fertőzésre érzékeny állapotban, anélkül, hogy a macskafélék fertőző hashártyagyulladására jellemző tünetek fellépését okozná, morfológiailag hasonló a corona-vírusokra, különösen a madarak fertőző bronchitisének kórokozó vírusához, attól abban különbözik, hogy képes emlős-szövetkultúrán fejlődni, embrionáló tojásban azonban nem fejlődésképes, továbbá az általa megfertőzött szövetkultúrasejteket a nedves készítmény mikroszkópos vizsgálata során észlelhető szabálytalan alakok képzésére, végül pedig kikerekedésre és/vagy a tenyésztésükre alkalmazott szilárd felületről való leválásra indítja) azzal jellemezve, hogy valamely FIP-vírust, előnyösen FIP (ATCC

VR—867) vírust elkülönítettük, macskafélék embrionális sejteinek kultúráiban sorozatosan, előnyösen legalább száz alkalommal átoltjuk, majd az így kapott legyengített vírust adott esetben szaporítottuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogantatási módja, azzal jellemezve, hogy macskafélék embrionális sejteinek kultúrájaként macskafélék diploid embrionális tüdősejtjeit tartalmazó kultúrát alkalmazunk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogantatási módja, azzal jellemezve, hogy macskafélék embrionális sejteinek kultúrájaként macskafélék heteroploid embrionális tüdősejtjeit tartalmazó kultúrát alkalmazunk.