



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

199 365

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 09 12 76
(21) PV 8061-76

(51) Int. Cl. G 12 N 5/00

(40) Zveřejněno 31 10 79
(45) Vydáno 01 11 82

(75)
Autor vynálezu KORYCH BOHUSLAV doc. MUDr. CSc., PRAHA

(54) Adjuvantní inaktivovaná tkáňová vakcína proti Aujeszkyho chorobě a způsob její výroby

1

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

Virus Aujeszkyho choroby (AD), 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 vede ke hromadným ztrátám a způsobuje značné ekonomické ztráty, zejména u selat a norků.

Rezistence proti virovým infekcím, kromě faktorů podmiňujících přirozenou rezistenci, je dána přítomností protilátek neutralizujících chorobnost viru vyvolávat 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 obracejících se ve složení buněčných povrchů a způsobu metabolismu, přítomnosti nespecifických inhibitorů a jiných nespecificky působících mechanismů a patogenese příslušného infekčního onemocnění.

Virové infekce předpokládající činnost viru k cílovému orgánu krví jsou úspěšně ovlivnitelné cirkulujícími protilátkami, v ostatních případech se předpokládá účast imunitních

199 385

mechanismů shrnovaných pod pojem buňkami zprostředková imunita.

V aktivní imunizaci proti virovým infekcím je zásadní podmínkou aplikace určité minimální antigenní masy vhodnou cestou, která by vyvolala dostačující protilátkovou odpověď, přičemž virové antigeny musí mít zachovány složku podmiňující indukci syntézy protilátek, schopných neutralizovat rozvoj infekčního onemocnění. Předpokládá se, 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 částice 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 neuraminidase mýrovirů.

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

V procesech o prevenci Aujeszkovy choroby (AD) byla publikována řada výsledků hledajících možnost prevence AD účinnou imunizací.

Omezení úmrtnosti prasat ve stádech zamořených virem Aujeszkovy choroby (AV) pasivně podanou protilátkou ve formě imunního séra (KOYNOK J., GRECZI E.: Serum Aujeszky's disease in sucking pigs. Acta vet. hung. 1957, 7:423 až 427), nebo gamaglobulinem (LUKASHEV I.I., NIKIZINA V.S., Prophylactic and therapeutic properties of gamma globulin in Aujeszky's disease Veterinaria (Moskva) 1958, 35/9 : 48 až 50), ukázale v terénních podmínkách na možnost ovlivnění průběhu nemoci imunizací. Nicméně v tuto dobu nebyla k dispozici účinná očkovací látka ani inaktivovaná ani živá a platil náser, formulovaný (MANNINGER R., MOCZY J.: Traité des maladies internes des animaux domestiques. Paris: Vigot Freres 1959, PP. 457 až 464), že aktivní imunizace proti AD není možná.

Pokusy o přípravu vakcíny proti AD byly zaměřeny několika směry:

- a) vypracování účinné inaktivované vakcíny, popřípadě s adjuvancemi,
- b) vypracování živé avirulentní vakcíny selekcí avirulentních mutantů,
- c) získání přirozeného, mále virulentního kmene z přirozených ohnisek infekce AD,
- d) vypracování vakcíny za použití virulentního viru, který by se v organismu imunizovaného jedince nešířil, nevedl k onemocnění.

Byla učiněna řada pokusů k přípravě inaktivované vakcíny. Formalizovaná vakcína bez velké účinnosti pro prasata byla připravena (KOOH A., ABRAHAM E.: Immunisationsversuche mit dem Aujeszkyschem Virus. Acta vet. Hung. 1952, 2:270 až 279), (ZUFFA A.: Versuch zur Immunisierung von Laboratoriumstieren und Schweinen mittels Formaldehyd - und - UV Strahlen - inaktivierten Aujeszky-virus. Arch.exp. Vet. med. 1963, 17:595 až 613). Ochrana prasat před fatálními důsledky infekce navodila formalizovaná vakcína

adsorbovaná na aluminiumhydroxyd (AIRAPETIAN V.G., KHACHATRYAN A.B., CHBANYAN M.S., ABELIAN K.E.: Immunologic properties of inactivated vaccines against Aujeszky's disease. Veterinaria (Moskva) 1969, 46:34 až 36), (SOLOMKIN P.S.: Review of the use of aluminum hydroxide formalized vaccine against Aujeszky's disease Veterinaria (Moskva) 1955, 32/12:11 až 14) a formulovakcína adsorbovaná na aluminium hydroxyd a po adsorbci upravená saponinem (FRESCURA T., FIORINI A.: Controlle di efficacia di un vaccine contro la pseudorabia (Malattia di Aujeszky) Veterinaria Italiana 1971, 22/7-8:374 až 393). Tato vakcína podle údajů autorů vedla již po jednorázovém i.m. podání k serokonverzi, zabránila výskytu viru ve faringu a v krvi a infekci po i.m. challengey virulentním virem AD.

V pracech (AIRAPETIAN V.G., KHACHATRYAN A.B., CHBANYAN M.S., ABELIAN K.E.: Immunologic properties of inactivated vaccines against Aujeszky's disease. Veterinaria (Moskva) 1969, 46:34 až 36) a (FRESCURA T., FIORINI A.: Controlle di efficacia di un vaccine contro la pseudorabia (Malattia di Aujeszky) Veterinaria Italiana 1971, 22/7-8 : 374 až 393) jsou též uvedeny dávky virového antigenu vyjádřené v TCID₅₀. (AIRAPETIAN V.G., KHACHATRYAN A.B., CHBANYAN M.S., ABELIAN K.E.: Immunologic properties of inactivated vaccines against Aujeszky's disease. Veterinaria (Moskva) 1969, 46:34 až 36) použili virus ve formě infekčního média z přímokultur ledvin 5 až 15 denních králíků, ve 224 pasáží (titr 10^{6,5} TCID₅₀/ml). Imunizační dávka aplikovaná v objemu 5 ml subcutánně pro prase obsahovala minimálně 10^{7,2} TCID₅₀ viru.

(FRESCURA T., FIORINI A.: Controlle di efficacia di un vaccine contro la pseudorabia (Malattia di Aujeszky) Veterinaria Italiana 1971, 22/7-8 : 374 až 393) použili čerstvě izolovaný virus v 6. pasáží na stabilní linii vepřových ledvinových buněk (PK - 15) mající titr 10^{7,5} TCID₅₀/ml infekčního média. Autory vypracovaná formolem inaktivovaná na hydroxid hlinitý adsorbovaná vakcína byla aplikovaná s.c. v odstupňovaných dávkách 10, 5, 2,5, 1,25, ml (maximum 10^{8,5} TCID₅₀ viru pro dávku).

I když v práci (AIRAPETIAN V.G., KHACHATRYAN A.B., CHBANYAN M.S., ABELIAN K.E.: Immunologic properties of inactivated vaccines against Aujeszky's disease. Veterinaria (Moskva) 1969, 46:34 až 36) dále není uvedeno vyhodnocení titrů protilátek zvířat po vakcinaci z obou prací lze vyvodit, že inaktivace viru formolem nemění antigenní strukturu AV a hydroxyd hlinitý se uplatňuje jako účinné adjuvans.

Na aluminium hydroxyd adsorbovaný virus ovlivněný saponinem (BERBINSCHI C., PAPADOPOL Maria: Valeur immunogène d'un vaccin inactif contre la, adae d'Aujeszky chez la beuf, le monton, le porc et le chien. Archiva vet. 1967, 3:59 až 69) se neukázal vakcínou dostatečně bezpečnou. Použití tohoto typu vakcíny vedlo u imunizovaných prasnic k potratům, poškození plodu, jejich munifikaci a hynutí mladých selat (POPOV A., TOCHENTCHEV I.: Utilisation des vaccins vivants contre les maladies á virus des animaux en Bulgarie Bull. Off. int. Epizoot, 1965, 64:195-202), (TONEVA V.: Les vaccins vivant utilisés en Bulgarie contre la maladie d'Aujeszky, Bull. Off.int.Epizoot.

199 385

1965, 64:203 až 207). Nicméně z prací publikovaných (BERBINSCHI G., PAPADOPOL Maria : Valeur immunogène d'un vaccin inactivé contre la maladie d'Aujeszky chez la beuf, le monton, le porc et le chien. Archiva vet. 1967, 3:59 až 69) vydává možnost eliminace AV ze zaměřených chovů prasat soustavnou imunizací a je navrhováno v takovýchto chovech po plošném proočkování dále imunizovat jen chovné prasnice pro přerušení možnosti přenosu viru z prasnice na sele pasivně přenesenou protilátkou (BERBINSCHI G., PAPADOPOL Maria, MARTA M.: Untersuchung über der prophylatischen Wert der inaktivierten Aujeszky-vakzine in Schweinesuchtbetrieben. Archiva vet. 1968, 5:107 až 114).

Za neinaktivovanou je pokládána i vakcína vypracovaná (LYSENKO I.P., TSYMBAL A.N., KULBACHNAJA M.Z., Preparation and laboratory trials of UNIEW Aujeszky 's disease virus vaccine, alone and combined with swine fever vaccine. Veterinarija (Kijev) 1965, 7 : 38 až 43), ve které byl virus podroben inaktivaci krystalovou violetí a účinnost vakcíny byla potencována alumiinem hydroxydem. (BASKERVILLE A., McFERRAN J.B., DOW G.: Aujeszky 's disease in pigs. The Veterinary Bulletin 1973, 43/9:465 až 480) nepokládá inaktivaci AV krystalvioletí za pravděpodobnou, neboť (MAŠIČ M., PETROVIČ M.: Kann durch Kristallvioletvakzine gegen Schweinepest die Aujeszky'sche Krankheit übertragen werden ? Zbl.Bakt.Parasitkde. 1962, I.Orig. 185:145 až 154) ukázali na resistenci AV k účinku krystalové violetí.

Krystalvioletová adsorbátová vakcína byla připravena a ověřena (NEJDALKOV S., STOITSCHEV S., RIBAROV B., STILOVA N. : Versuche zur Herstellung von Vakzine gegen die Aujeszky'sche Krankheit aus inaktivierten Virus. I.Mitteilung Arch. exp. Vater. med. 1968, 22:499 až 507), (NEJDALKOV S., STILOVA B., RIBAROV B., TABAKOV B. : Zur Immunität von Gangferkeln nach Impfung mit Adsorbatkristallviolettvakzine gegen die Aujeszky'sche Krankheit Arch. f. Exper. Vet.med. 1972, 26/2:257 až 262). Vakcínou indukované protilátky u selat 10 až 20 dnů stáří paradoxně dosahovaly vyšších titrů u jedinců s již existujícími titry, zatímco u jedinců bez prokazatelných protilátek nedochází k jejich produkci. Podle zkušeností (ARNAUDOV H.: Immunity and antibody dynamics in pigs inoculated with Aujeszky 's ethanel vaccine. I.Influence of naturally acquired antibodies. Veterinärmedizinische ki Nauki 1973, 10/5:83 až 87) preexistují kolostrální protilátky zabrání uplatnění se virovému antigenu a k prolátkové odpovědi zpravidla nedochází.

AV inaktivovaný HNO_2 se ukázal schopný po dvou až třech revakcinacích i.v. cestou dávkou kolem 10^8 TCID 50 AV vyvolat u králíka tvorbu protilátek v titrech 32-128, které ochránily zvířata před challengí 300 TCID 50 homologního viru (IVANIČOVÁ S., ŠKODA R., MAYER V., SOKOL F.: Inactivacion of Aujeszky 's disease (pseudorabies) virus by nitrous acid. Acta Virologica 1963, 7:7 až 15). Podkožní podání viru králíkům bylo až na výjimku bez efektu na protilátkovou tvorbu. Účinnost na prasatech ověřovaná nebyla a lze těžce předpokládat, že imunizační schema vyžadující četné revakcinace by byly prakticky použitelné.

Bez účinku se ukázala vakcína připravená UV inaktivací AV (BELÁDÍ I., IVÁNOVIC G.: Immunisierung von Laboratoriumstieren mit dem Virus der Aujeszkyschen Krankheit nach dessen Inaktivierung mit UV Strahlen. Acta Microbiol. Hung. 1954, 2:151 až 160).

V laboratorním pokusu na morčatech a králících a třech prasnicích byla ověřena vakcína proti AD připravená fotoinaktivací AV pomnožené na primokulturách vepřových ledviných buněk methylenovou modří s následnou expozicí evětlu (BORGÉN H.C., ESPENSEN L.: Immunising effect of photoinactivated pseudorabies virus. Zbl. Bakt. Parasitkde I. Orig. 1970, 214:13 až 16). Inaktivovaný virus byl aplikován s.c. v dávce 50 ml pro dosi s obsahem viru 5×10^8 TCID₅₀. Primevakcinace vedla k vzestupu protilátek $\approx 0,5 - \log_2$ ND₅₀ na 0,9, resp. 1,2 u dvou imunizovaných prasnic, 14 dnů po revakcinaci na 4,9 a $6,2 - \log_2$ ND₅₀ (což odpovídá zhruba titrům 32 a 64). Challenge dávkou LD 10 LD₅₀ králících (200 TCID₅₀) virulentního viru vedla k anamnestické reakci se stoupnutím titrů protilátek na 9,9 a $6,2 - \log_2$ ND₅₀ (cca 1024 a 64) bez známek klinického onemocnění. Kolostrální protilátky ochránily před stejnou challengovací látkou AV i selata imunizovaných prasnic, zatímco jak kontrolní prasnice tak i její selata měly klinicky manifestní známky onemocnění, kterému selata podlehla.

Výrazný účinek fotoinaktivovaného AV projevující se titry protilátek u prasat ukazuje v porovnání s jinými anaktivovanými vakcínami současně alespoň dvě skutečnosti: 1). Fotoinaktivace je velice šetrná inaktivační procedura ponechávající virový povrch beze změn. 2) Užitečná dávka viru pětikrát deset na osmou pro dosi subkutánním podáním představuje dostatečně účinný antigenní stimulus.

Nedostatkem této vakcíny je dávkování (50 ml s.c. pro dosi a určitá obtížnost přípravy vakcíny ve velkoprovozních podmínkách (1000 dávek = 50 tis. ml.)).

Etanulen inaktivovaný virus AD ve směsi s parafinovým olejem (HARALAMBIEV H., MERMERSKI K., STOEV I., SIMONOV S., IOTOV M.: Investigating the immunogenicity of alcohol-inactivated Aujeszky's virus on sheep. C.r. Acad. bulg. Sci. 1966, 19:441 až 444) byl použit pro imunizaci ovcí, hovězího dobytka i prasat. Zkušenosti s touto vakcínou byly shrnuty po tříletém období pokusů (HARALAMBIEV H., MERMERSKI K., SIMONOV S., IOTOV M., STOEV I., DIMITROV K., NIKOLOV I.: Untersuchungen über die Immunogenität der mit Äthanol inaktivierten Vakzine gegen die Aujeszkysche Krankheit. Arog. exp. Vet. med. 1967, 21: 501 až 507). Vakcína byla podkládána za účinnější než formalizovaná vakcína podle (SOLOMKIN P.S.: Review of the use of aluminium hydroxide formalized vaccine against Aujeszky's disease. Veterinarija (Moskva) 1955, 32/12:11 až 14)., (BOYADZHIEV S., GENEV Kh., GENOV I., VACHEV B., STOYANOV V., KALCHEV I.: Studies on Aujeszky's disease. I. Comparison of vaccines. Vet. med. Nauki (Sofia) 1967, 4/9:19 až 26) z porovnaných tří typů inaktivovaných vakcín - alkoholem inaktivované, formol-adsorbátové a saponinadsorbátové pokládá alkoholem inaktivovanou vakcínou proti AD za nejlepší. (SIMONOV S., VASILEV V., YOTOV M., MERMERSKI K.: Improvement of ethanol vaccine against Aujeszky's disease I. Production of an ethanol-

199 385

-saúpnin vaccine. Veterinaromeditsinsku Nauki 1971, 8/7:23 až 29), se pokusili v ethanolu inaktivované vakcině nahradit parafinované adjuvans saponinem. Titry neutralizačních protilátek u prasat imunizovaných touto vakcinou ve dvou dávkách dosahují 20. den po revakcinaci hodnot 8 s přetrváním po 4 měsíce, po 6 měsících 4 nebo 2 (SIMONOV S., YOTOV M., VASILEV V., MERMERSKI K. : Attempts to improve the ethanol vaccine against Aujeszky's disease. II. Storage life and duration of immunity Veterinarskomeditsinski nauki (Sofia) 1972, 9/5:69 až 73).

Účinnost ethanolové vakciny s parafinovým olejem jako adjuvans (HARALAMBIEV H., MERMERSKI K., SIMONOV S., YOTOV M., STOEV I., DIMITROV K., NIKOLAV I. : Untersuchung über die immunogenität der mit ethanol inaktivierten Vakzine gegen die Aujeszky'sche Krankheit. Arch. exp. Vet. med. 1967, 21:501 až 507), ověřovaná na selatech s přítomnými protilátkami v nízkých titrech je těžko hodnotitelná, neboť nelze vyloučit, že vakcinace se uplatňovala jako sekundární podnět. Tomuto názoru by odpovídala i úvaha autorů a odlišné protilátkové odpovědi selat různého stáří s nízkým titrem protilátek.

(GENOV I., REZASHKA A., GENOVA A. : Produktion of propiolactone - inactivated vaccine against Aujeszky's disease from the "Russe" vaccinal strain. Vet.med.nauki (Sofia) 1967, 4/10:35 až 40) učinili pokus o přípravu absorbátové vakciny s šetrně inaktivovaným virem AD beta - propiolaktonem. Byl kladen důraz na vhodnou minimální účinnou dávku inaktivačního činidla (0,05 %). Účinnost vakciny byla hodnocena na ovcích a prasatech. I když množství virového antigenu ve vakcině bylo malé (maximum 10^5 TCID₅₀ pro dávku), autoři prokazovali po primovakcinaci ovcí i prasat shodné titry 16, po revakcinaci 32.

Význam dostatečně velkého antigenního impulsu a potenciální účinek adjuvans je naznačen v práci (ŠKODA R., WITTMANN G., Die immunisierung von Schweinen mit Vakzinen aus inaktivierten Aujeszky-Virus. Zbl.Vet.med.1973, Heft 2:127 až 138). Autoři konstatovali slabou účinnost doposud vypracovaných inaktivovaných vakcin. Pokusili se koncentrovat virus, získaný z tkáňových kultur buněk BHK 21, takže konečné množství virového antigenu ve vakcině odpovídalo dávce 5×10^9 TCID₅₀ v objemu kompetní vakciny. Byly porovnány v účinnosti 2 dávky viru, a to 5×10^9 a 10^9 TCID₅₀, které byly aplikovány i.n. nebo s.c. s diethylaminoethyl-dextranem (DEAE-D) a dále byly srovnány se do účinnosti s virem inaktivovaných stejnou procedurou aplikovaných bez adjuvancií a s Freudovým ikompletním adjuvans. Z pokusů vyplynulo, že EEI inaktivovaný virus indukuje protilátky, které po 4 týdnech dosahují neutralizační titry 2 a 4. Inkompletní adjuvans nepotencovalo antigenní vlastnosti užitého viru. DEAE-E v porovnání proti samotnému viru a viru v ikompletních adjuvanciích vedl k dřívější a vyšší protilátkové odpovědi (8 až 32). Po primovakcinaci se udržují titry 1 až 4 po dobu až 15 týdnů, revakcinace vede ke zvýšení titrů na 9 až 32, ale protilátky poklesávají stejně rychle jako po primární odpovědi, takže 80 až 105. den resistance na infekční zátěž byla prokazatelná u 13. vakcinovaných selat z 20.

Autoři uzavírají, že revakcinace nevedla ke stupňování imunity. Současně je pozoruhodné i sdělení, že u zvířat očkováných tímto typem vakcíny kontaktní infekce virulentním virem vylučovaným horním respiračním traktem artefiválně infikovaných zvířat nevedl k typické sekundární odpovědi (anamnestické reakci), a že titry protilátek začínají stoupat po 4 až 7 dnech (ŠKODA R., JAKUBÍK J.: Immunisierung von Schweinen mit Aujeszky-virus-Vakzinen, hergestellt aus zwei Plaquevarianten des Virus. Zbl.Vet.med. 1974, B 21, 234 až 241) autoři uvádějí v diskusi do vztahu časový odstup revakcinace od primodávky v k přetrvání protilátek.

Z uvedeného přehledu literatury o možnosti použití inaktivované vakcíny k prevenci a tlumení AD je možné se pokusit o některé zobecnění.

1. Předpokladem účinnosti virového antigenu je šetrná inaktivační procedura, ponechávající povrchové struktury virionu bez poškození (BORGES H.H., ESPENSEN L. : Immunizing effect of photoinactivated pseudorabies virus. Zbl. Bact. Parasitkde I. Orig. 1970, 214:13 až 16).

2. Vakcína musí představovat dostatečný antigenní impuls, který je dán koncentrací viru.

3. O výsledku imunizace rozhoduje i zvolené imunizační schema (ŠKODA R., JAKUBÍK J. : Immunisierung von Schweinen mit Aujeszkyvirus-Vakzinen, hergestellt aus zwei Plaquevarianten der 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 titrem neutralizačních protilátek, vakcínám attenuovaným (BORGES H. C., ESPENSEN L. : Immunizing effect of photoinactivated pseudorabies virus. Zbl.bact. Parasitkde I. Orig. 1970, 214-12-16) bez rizika novorozenců selat vysokobřezích prasnic (BOYADZHIEV S., GENEV Kh., GENOV I., VACHEV B., STOYANOV V., KALCHEV I., : Studies on Aujeszky's disease. I. Comparison of vaccines. Vet.med.nauki (Sofia) 1967, 4/9:19 až 26), (MAŠIČ M., PETROVIČ M.: Kann durch Kristalviolettvakzine gegen Schweinepe st die Aujeszky'sche Krankheit übertragen werden, Zbl. Bact. Parasitasche . 1962, I. Orig... 185 : 145 až 154) a bez omezení jejich aplikace na ohniska infekce. V žádném případě není možné souhlasit dnes již s tvrzením (Menninger R., Moczyj : Traité des maladies internes des animaux domestiques. Papis : Vigot frères 1959, pp. 457 až 464), že aktivní imunizace proti AD není možná. Nelze souhlasit ani s názorem (Kretzschmar C., Unter suchvagen zur Epizootologie der Aujeszky'schen Krankheit beim Schwein und daraus sich ergebende Schlussfolgerungen für Prophylaxe und Bekämpfung Mh.Vet.med. 1964, 19 : 248 až 257), Žuffa A. Versuch zur Immunisierung von Laboratoriumstieren und Schweinen mittels Formaldehyd - und - UV strahlen inaktivierten Aujeszky - virus. Arch. exp. Vet.med.1963, 17:595 až 613), že inaktivovaná vakcína proti AD je neúčinná. Z uvedeného přehledu světového písemnictví vyplývá, že aktivní imunizace inaktivovanou vakcínou dokonale chrání imunizované zvíře, není vyřešena.

199 385

Uvedené nedostatky jsou odstraněny adjuvantní inaktivovanou tkáňovou vakcínou proti Auješskyho chorobě podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že je tvořena inaktivovanou mutanetou viru Auješskyho choroby CNCTC Ae 5/78 - dosahující v živném roztoku tkáňových kultur titry nejméně $10^{8,5} \text{TCID}_{50}(\text{ml})$, ve směsi se vstřebatelným adjuvans v koncentraci 6 až 8 procent. Způsob výroby této vakcíny spočívá v tom, že infekční médium vnímavých buněk tkáňových kultur, infikovaných nejméně multiplicitou 1 mutanty viru Auješskyho choroby - CNCTC Ae 5/78 - na buňku a po infekci uchovávaných při teplotě 26 až 37 °C, se odehrává v době rozvinutého virem vyvolaného poškození tkáně, s výhodou 20 hodin po infekci, tkáňová drť a virové aglomeráty se odstraní, ověří se množství - titru viru, infekční médium se inaktivuje přidáním 10 procent betapropiolaktoru do konečné koncentrace 0,05 až 0,025 procent za kontroly pH, podle výsledků titrace se upraví koncentrace virového antigenu, nejméně však do hodnoty $10^{8,5} \text{TCID}_{50}(\text{ml})$, přidají se antibiotika, adjuvans do koncentrace 6 až 8 %, směs se promíchá, čímž vznikne viskozní očkovací látka. Selektovaná mutanta viru Auješskyho choroby - CNCTC Ae 5/78 dosahuje titry přesahující $9/\log_{10} \text{TCID}_{50}(\text{ml})$ na kulturách vepřových ledvinných buněk ve formě primokultury nebo nejvhodnější stabilní linie PK. Inaktivace probíhá při 30 až 37 °C po dobu 15 až 30 minut.

Jednou z výhod je použití mutanty Herpes virus suis AV podle vynálezu, kmenu CNCTC Ae 5/78 Čs. státní sbírky typovaných kultur v Praze 10 - Vinohrady, Šrobárova 48. Tato mutanta viru Auješskyho choroby byla získána AU 1 z SVÚ Praha - Lysolaje, selekcí platů 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) schopností rychlé tvorby nekrotických ložisek v buňkách linie PK s charakteristickou morfologií,
- d) schopností dosáhnout v infikačním médiu tkáňových kultur vnímavých buněk titry přesahující 10^9TCID_{50} v ml.

Mutanta AV dosahuje na buňkách vepřové ledviny titrů vyšších než $10^{9,9} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, je možnost případného zředění infekčního média až do minimální hodnoty $10^{8,5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, zabezpečující v použitém adjuvans dostatečný antigenní impuls, vedoucí k rezistenci očkovaných jedinců, podtrženém imunizačním schématem. Účinný antigenní podnět je zajištěn velice šetrnou inaktivační procedurou, představovanou použitím betapropiolaktonu v konečných koncentracích 0,05 až 0,25 %. Imunizační účinek je podstatně zvýšen přidáním vstřebatelného lipoidního adjuvans, které kromě potenciace účinku vakcíny má výhodu v tom, že nevyžaduje nucený výsek partií jatečných zvířat, kde byla vakcína aplikována a která svou konzistencí odpovídá požadavku technických možností pro nosovou aplikaci. Kromě stimulace humorálních protilátek adjuvans kladně ovlivňuje i buňkami zprostředkovanou imunitu. Výsledek imunizace je ovlivněn vhodně zvolenou pozologií, dávkováním a revakcinací. Ověřené imunizační schéma prokázalo výhody vnitrosvalového podání očkovací látky proti podání strktně podkožnímu a do podkožního tuku, především při anamnestické odpovědi. Pro hladinu

protilátek je vhodnější revakcinace v období tří až pěti týdnů po primovakcinaci v porovnání s revakcinací po 14 dnech po vakcinaci. Revakcinace oplodněných samic např. prasnic 7 až 14 dní před porodem, vede k ochraně selat kolestrem po dobu alespoň 50 dnů po porodu, tedy v době, největší vnímavosti zvířete. Zásadní výhodou aplikace účinné inaktivované vakciny proti vakcinám živým, je možnost jejího použití v prevenci AD, především v oblastech s jejím výskytem bez rizika vnesení živého viru do stáda. Aplikace inaktivované vakciny vede k zastavení projevu infekce 3 až 5 dnů po imunizačním zákroku. Tente rychlý účinek je vysvětlitelný "boosterovacím efektem" vakciny v promořeném chovu. Jedinci nereagující na aplikaci vakciny jsou vzácnou výjimkou. Vakcína nevyvolává místní ani celkovou reakci a lze ji bez rizika použít i u vysokobřezích zvířat.

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 rozplnění výrobku.

Účinnost vakciny je zaručena alespoň šest měsíců při skladování při teplotě 3 až 7 °C.

Vakcína co do imunity byla ověřena na prasatech, morčatech, králících a myších s výsledky, které ukazují, na obecnou schopnost této vakciny indukovat tvorbu protilátek a chránit imunizované jedince před infekcí virulentním AV.

Příklad:

vakcína podle vynálezu má toto složení

infekční médium tkáňových kultur	93 dílů
aquasorb hydrofilní bezvodý	7 dílů
penicilin a streptomycin	cca 500/j/gama/ml
Fungizone	5/ug/ml

Příklad způsobu výroby 1000 ml vakciny podle vynálezu:

Earlovým roztokem s 0,5 % laktalbuminhydrolyzátem upraveným 7,5% roztokem NaHCO_3 na pH 7,6 propláchnuté rozrostlé kultury buněk PK - stabilní linie vepřových ledvin v Roux lahvích objemu 1200 ml se infikují objemem 1,0 ml virového kmene - mutanty viru Aujeszkyho choroby - CNCTC Ao 5/78.

Infikované kultury se uloží na 20 min do termostatu pro adsorpci viru na buňky a pak se převrství 100 ml udržovacího média - složeného z Earlova roztoku s 0,5 % laktalbuminhydrolyzátem, pH 7,6 po úpravě 7,5% roztokem NaHCO_3 .

Infikované kultury se inkubují při teplotě 36 až 37 °C v termostatu do doby, kdy cytophické změny jsou ve formě úplné destrukce tkáně. Zpravidla inkubace nepřekročí 48 hod.

Infekční médium je slito, takže tvoří jednu výchozí suspenzi a centrifuguje se při 5000 až 6000 rpm po 10 min. za použití úhlové hlavy centrifugy Jantzkí T 23 Supernatant-

199 385

ní tekutiny se odsají a inaktivují přidáním desetiprocentního přechlazeného vodného roztoku betapropiolaktonu do konečné koncentrace 0,05 až 0,25 %, nejvhodnější 0,15 %, tedy na 1000 ml virové centrifugované suspenze 15 ml 10% vodného roztoku betapropiolaktonu za neustálého míchání. Nádoba s virovou suspenzí po přidání betapropiolaktonu se uloží do vodní lázně 30 až 36 °C na dobu 30 minut, s úpravou pH po 10 minutách na hodnotu 7,6 přidáním Bikarbonátu. Po dobu inaktivace se virová suspenze 2 x po desetiminutových intervalech promíchá. Po ukončení inaktivace po 30 minutách se opakovaně kontroluje, popřípadě upraví pH, přidají se antibiotika penicilin a streptomycin do koncentrace 500 j., resp. gamma a Funge 120 N/ml. Za neustálého míchání nejvhodnější v mixeru nebo na vysokoobrátkové míchačce, se přidá 85 ml rozehrátého Aquasorbu k objemu 250 ml virové suspenze, vyčká se vazby suspenze na adjuvans, což se projeví zhoustnutím hmoty přibližně do 1 minuty od přidání adjuvans a dále se za neustálého míchání pozvolna přidává zbytek virové suspenze. Celková doba mísení dostačující k dokonalé homogenizaci nepřekračuje 5 minut, obvykle dostačující 4 minuty.

Adjuvantní vakcína se sterilně plní do lékových a uzavírá gumovými zátkami a kovovými objímkami. Až do té doby použití se uchovává při chladničkové teplotě 4 až 6 °C.

Účinnost vakcíny byla ověřována v pokusech na selatech, králících a morčatech za použití subkutánního a intramuskulárního podání. Nejvyšší účinnost byla prokázána na morčatech, u kterých docházelo při dodržení stejné dávky na váhovou jednotku k vysoké protilátkové odpovědi po primární vakcinaci (256 tit), nižší titry byly dosaženy na selatech (64 až 128), králíci po erimovakcinaci odpovídali jen po zvýšení dávky. Revakcinace ve všech případech vedla k protilátkové odpovědi do vysokých titrů (256 až 512 proti 1000 TCID₅₀ v neutralizačním testu na tkáňových kulturách) a současně zvířata byla resistentní na infekci 10⁵ TCID₅₀ infekčního viru aplikovaného i.m. Aplikace vakcíny králíkům byla současně testem bezpečnosti, neboť králík odpovídá smrtelným onemocněním na infekci už jednotkami Aujeszkyho viru. Užitá inaktivační procedura byla pokusem na králících prokázána jako plně dostatečná pro zbavení viru Aujeszkyho choroby infekciosity při zachované antigenicitě.

Doložení zkoušek účinnosti:

Zkoušeli se tři vakcíny, z nichž A - Adjuvantní
inaktivovaná tkáňová vakcína, B - Iyofilizát
C - další vakcína

Vakcíny byly aplikovány i.m. v následujícím množství, vždy třem králíkům:

Celá vakcinová dávka pro prase
1/2 vakcinační dávka pro prase
1/4 vakcinační dávka pro prase
1/10 vakcinační dávky pro prase
1/20 vakcinační dávka pro prase

Za 11 dní po vakcinaci byli všichni králíci revkacinováni stejnými dávkami a stejným způsobem. Za dalších 10 dnů byli králíci včetně třech nevakcinovaných kontrol infikováni virem Aujeszského choroby (kmen Bucvrest 200 pasáž) v dávce 10^5 ID₅₀ viru i.m. Po infekci byli králíci pozorováni 14 dní. Zkouška byla provedena dvakrát jako I a II titrace.

I. titrace

Vakcína	Vakcinační dávka				
	1/20	1/10	1/4	1/2	1/1
A	33	66	100	100	100
B	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0
% přežití králíků po čelenží					

II. titrace

Vakcína	Vakcinační dávka				
	1/20	1/10	1/4	1/2	1/1
A	33	33	50	100	100
B	0	0	33	33	66
C	0	0	0	0	33
% přežití králíků po čelenží					

U obou titrací bylo u vakcíny A dosaženo nejlepšího výsledku. 100 % chráněnost je zaznamenávána po celé i poloviční dávce vakcíny, zatímco další vakcíny B a C nezajistily v žádném případě imunitu všech vakcinovaných králíků. U obou pokusů ještě 5 % dávky vakcíny A chránili třetinu vakcinovaných zvířat. Kontrolní králíci uhynuli po čelenží 4 a 5 den.

Doložení zkoušky neškodnosti:

Opět byly použity tři vakcíny A, B, C, které se aplikovaly 5ti králíkům váhy 2kg v dávce rovnající se vakcinační dávce pro prase a dalším 5ti králíkům v dávce poloviční, tj.:

Vakcína A 5 cm³ a 2,5 cm³

Vakcína B 2 cm³ a 1,- cm³

Vakcína C 2 cm³ a 1,- cm³

Pozorovaná doba 21 dní.

Výsledky zkoušek neškodnosti: Vakcína A 10. den po vakcinaci uhynul 1 králík, při celé vakcinační dávce. Jako příčina úhynu byla vyloučena infekce A.ch. U ostatních vakcín rovněž v případě jednoho úhynu nebyla původcem Aujeszkyho choroba.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Adjuvantní inaktivovaná tkáňová vakcína proti Aujeszkyho chorobě, vyznačující se tím, že je tvořena inaktivovanou mutantou viru Aujeszkyho choroby - CNCTC Ae 5/78 - dosahující v živném roztoku tkáňových kultur titry nejméně $10^{8,5}$ TCID₅₀/ml, ve směsi se vstřebatelným adjuvans v koncentraci 6 až 8 %.

2. Způsob výroby adjuvantní inaktivované vakcíny proti Aujeszkyho chorobě podle bodu 1, vyznačující se tím, že infekční médium vnímavých buněk tkáňových kultur, infikovaných nejméně multiplicitou 1 mutanty viru Aujeszkyho choroby - CNCTC Ae 5/78 - na buňku a poinfekci uchovávaných při teplotě 36 až 37 °C, se odebírá v době rozvínutí, virem vyvolané poškození tkáně, s výhodou 20 hodin po infekci, tkáňová drť a virové aglomeráty se odstraní, ověří se množství - titr - viru, infekční médium se inaktivuje přidáním 10 % betapropiolaktenu do konečné koncentrace 0,05 až 0,25 % za kontroly pH, podle výsledků titrace se upraví koncentrace virového antigenu, nejméně však do hodnoty $10^{8,5}$ TCID₅₀/ml, přidají se antibiotika, adjuvans do koncentrace 6 až 8 %, směs se promíchá, čímž vznikne viskózní očkovací látka.

3. Způsob výroby podle bodu 2, vyznačující se tím, že selektovaná mutanta viru Aujeszkyho choroby - CNCTC Ae 5/78 - dosahuje titry přesahující $9 \log_{10}$ TCID₅₀/ml na kulturách vepřových ledvinových buněk ve formě primokultury nebo nejvhodnější stabilní linie - PK.

4. Způsob výroby podle bodu 2, vyznačující se tím, že inaktivace probíhá při 30 až 37 °C po dobu 15 až 30 minut.