



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202 252

(11) (B 1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 22 05 78
(21) PV 3286-78

(51) Int. Cl.³ A 61 K 39/145

(40) Zveřejněno 30 04 80
(45) Vydáno 31 01 83

(75)
Autor vynálezu JERÁBEK JAN doc. MVDr. CSc., BRNO a
ŠIMKOVÁ LUBOSLAVA ing., BRNO

(54) Vakcína proti myxomatóze králíků a způsob její výroby

1

Předmětem vynálezu je vakcína proti myxomatóze králíků a způsob její výroby, kterým se získá živý kmen Shopeho viru infekčního fibromu, vhodný k vakcinaci klinicky zdravých králíků proti myxomatóze.

V současné době se k vakcinaci králíků používá v ČSSR lyofilizovaná vakcína připravená ze Shopeho viru infekčního fibromu, který je množen v kůži uměle infikovaných králíků.

V zahraničí jsou používány k imunoprophylaxi myxomatózy králíků vakcíny připravené buďto ze Shopeho viru infekčního fibromu, který je množen v kůži uměle infikovaných králíků nebo apatogenní vakcíny, připravené z myxomatózního viru, získaného oslabením a pomnožením na buněčných kulturách.

Uvedené vakcíny jsou v různých státech vyráběny a používány pod různým komerčním označením, obvykle jsou distribuovány v lyofilizovaném stavu a před aplikací králíkům jsou ředěny zředovači. U vakcíny proti myxomatóze připravené ze Shopeho viru infekčního fibromu se ve Francii používají pro zvýšení účinnosti různá adjuvancia /francouzský patent 73 17754/.

Nevýhodou uvedených vakcín je, že

- a/ při dosavadní výrobě vakcín ze Shopeho viru infekčního fibromu jsou používáni králíci. Nejenom, že množení viru na králících je značně pracné, poměrně nákladné a zdlouhavé, ale při přípravě vakcíny se nepracuje s naprosto standardním substrátem /králíky/ pro pomnožování viru a tak nelze vyloučit ani případnou kontaminaci vakcíny virem myxomatózy,
- b/ při používání apatogenních vakcín připravených z myxomatózního viru není jisté, že používané modifikované kmeny viru myxomatózy jsou natolik stabilní, aby v přirozených podmínkách při možném pasážování na králících nemohly nabýt virulence.

Uvedené nedostatky při přípravě vakcíny proti myxomatóze ze Shopeho viru infekčního fibromu na králících odstraňuje způsob výroby vakcíny SFT /Shopeho virus infekčního fibromu množný na tkáňových kulturách/ podle vynálezu. Jeho podstatou je, že vakcína obsahuje živý kmen Shopeho viru infekčního fibromu CAPM V-200 adaptovaný na liniové buňky králíků ledvin RK₁₃. V monolayeru buněk pomnožený adaptovaný virus slouží k přípravě vakcíny, která obsahuje 4 000 až 40 000 ID₅₀/1 cm³ Shopeho viru infekčního fibromu. Vakcína se lyofilizuje a před aplikací králíkům se ředí zředovačem. Jako zředovač se používá Earleho médium nebo pufovaný fyziologický roztok. Vakcína připravená podle vynálezu je použitelná k imunoprofylaxi myxomatózy králíků místo dosavadní vakcíny, k jejíž přípravě byl používán Shopeho virus infekčního fibromu pomnožovaný na králících.

Pokrokem vakcíny a způsobu její výroby podle vynálezu je zejména to, že při výrobě vakcíny nejsou používáni králíci. Pokrokem je rovněž skutečnost, že výroba vakcíny je velmi jednoduchá a použité výrobní procesy zaručují její standardnost. K zjednodušení a zlevnění provozu při přípravě přispívá zavedení buněčné linie a levného kultivačního média pro multiplikaci viru.

P Ř Í K L A D

Vakcínu představuje lyofilizát suspenze viru, buněčného detritu, použitého média a lyofilizačního média. Pro přípravu vakcíny jsou používány následující ingredience:

- 1/ virus, 2/ monolayer buněčné kultury linie RK₁₃, 3/ médium MEM /Eagle/ nebo médium podle Earleho, 4/ lyofilizační médium.

Ad 1/ Virus byl získán adaptací Shopeho viru infekčního fibromu na buněčnou linii králíčí ledviny RK₁₃. Výchozím kmenem pro adaptaci na buněčnou linii byla komerční vakcína proti myxomatóze králíků, vyráběná v ČSSR Biovetou v Ivanovicích na Hané. Na buněčnou linii RK₁₃ adaptovaný kmen viru byl uložen v Československé sbírce mikroorganismů, sbírka zoopatogenních mikroorganismů, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno 21, Medláňky, jako lyofilizovaná kultura kmene SFT - Shopeho viru infekčního fibromu, přičemž byl kmen

zařazen do sbírky pod č. CAPM V-200.

Ad 2/ Buněčnou kulturu představují buňky linie králičí ledviny RK₁₃, pomnožované v referenční laboratoři.

Ad 3/ K přípravě vakcíny je možno použít médium MEM /Eagle/ nebo médium podle Earleho

a/ Médium MEM používané k přípravě vakcíny:

Zásobní MEM	
/Ústav sér a očkovacích látek, oborový podnik, Praha/	80 cm ³
H ₂ O redestillata	920 cm ³
Roztok hydrogen uhličitanu sodného 7,5% SEVAC	
/Ústav sér a očkovacích látek, oborový podnik, Praha/	10 cm ³
Penicilin	500 m.j./cm ³
Streptomycin	500 /ug/cm ³

b/ Růstové médium pro linii buněk RK₁₃:

Médium MEM používané k přípravě vakcíny	900 cm ³
Sérum bovinní pro tkáňové kultury	100 cm ³

c/ Složení Earleho média, používaného k přípravě vakcíny:

NaHCO ₃	2,2 g
NaCl	6,8 g
KCl	0,4 g
CaCl ₂	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	0,15g
Glukóza	1,0 g
Laktalbuminhydrolyzát	5,0 g
Kvasnicový extrakt /Yeastolate Difco/	1,0 g
Fenolová červen	5 cm ³
Penicilin	500 m.j./cm ³
Streptomycin	500 /ug/ cm ³
H ₂ O redestillata	ad 1000 cm ³

d/ Růstové médium pro linii buněk RK₁₃:

Earleho médium používané k přípravě vakcíny	900 cm ³
Sérum bovinní pro tkáňové kultury	100 cm ³

Ad 4/ Složení lyofilizačního média:

Želatina pro bakteriologii	300 g
Sacharóza	450 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	22,92 g
KH ₂ PO ₄	2,92 g
H ₂ O redestillata	6000 cm ³

Na 1 cm³ virové suspenze je přidáno 0,5 cm³ tekutého lyofilizačního média.

Poznámka: možnou variantou je použití suchého média, sušeného na Niro atomizéru, sterilizovaného zářením v dávce 2,5 Mrad. Kvantitativní poměry vyjádřené v gramech sušiny jsou obdobné.

Postup při přípravě vakcíny:

A. Pasážování kultur buněčné linie RK₁₃.

Subpasáže buněčné linie RK₁₃ jsou připravovány z dobře narostlých kultur v Rouxových lahvích obvykle v týdenních intervalech. Po odstranění růstového média je kultura opláchnuta roztokem versen-trypsinem, který při pokojové teplotě působí na kulturu 5 minut. Potom je versen-trypsin dekantován a láhve obrácené porostlou částí vzhůru jsou dány do termostatu /37°C/ na 20 minut. Po slití zbytků versen-trypsinu jsou uvolněné buňky suspendovány v médiu MEM /viz 3b/ /. Z jedné Rouxovy láhve jsou zpravidla připravovány 3 láhve o stejném obsahu.

Poznámka: versen = Chelaton III p.a. = C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ · 2 H₂O, Lachema Brno, ČSSR.

B. Příprava kultur buněčné linie RK₁₃ pro infekci virem.

Příklady provedení:

1. příklad: pro infekci virem jsou používány 3 dny staré monolayer buněk linie RK₁₃, připravené stejným způsobem jako při pasážování kultur buněčné linie RK₁₃ /viz bod A. Pasážování kultur buněčné linie RK₁₃/.

2. příklad: pro infekci virem jsou používány 3 dny staré monolayer buněk linie RK₁₃, připravené stejným způsobem jako při pasážování kultur buněčné linie RK₁₃ s tím rozdílem, že jako růstové médium je použito médium podle Earleho /viz bod 3d//. Toto médium je možno použít pouze při přípravě buněčné kultury určené k infekci virem. Médium podle Earleho není možno použít při běžném pasážování kultur buněčné linie RK₁₃.

C. Vlastní příprava vakcíny.

Narostlý monolayer buněk RK₁₃ je infikován popsáním, na tuto buněčnou linii adaptovaným, zásobním virem "na sucho" a po půlhodinové adsorpci je obsah kultivační nádoby doplněn devítinásobným množstvím média podle následujících příkladů provedení:

1. příklad: v případě, že buňky RK₁₃ byly před infekcí kultivovány v růstovém médiu MEM /viz bod 3b//, je možno doplnit médium MEM /viz 3a// nebo médium podle Earleho /viz 3c//.

2. příklad: v případě, že buňky RK₁₃ byly před infekcí kultivovány v médiu podle Earleho /viz 3d//, je doplněno médium podle Earleho /viz 3c//.

Po doplnění média probíhá kultivace vakcinačního viru stacionárním způsobem při teplotě 37°C a při dodržování zásad sterility. Čtvrtý den po infekci, kdy je možno na infikovaných buňkách pozorovat výrazný cytopatický efekt, jsou infikované kultury třikrát zmrazeny a rozmrazeny. Získaná suspenze představuje vakcinační virus, který je možno po přidání lyo-

filizačního média lyofilizovat a distribuovat.

Titrace sklizeného viru i lyofilizované vakcíny je prováděna intradermální testací na králících. V 0,25 cm³ suspenze musí být nejméně 10³ ID₅₀ po výpočtu podle Reeda a Muencha. Rozředěním 4 cm³ lyofilizovaného viru ve 20 cm³ zředovače je připraveno 20 vakcinačních dávek. Jako zředovače je možno použít médium podle Earleho /viz 3c//, ve kterém nemusí být přítomen laktalbuminhydrolyzát, nebo pufovaný fyziologický roztok o složení:

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	2,38 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
H ₂ O destillata ad	1000 cm ³
výsledné pH 7,4	

D. Ověřování neškodnosti a účinnosti vakcíny SFT.

Zkouška neškodnosti

a/ Podstata zkoušky:

Touto zkouškou se zjišťují změny zdravotního stavu po aplikaci vakcíny pokusným králíkům.

b/ Pokusní králíci:

Ke zkoušce jsou použiti 4 proti myxomatóze nevakcinovaní klinicky zdraví králíci o hmotnosti 1,5 až 2 kg.

c/ Postup zkoušky:

Dvěma králíkům se ostříhá srst na hřbetě a každému se aplikují intradermálně 3 cm³ komerční vakcíny 12 vpichy á 0,25 cm³.

Dvěma králíkům se komerční vakcína aplikuje subkutánně, každému 3 cm³ rozděleně do dvou míst /za lopatku/.

d/ Posouzení zkoušky:

Králíci jsou pozorováni 21 dnů, během této doby nesmí onemocnět infekční chorobou přenosnou na králíky.

Dvěma králíkům se musí v místech intradermální aplikace vakcíny vyvinout fibromy velikosti hrachu až bobu a nesmí dojít ke generalizaci fibromatózy.

U dvou králíků, kterým byla vakcína aplikována subkutánně, nesmí dojít ke generalizaci fibromatózy a k vážnějším místním změnám. Drobné zduření ve formě lokálního fibromu v místě subkutánní aplikace vakcíny není závadou, zpravidla se do ukončení pozorovací doby bez následků vstřebá.

e/ Výsledky zkoušek neškodnosti s vakcínou SFT:

Doposud provedenými zkouškami neškodnosti s vakcínou SFT bylo prokázáno, že tato vakcína je neškodná nejenom pro králíky o hmotnosti 1,5 až 2 kg, ale i pro mláďata po odstavu.

Zkouška účinnosti

a/ Podstata zkoušky:

Zkouškou se prokazuje odolnost zdravých vakcinovaných králíků na umělou infekci konstantní dávkou viru myxomatózy.

b/ Postup zkoušky:

Ke zkoušce je použito 8 klinicky zdravých králíků. Každému králíkovi je subkutánně aplikován za lopatku 1 cm³ komerční vakcíny. Po 9 dnech jsou králíci infikováni virem myxomatózy subkutánně na opačné straně než byli vakcinováni. Každý králík je infikován konstantní dávkou 1 cm³, obsahující 1000 ID₅₀ viru myxomatózy, z toho po jedné kapce virulentní suspenze je vetřeno oboustranně do spojivkového vaku. Současně jsou stejným způsobem infikováni 2 kontrolní králíci.

c/ Posouzení zkoušky:

Během pozorovací doby 21 dnů musí nejméně 6 z 8 vakcinovaných králíků /75 %/ odolat infekci virem myxomatózy. Dva kontrolní králíci však musí během pozorovací doby 21 dnů onemocnět klinicky zjevně myxomatózou.

d/ Výsledky zkoušek účinnosti s vakcínou SFT:

Doposud provedenými zkouškami účinnosti byla u vakcíny SFT prokázána vyšší účinnost než uvedených 75 %.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Vakcína proti myxomatóze králíků vyznačující se tím, že obsahuje živý kmen Shopeho viru infekčního fibromu CAPM V-200 v množství od 4000 do 40000 ID₅₀/1 cm³ v lyofilizovaném stavu a zředovač.
2. Vakcína podle bodu 1, vyznačující se tím, že jako zředovač se používá Earleho médium nebo pufovaný fyziologický roztok v množství 20 cm³ do 6 cm³ lyofilizátu.
3. Způsob výroby vakcíny podle bodu 1, vyznačující se tím, že se živý kmen Shopeho viru infekčního fibromu CAPM V-200 kultivuje v monolayeru liniových buněk králíčních ledvin RK₁₃, získaných kultivací v minimálním esenciálním médiu nebo v Earleho médiu, při teplotě 37°C po dobu 96 hodin, tj. do doby, kdy je dosaženo výrazného cytopatického efektu a získaná suspenze vakcinačního viru se lyofilizuje.