



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 147033 B

DIREKTORATET FOR  
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 0249/77

(51) Int.Cl.<sup>3</sup>: A 61 K 39/23  
C 12 N 7/08

(22) Indleveringsdag: 21 jan 1977

(41) Alm. tilgængelig: 24 jul 1977

(44) Fremlagt: 26 mar 1984

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 23 jan 1976 DE 2602478

(71) Ansøger: \*BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT; Marburg/Lahn, DE.

(72) Opfinder: Othmar \*Ackermann; DE, Helmut \*Stegmann; DE.

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af en vaccine  
mod Panleukopeni hos felider

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af en vaccine mod kattesyge, også kaldet infektiøs Gastroenteritis eller - efter dens hovedsymptom - Panleukopeni, ved hvilken fremgangsmåde et patogent Panleukopeni-virus svækkes ved passage gennem kattenyreceller.

Kattesyge er en felidespecifik virussygdom. Fremkalderen, et parvovirus, har en elektronmikroskopisk størrelse på 20-25 nm. Viruset overføres via åndedræts- og fordøjelseskanalen, og det udskilles via næsesekret og fæces. Efter en inkubationstid på fra 2 til 6 dage begynder sygdommen med spisevægring, feber, opkastning, for det meste diarré og tiltagende svaghed med exsiccatio på grund af væsketab. Som et karakteristisk træk indtræder en Panleukopeni af svær grad. Dødeligheden er op til 90%.

U  
S  
T  
I  
S  
T  
E  
R  
S  
K  
R  
I  
T

Katte, der overlever sygdommen, bliver immune. De kan overføre antistoffer til killinger via råmælken, men disse er også snart uden beskyttelse, fordi moderens antistoffer efterhånden nedbrydes.

Kattesyge er udbredt over hele verden, infektiositeten og patogeniteten af dens fremkalder er særdeles stor, og kattene er derfor udsat for stor risiko.

Man har allerede forsøgt at udvinde et svækket virus, der er egnet til fremstilling af en levende vaccine mod kattesyge, ved passager i vævskulturer. Mindst 6 passager, især 10 - 30 passager, er imidlertid ikke tilstrækkelige til frembringelse af et stabilt, svækket virus, der kan virke som aktivt princip i vaccinen. Det er nemlig blevet iagttaget, at podeviruset udskilles og optages af andre katte. Ved sådanne dyrepassager kan der fremkomme tilbagemutationer.

Til formeringen af det svækkede kattesygevirus har man også allerede anvendt fostervæv fra katte. Kattefostrene giver imidlertid særdeles lidt væv, således at denne metode er udelukket af økonomiske grunde.

Endvidere kendes fra NO-patentskrift nr. 111.029 en fremgangsmåde til fremstilling af en vaccine mod Panleukopeni hos felider, ved hvilken fremgangsmåde et patogent Panleukopeni-virus svækkes ved passage gennem kattenyreceller. Af nævnte NO-patentskrift fremgår imidlertid også, at katte, som vaccineres med den således fremstillede vaccine stadigvæk viser svage sygdomstegn, således at det anvendte virus ikke er virkelig "svækket". Derfor er det heller ikke udpræget egnet til vaccinefremstilling.

Man har nu fundet frem til en fremgangsmåde til fremstilling af en vaccine mod Panleukopeni, ved hvilken fremgangsmåde et patogent Panleukopeni-virus svækkes ved passage gennem kattenyreceller. Den her omhandlede fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man foretager mindst 80 passager på kattenyrecellerne og dernæst yderligere mindst 18 passager på permanente vævsceller fra felider eller mustelider, hvorefter man formerer det på denne måde fremkomne, svækkede virus på kattefosterceller og oparbejder det på i og for sig kendt måde til en vaccine.

Det første trin af svækningen, der hensigtsmæssigt omfatter fra 80 til 100 passager, sker i cellekulturer fra kat-

tenyrer, der dyrkes i et af de næringsmedier, der er gængse for celleformeringen. Dyrkningen af cellerne kan ske både som celle-måtte og som celleduspension. En temperatur på fra 35 til 39°C, fortrinsvis fra 36,5 til 37,5°C, skal holdes. En sådan kultur skal inficeres tidligt, senest dog, når cellerne er ca. 75% udvoksede. Som infektionsmedium anvendes den overstående væske fra den forrige, inficerede cellekultur. Den sættes til den nye cellekultur i forholdet fra 1:5 til 1:20. Fra 2 til 6 dage efter inficeringen kan den overstående væske udvindes og overføres til den næste cellekultur.

Efter fra 80 til 100 passager på den beskrevne måde overføres den virusholdige, overstående væske til en permanent vævscellekultur af felider eller mustelider. Tilsvarende permanente kulturer er kendt fra litteraturen. Et eksempel på sådanne permanente cellekulturer er Crandell-cellen, en permanent kattenyre-celle, beskrevet af R.A. Crandell et al., In Vitro 9, 176-185 (1973). Inficeringen af denne cellekultur med den overstående væske fra en inficeret cellekultur og den videre forarbejdning sker som beskrevet ovenfor.

Efter mindst 18 passager i permanente vævsceller er viruset tilstrækkeligt svækket. Det er fuldstændigt apatogent, uskadeligt og godt tåleligt. Ved svækningen mister det ikke immunogenitet, og den derudfra fremstillede vaccine har fremragende immuniseringsegenskaber.

Det kunne ikke ud fra ovennævnte NO-patentskrift nr. 111.029 forudses, at opdeling af virussvækningen i to trin, hvoraf det andet gennemføres på permanente vævsceller fra felider eller mustelider ville resultere i et fuldstændig svækket virus, som er velegnet til vaccinefremstilling. Dertil kommer, at en permanent cellelinie, når den først har vist sig egnet til det påtænkte formål, har den fordel, at cellerne kan formeres i stor målestok, uden at det er nødvendigt til stadighed at ofre nye forsøgsdyr, ligesom den kan holdes fri for fremmede vira under passagerne, når den først er udviklet fri for fremmede vira. Dette muliggør fremstilling af en virkelig effektiv vaccine i stor målestok.

Det svækkede virus, der har den videnskabelige betegnelse "Panleukopeni-virus, stamme BW 103", er deponeret i Institut für Hygiene und Epidemiologie, Prag, under registreringsnummeret CNTCC A 03/77.

Det på denne måde svækkede virus kan formeres i

vævskulturer af kattede fostre. Egnede hertil er især fostre, der er taget ud på organogenese-stadiet, ca. i den sidste tredjedel af drægtighedsperioden. Til anlæggelsen af vævskulturerne kan man forarbejde de totale fostre eller dele deraf. Det er anbefalelsesværdigt ikke at anvende ekstremiteterne, hovedet og huden til cellekulturen. Cellerne oparbejdes på gængs måde, f.eks. ved trypsinering, anlægges som stationær kultur, som rullekultur eller som suspensionskultur og inficeres som ovenfor beskrevet med det svækkede virus for at opnå formering. Afhøstningen af den overstående væske sker efter fra 2 til 6 dage. Til opnåelse af størst muligt udbytte foretrækkes det ifølge opfindelsen, at man flere gange afhøster de til formeringen af det svækkede virus anvendte kulturer fra kattede fostercellerne. Efter hver afhøstning dyrkes de inficerede cellekulturer videre under tilsætning af ny næringsopløsning.

Denne gentagne afhøstning fortsættes, indtil cellerne er udtømt, og det har vist sig, at dette almindeligvis sker, når man ifølge opfindelsen til formeringen af det svækkede virus anvender stationære kulturer fra kattede fostercellerne og afhøster disse mindst 4-6 gange eller anvender rullekulturer fra kattede fostercellerne og afhøster disse mindst 20-25 gange. Ved den sidste oparbejdning kan cellerne ødelægges, f.eks. ved dybfrysning eller ultralydbehandling, til udvinding af et større udbytte.

Det materiale, der fremkommer ved oparbejdningen af formeringskulturen, kan oparbejdes til en vaccine på den gængse måde. Det er anbefalelsesværdigt at tilsætte en stabilisator, f.eks. gelatine, kødekstrakt, pepton- eller sukkeropløsninger, især når der er planlagt en lyofilisering af vaccinen. En sådan er anbefalelsesværdig på grund af den bedre holdbarhed. Vaccinen kan imidlertid også anvendes som væskevaccine. Om ønsket er en tilsætning af et af de gængse hjælpemidler mulig.

Vaccinen kan indgives subcutant eller intramuskulært - efter opløsning i et af de hertil gængse opløsningsmidler, hvis den foreligger i lyofiliseret form. I forhold til kendte vacciner har den nedenstående fordele:

- 1) Stor renhed af antigenerne.
- 2) Ingen fremmedproteinreaktioner ved formering på homologt væv. Ingen chokreaktioner eller allergier ved gentagen indgift.
- 3) Uforandret kvalitet og renhed af de anvendte podovira, fordi formeringen sker på et ensartet, afprøvet cellesubstrat.
- 4) Hurtig beskyttelse.

Ved en række undersøgelser og afprøvninger i laboratorium og ved dyreforsøg er den her omhandlede levende vaccine mod Panleukopeni afprøvet for sine egenskaber, tålelighed, uskadelighed og virkning.

#### Forsøg og resultater

##### Uskadelighed

Afprøvningen af uskadeligheden sker på hvide mus og marsvin. 5 mus vaccineres subcutant med 0,5 ml af den genopløste vaccine hver. 2 marsvin får hver 2 ml intraperitonæalt. I et observationstidsrum på 10 dage skal forsøgsdyrene forblive sunde. Der lægges særlig vægt på uskadeligheds- og tålelighedsafprøvningen på katte. Ved kontrollerede laboratorie- og markforsøg er hidtil 962 katte, der overvejende er holdt isoleret, og 174 store katte, såsom løver, tigre og geparder, vaccineret subcutant eller intramuskulært med den her omhandlede vaccine og sædvanligvis observeret i 14 dage, for en dels vedkommende i flere uger. Foruden kontrollen af lokale og almene reaktioner er der også foretaget leukocyttællinger ved laboratorieforsøgene. Herved har det vist sig, at vaccinen tåles godt. Heller ikke vaccinationen af SPF- (SPF = specificeret patogenfrie) -katte, der for en dels vedkommende er holdt isoleret i over 2 år, har givet nogen anledning til indvendinger.

Stabilitet

Til en uforandret god virkning af den her omhandlede vaccine kræves en god holdbarhed foruden virustiteren. Afprøvningen af holdbarheden sker ved konstatering af indholdet af podedvirus efter opbevaring af vaccinen ved forskellige temperaturer i op til 24 måneder efter fremstillingen. De fremkomne antigen-titre kan aflæses i tabel I.

Tabel I

Afprøvning af vaccinsens holdbarhed efter opbevaring ved forskellige temperaturer

Udgangstiter efter fremstillingen:  $10^{4,833}$  ID<sub>50</sub>/ml

Opbevaringstid	Virusindhold i ID <sub>50</sub> /ml ved opbevaringstemperaturer på				
	+37°C	+20°C	+10°C	+4°C	-35°C
1 uge	$10^{3,833}$				
3 uger	$10^{3,375}$				
1 måned	$10^{3,375}$	$10^{4,166}$			
2 måneder	$10^{1,50}$	$10^{4,375}$			
3 måneder	$10^{1,375}$	$10^{4,375}$	$10^{4,833}$	$10^{4,833}$	
4 måneder	Ingen virus	$10^{4,166}$			
6 måneder		$10^{3,50}$	$10^{4,833}$	$10^{4,625}$	$10^{4,833}$
9 måneder		$10^{3,50}$	10		
12 måneder		$10^{3,5}$	$10^{4,625}$	$10^{4,833}$	$10^{4,833}$
18 måneder		$10^{2,625}$	$10^{4,625}$	$10^{4,833}$	$10^{4,833}$
24 måneder		$10^{2,625}$	$10^{4,5}$	$10^{4,833}$	$10^{4,833}$

### Virkning og tålelighed

Efter afprøvning af indholdet af levende vaccine ved virustitrering i cellekulturen afprøves det her omhandlede produkt ved en række immuniseringsforsøg på katte. Ved gennemførelse af forsøg med indkøbte katte må man tage hensyn til den vide udbredelse af Panleukopeni-viruset og andre felidepatogene fremkaldere ved et tilsvarende karantæneophold. For at undgå fremmedinfektioner og opnå eksakte forsøgsresultater er det hensigtsmæssigt at anvende specificeret patogenfrie katte, de såkaldte SPF-katte.

### Dyreforsøg nr. 1

Ved et første dyreforsøg afprøves vaccinen virkning og tålelighed på 6 SPF-katte. Af kattene, der er anbragt sammen i et isolationsanlæg, vaccineres 4 subcutant med vaccinen. 2 katte forbliver som uvaccinerede kontroldyr. Foruden en afprøvning af den almene sundhedstilstand lægges der især mærke til, om der efter indgift af vaccinen indtræder en signifikant sænkning i leukocytværdierne i forhold til ikke-vaccinerede katte. Dette er ikke tilfældet ved det foreliggende og ved yderligere forsøg. Virkningen afprøves serologisk ved antistofmåling og påfølgende belastningsinficering. Resultatet af denne afprøvning gengives sammenfattet i tabel II. Af denne tabel kan det ses, at kattene er Panleukopeni-modtagelige forud for vaccinationen. 2 uger senere er de vaccinerede katte allerede serologisk immune og kan belastes, kontroldyrene derimod forbliver beskyttelsesløse og bukker under for infektionen.

Tabel II

Afprøvning af vaccinen for virkning på SPF-katte

Kat nr.	PL-antistof- titer før vaccinationen	Vaccineret med	Klinisk forløb indtil 14 d.p.v.	PL-antistof- titer ND <sub>50</sub> /ml 14 d.p.v.	Belastnings- infektion	Resultat af belastningen
59	0	Vaccine ifølge	O.B.	681		O.B.
62	0	opfindelsen à	O.B.	1.466	à 1 ml pr.	O.B.
65	0	1 dosis = 1 ml subcutant	O.B.	1.466	kg legemsvægt patogent	O.B.
67	0		O.B.	3.162	PL-virus	O.B.
61	0	Kontrol dyr	O.B.	0	peroralt	kr. +
64	0		O.B.	0		kr.

8

Tegnforklaring:

d.p.v. = dage efter vaccinationen

O.B. = uden særpræg

kr. = syge af Panleukopeni

kr. + = syge og døde af Panleukopeni

PL = Panleukopeni

ND<sub>50</sub> = 50%'s neutraliserende slutværdi

147033

Dyreforsøg nr. 2

Vacciner, der indeholder levende apatogene Panleukopeni-vira, fører som regel til en hurtig vaccinebeskyttelse, der først og fremmest må tilskrives interferensfænomenet. Her forhindres formeringen af patogen virus i værtscellen af vaccineviruset. Ved et forsøg med 12 unge katte afprøves, om disse allerede 72 timer efter indgiften af den her omhandlede vaccine er tilstrækkeligt beskyttet mod en belastningsinfektion. Resultatet af disse undersøgelser er gengivet i tabel III. Forsøget viser, at vaccinen er i stand til at beskytte mod Panleukopeni på kort tid - nemlig inden for 3 dage. Alle katte var ubeskyttede forud for vaccinationen. 3 dage senere modstod de vaccinerede dyr allerede en belastningsinfektion med patogen Panleukopeni-virus. Ved hjælp af en daglig leukocytoptælling, der foretages efter belastningsinficeringen, og som strækker sig over 2 uger, konstateres det, at kattene er forblevet yderst sunde og ikke viser nogen signifikant leukocytnedgang. De udgangs- og minimumværdier, der er konstateret under forsøgets varighed, er indført i tabel III. En leukocytnedgang til under  $2.000/\text{mm}^3$  er almindeligvis et karakteristisk sygdomstegn for Panleukopeni. De ikke-vaccinerede kontrolkatte bliver mere eller mindre alvorligt syge af Panleukopeni, idet 4 af 6 dyr bukker under for infektionen.

Tabel III

Afprøvning af vaccinsens virkning 72 timer efter vaccinationen

Kat nr.	PL-antistof før vacci- nationen	Vaccineret med	Belastning 72 timer ef- ter vaccina- tionen	Resultat af belastningsinfektionen		
				Almen- befindende	Udgangsværdi	Minimumværdi
				Leukocytværdier indtil 2 uger p.v.		
268	0			O.B.	13.400	10.200/mm <sup>3</sup>
598	0			O.B.	20.000	10.600/mm <sup>3</sup>
599	0	Vaccine ifølge opfindelsen å		O.B.	12.100	5.600/mm <sup>3</sup>
602	0	1 dosis = 1 ml	å 1 ml =	O.B.	14.600	10.300/mm <sup>3</sup>
604	0	subcutant	100 ID <sub>50</sub> pr.	O.B.	11.300	10.100/mm <sup>3</sup>
606	0		kg legemsvægt	O.B.	18.800	10.200/mm <sup>3</sup>
269	0		patogent PL-	kr.	11.400	600/mm <sup>3</sup> +
600	0		-virus	kr.	10.100	5.700/mm <sup>3</sup> +
601	0		peroralt	kr.	13.200	1.200/mm <sup>3</sup> +
605	0	Kontrol dyr		kr.	12.300	1.200/mm <sup>3</sup> +
603	0			kr.	10.600	4.200/mm <sup>3</sup>
607	0			kr.	15.800	3.800/mm <sup>3</sup>

O.B. = uden særpræg

kr. = syg af Panleukopeni

+ = død af Panleukopeni

ID<sub>50</sub> = 50% 's inficerende dosis

Dyreforsøg nr. 3

Ifølge dyreforsøg nr. 2 beskytter den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede vaccine katte mod sygdom af Panleukopeni (PL) allerede 3 dage efter vaccinationen (3 d.p.v.). For at konstatere om den samme vaccine også giver beskyttelse mod PL allerede før den 3. d.p.v., gennemføres det nedenfor beskrevne forsøg.

16 katte, der er modtagelige for Panleukopeni, vaccineres hver med 1 dosis af vaccinen og opdeles i 4 grupper med 4 dyr i hver. En gruppe deraf belastes allerede umiddelbart efter vaccinationen, de andre grupper successivt med 1 dags mellemrum med patogen Panleukopeni-virus, 6 ubehandlede kontrolkatte inficeres på 3. d.p.v. sammen med den sidste gruppe. Som det fremgår af tabel IV, viser dette forsøg, at vaccinen allerede 1 dag efter vaccinationen er i stand til at beskytte en del af de vaccinerede katte mod en sygdom af Panleukopeni. Af fire katte i den pågældende gruppe bliver kun 1 dyr sygt af Panleukopeni og dør, de andre 3 dyr forbliver sunde.

Af de dyr, der er belastet 2 dage efter vaccinationen, har kun 1 af 4 katte en ringe nedgang i leukocyttallet (til 4.200 hhv. 5.100/mm<sup>3</sup>) på 4. og 5. dagen efter inficeringen. De katte, der er inficeret 3 dage efter vaccinationen, overstår belastningen uden reaktion.

Af kontrolkattene dør alle af Panleukopeni.

Yderligere enkeltheder kan udledes af tabel IV.



Dyreforsøg nr. 4

Til afprøvning af beskyttelsesvarigheden gennemføres et yderligere forsøg med SPF-katte, der holdes i streng isolation. Af 10 SPF-katte får 8 hver en dosis af vaccinen subcutant. De to ikke-vaccinerede kontrolkatte anbringes i samme rum til afprøvning af udskillelsen og en eventuel videreudbredelse af podeviruset eller PL-virusmedrivning. På alle kattene udtages blodprøver til måling af antistofferne. Resultaterne fra denne undersøgelse fremgår af tabel V. Forsøget viser, at vaccinen fører til en aktiv immunitet med en antistoftiter af høj værdi, som giver de vaccinerede katte en pålidelig beskyttelse mod Panleukopeni igennem det samlede observationstidsrum. Det viser også, at kontrolkattene forbliver fri for antistoffer. Det betyder, at der i forsøgstidsrummet hverken sker en videreudbredelse af podeviruset eller en medrivning af PL-vira, som ville have ført til en naturlig stigning hos de vaccinerede dyr eller til en Panleukopeni-sygdom hos kontrollerne med en påfølgende antistofudvikling. Da forsøgskattene dagligt passes og observeres, kan det konstateres, at der under den samlede forsøgsperiode ikke optræder reaktioner, der kunne pege på en utålelighed eller skadelighed.

Tabel V

Afprøvning af beskyttelsesvarigheden på SPF-katte efter vaccination

Kat nr.	Vaccine- ret med	Panleukopeni-antistoftiter i ND <sub>50</sub> /ml												
		U p.v.	1 M p.v.	2 M p.v.	4 M p.v.	6 M p.v.	8 M p.v.	11 M p.v.	14 M p.v.	17 M p.v.	23 M p.v.	26 M p.v.		
151	hver	0	4.217	6.813	4.210	6.813	3.162	6.813	3.162	422	2.371	1.466	6.813	
152	1 dosis	0	3.162	3.162	6.813	3.162	3.162	3.162	3.162	1.466	3.162	3.162	3.162	
154	(= 1 ml)	0	3.162	6.183	1.466	4.217	1.466	*						
155	vaccine ifølge	0	4.217	14.660	6.813	3.162	2.371	4.217	4.217	316	422	1.466	4.217	
156	opfin-	0	4.217	4.217	4.217	3.162	2.371	3.162	3.162	1.466	1.466	3.162	3.162	
157	delsen	0	3.162	6.813	4.217	3.162	3.162	4.217	3.162	2.371	3.162	6.813	6.813	
158	subcu- tant	0	3.162	6.813	14.660	4.217	6.813	4.217	14.660	3.162	3.162	6.813	6.813	
159		0	14.660	23.710	23.710	4.217	2.371	6.162	6.813	2.371	4.217	4.217	6.813	
150	Kon-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
160	trolldyr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

U p.v. = uger efter vaccinationen

\* = katten dør ved hjertepunktur

M p.v. = måneder efter vaccinationen

+ = død af årsager uden forbindelse med forsøget

Eksempel1. Fremstilling af en kultur af kattefosterceller

En drægtig kat dræbes smertefrit, og fostrene tages ud under sterile betingelser. Fra et foster fjernes hoved, ekstremiteter og hud, og det resterende legeme deles i stykker på ca. 2 - 4 mm med en saks.

Stykkerne anbringes i en 0,25%'s trypsinopløsning og opvarmes til 37°C under omrøring. Med intervaller på ca. 10 - 20 minutter hældes trypsinopløsningen med de deri indeholdte, suspenderede celler fra og erstattes med en ny trypsinopløsning.

6 ml af det afhældte celledsediment opslættes i en 1:300-fortynding i et medium med følgende sammensætning:

10% Eagle's medium (10-dobbelt)

10% fåre- eller kalveserum

2% lactalbuminhydrolysat (5%'s)

1 % NSP-opløsning (neomycin-streptomycin-penicillin

50  $\gamma$ /ml hhv. 20.000 IE/ml)

2% natriumhydrogencarbonat (5%'s)

bidestilleret vand til 100%.

Blandingen anbringes i en kulturkolbe og holdes på 37°C.

Den 2. 4. og 7. dag fornyes næringsopløsningen. Den 10. dag hældes næringsopløsningen fra cellerne og erstattes med en opløsning, der indeholder 95% af et trypsineringsmedium, 1% af en 1%'s opløsning af dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat, 1% af en 1%'s trypsinopløsning og 3% af en 5%'s natriumhydrogencarbonatopløsning.

Trypsineringsmediet indeholder

1 liter bidestilleret vand

7,27 g natriumchlorid

0,36 g kaliumchlorid

0,91 g dextrose

I denne opløsning opløser celledsamlingerne sig i enkeltceller eller mindre grupper. De på denne måde fremkomne celler kultiveres flere gange på den ovenfor beskrevne måde.

## 2. Fremstilling af Panleukopeni-udsåningsviruset

En kat inficeres med patogen Panleukopeni-virus, der er isoleret fra en kat, der er blevet syg og død af Panleukopeni, og dræbes 7 dage senere i alvorligt syg tilstand med en leukocytværdi på  $200/\text{mm}^3$ . Nyrrerne tages ud og behandles som ovenfor beskrevet i en 25%'s trypsinopløsning til udvinding af en cellesuspension. Den fremkomne virussuspension sedimenteres, og sedimentet suspenderes i forholdet 1:300 i et kulturmedium med følgende sammensætning:

- 52,2% Hanks' medium
- 5,8% lactalbuminhydrolysat
- 20,0% "Tissue Culture Medium 199"
- 20,0% kalveserum
- 1,0% natriumhydrogencarbonat (5%'s)
- 1,0% NSP-opløsning.

Suspensionen holdes ved  $37^{\circ}\text{C}$ . Derved sker der en formering af Panleukopeni-viruset i cellerne. Viruset kan påvises ved overføring af den overstående kultur på sunde katte.

Viderekultiveringen af viruset sker på følgende måde: Nyrrer udtages fra sunde katte og trypsineres og suspenderes i næringsopløsning på den ovenfor angivne måde. Når cellemåttens er næsten 75% udvokset, podes den med den virusholdige overstående væske fra Panleukopeni-viruskulturen.

Til dette formål blandes den overstående væske med frisk næringsmedium i forholdet 1:10, og den påføres som lag over cellerne. Efter 4 dage hældes den overstående væske af, der indeholder det formerede Panleukopeni-virus. Efter mindst 80 ganges gentagelse erstattes de hidtil anvendte kattenyreceller med en permanent kattenyrecellestammekultur ifølge Crandell, og passagerne gentages yderligere 17 gange.

Til kultiveringen af stabile kattenyreceller anvendes følgende medium:

- 10 % Eagle's medium
- 10 % kalveserum
- 1,5% natriumhydrogencarbonat (5%'s)
- 1,0% NSP-opløsning
- bidestilleret vand til 100%.

Ved viruspodningen reduceres serumandelen til 3%.

Efter den 103. passage har viruset mistet sin patogenitet, men beholdt sine gode immuniserende egenskaber. Det kan anvendes til fremstillingen af en vaccine.

### 3. Fremstilling af vaccinen

En kattefostercellekultur, der er formeret ifølge 1., suspenderes i et medium med nedenstående sammensætning:

- 10% Eagle's medium (10-dobbelt)
- 10% kalveserum
- 2% lactalbuminhydrolysat (5%'s)
- 2% natriumhydrogencarbonat (5%'s)
- 1% NSP-opløsning
- 75% bidestilleret vand.

Efter 1 - 2 dage fornyes næringsopløsningen. Når celle-måttten er 50 - 75% udvokset, pipetteres en 10%'s virussuspension, der er fremstillet ifølge 2., på cellekulturen.

Efter 4 dage hældes den virusholdige overstående væske fra, og cellekulturen kultiveres videre under tilsætning af ny næringsopløsning. Den overstående væske har en virustiter på ca.  $10^5$  ID<sub>50</sub>/ml. Denne overstående virusvæske forarbejdes på kendt måde til en vaccine ved tilsætning af en stabilisator med følgende sammensætning:

- 4 dele gelatine-bouillon, 2%'s
- 1 del glucose, 50%'s

Vaccinen påfyldes 3 ml valsekantampuller i portioner på 1 ml, frysetørres og lukkes i vakuum.

Virusformeringen kan også gennemføres i rulle- eller suspensionskulturer på den ovenfor beskrevne måde.

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til fremstilling af en vaccine mod Panleukopeni hos felider, ved hvilken fremgangsmåde et patogent Panleukopeni-virus svækkes ved passager gennem kattenyreceller, k e n d e t e g n e t ved, at man foretager mindst 80 passager på kattenyrecellerne og dernæst yderligere mindst 18 passager på permanente vævsceller fra felider eller mustelider, hvorefter man formerer det på denne måde fremkomne, svækkede virus på kattefosterceller og oparbejder det på i og for sig kendt måde til en vaccine.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man flere gange afhøster de til formeringen af det svækkede virus anvendte kulturer fra kattefostercellerne.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at man til formeringen af det svækkede virus anvender stationære kulturer fra kattefostercellerne og afhøster disse mindst 4-6 gange.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at man til formeringen af det svækkede virus anvender rullekulturer fra kattefostercellerne og afhøster disse mindst 20-25 gange.

Fremdragne publikationer:

NO patent nr. 111029.