



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

253709

(11)

(B2)

(51) Int. Cl.⁴

A 61 K 39/12

(22) Přihlášeno 27 10 83

(21) PV 7944-83

(32) (31) (33) Právo přednosti od 27 10 82
(3441/82) Maďarská lidová republika

(40) Zveřejněno 14 05 87

(45) Vydáno 15 07 88

(72) Autor vynálezu

KELEMEN MARIA dr., SZABO GÁBOR dr., SÓLYOM FERENC dr.,
FARKAS LÁSZLÓ dr., MAKÁR ANDRÁS dr., FORGÁCS ANNA dr.,
PERÉNYI TIBOR dr., BUDAPEŠT (MLR)

(73) Majitel patentu

PHYLAXIA OLTÓANYAGTERMELŐ VÁLLALAT, BUDAPEŠT (MLR)

(54) Způsob výroby inaktivované očkovací látky proti Aujeszkyho nemoci

Řešení se týká způsobu výroby inaktivované očkovací látky proti Aujeszkyho nemoci vypěstováním kmene viru Aujeszkyho nemoci na buněčné kultuře, sklizením a inaktivací viru a smísením a homogenizací inaktivovaného viru s olejovým adjuvantem, podle kterého se jako kmen viru použije virulentní, pro vepře pathogenní kmen viru Aujeszkyho nemoci "Phylaxia" OKI č. 00236/82 v množství alespoň 10^7 TKID₅₀/ml.

Výnález se týká způsobu výroby inaktivované očkovací látky obsahující adjuvant určené k ochraně proti Aujeszkyho nemoci.

Aujeszkyho nemoc, která dostala své jméno po prvním člověku, který ji popsal, Maďarovi Aladáru Aujeszky (Zbl. Bakt. Orig. 1903 I, 32, str. 353 až 357) je již dlouho známou nemocí domácích zvířat způsobující těžké ztráty. Především je napadán vepřový dobytek, zvláště mladá zvířata.

S postupujícím věkem selat jsou onemocnění končící smrtí méně častá, onemocněním dýchacích orgánů, centrálního nervového systému a komplikacemi dochází však ke ztrátám hospodárnosti chovu zvířat. Virem napadená zvířata mohou v sobě přechovávat původce onemocnění po dlouhou dobu (1 až 2 roky) a za působení stresu (například při porodu) se viry uvolňují a tím se nemoc šíří (J. Am. Vet. Med. Ass. 176, str. 998 až 1 000, 1 345 až 1 347, 1980).

Infikované prasnice ztrácejí často embryo předčasným porodem (Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 12, str. 17 až 23, 1962). Infikovaní vepři mají také významnou úlohu při přenášení Aujeszkyho nemoci na přežvýkavce (hovězí dobytek a ovce) (Acta. Vet. Acad. Sci. Hung. 12, str. 53 až 58, 1962).

Způsob potírání Aujeszkyho nemoci je založen na tom, že je nutno chránit specifickými protilátkami nemocí nejčastěji napadená zvířata, selata ještě sající, v prvních týdnech jejich života.

V Maďarsku byla k ochraně proti této nemoci vypracována výrobní technologie pro preventivní hyperimunizační serum (Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 7, str. 423 až 427, 1957). Z vepřů získané hyperimunizační serum snižuje při podání ve správném okamžiku ztráty, jeho nedostatky jsou však významné: výroba séra je velmi drahá a kromě toho se z organismu v krátké době vylučuje (v průběhu 10 až 14 dní). Pro vysoké ceny séra nepřichází jeho použití u mladých zvířat a u vzrostlých zvířat v úvahu.

Dalším krokem k ochraně proti Aujeszkyho nemoci je zavedení aktivní imunizace. Virové kmeny se různým způsobem a v různé míře oslabují a používá se jich k výrobě vakciny. V Maďarsku je živá vakcína, která obsahuje živoucí virus s oslabenou virulencí od roku 1961 obchodně dostupná.

Používá se jí k aktivní imunizaci vepřového dobytka, přežvýkavců a psů (MAL. 16, str. 42 až 45, 1961). Nemocí způsobované hospodářské ztráty po zavedení programu vakcinace poklesly (Cah. Méd. Vet. 43, str. 240 až 247, 1974), použití živoucí virové vakciny má však několik nedostatků:

1) Po imunizaci březích prasnic poskytuje obsah protilátky kolostra a mléka 4 až 6 týdnů pasivní imunitu selat. V průběhu této doby nelze provádět imunizaci živoucí virovou vakcinou, protože i malá hladina mizejících kolostrálních ochranných látek je dostatečná k zábraně pomnožení viru v míře potřebné pro vznik aktivní imunity.

2) Z těchto důvodů mohou být ve stádu zvířata, u kterých byla vakcína bez užítu a v infikovaném stavu představují tato nedostatečně imunní individua přetrvávání virulentního viru.

3) Používání živoucí vakciny je v mnoha zemích zakázáno a v mnoha případech se tento zákaz rozšiřuje i na dovoz masa živoucí vakcinou imunizovaných zvířat. To omezuje exportní schopnost země, kde se imunizuje živoucí vakcinou.

4) Jakkoliv se v Maďarsku vypracované, zeslabené vakciny až dosud osvědčily jako neškodné a geneticky stálé, informují zahraniční publikace o případech, kdy virové kmeny používané pro výrobu zeslabené vakciny náhle získaly zpět svoji virulenci (The Vet. Bull. 43, str.

str. 465 až 480, 1973; Dtsch. Tierärztl. Wschr. 85, str. 381 až 420), což vedlo k bouřlivé reakci na očkování vakcinou ošetřených zvířat.

5) V Maďarsku používaná zeslabená vakcína je pro psy a pro norky ne zcela bez nebezpečí, kočkám imunitu nedodává.

Právě pro potíže spojené s živoucí vakcinou byly již prováděny zkoušky výroby inaktivované vakciny. K inaktivaci se použilo formalinu, ozáření ultrafialovými paprsky, beta-propiolaktonu, saponinu, krystalové violeti a ethanolu, jakožto pomocné látky gelu hydroxidu hlinitého (Acta Microbiol. Hung. 2, str. 151 až 160, 1954; Arch. exp. Vet. Med. 21, str. 501 až 507, 1967).

Tímto způsobem vyrobená vakcína však nebyla dostatečně účinná. Moderní způsoby používají k inaktivaci ethylethyleniminu, jakožto adjuvantu DEAE-dextranu (Zbl. Vet. Med. B 20, str. 127 až 138, 1973), DEAE, dextran však vyvolává alergické reakce.

Cílem vynálezu je způsob výroby inaktivované vakciny proti Aujeszkyho nemoci,

- 1) která by byla stejně účinná nebo účinnější než zeslabená vakcína Aujeszkyho,
- 2) byla by neškodná pro zvíře napadené Aujeszkyho nemocí nezávisle na jeho druhu a stáří a poskytovala by odpovídající imunitu,
- 3) hodila by se k imunizaci selat chráněných prostřednictvím kolostrální imunity.

Podstata způsobu výroby inaktivované očkovací látky proti Aujeszkyho nemoci vypěstováním kmene viru Aujeszkyho nemoci na buněčné kultuře, sklizením a inaktivací viru a smísením a homogenizací inaktivovaného viru s olejovým adjuvantem podle vynálezu spočívá v tom, že se jako kmen viru použije virulentní, pro vepře pathogenní kmen viru Aujeszkyho nemoci "Phylaxia" uložený v maďarském zemském ústavu pro zdraví (Országos Közegészségügyi Intézet) pod číslem 00236/82 v množství alespoň 10^7 TKID₅₀/ml.

Podle vynálezu se tedy postupuje tak, že se z různých Aujeszkyho kmenů na základě jejich imunizační schopnosti volený a pod číslem 00236/82 v OKI uložený Aujeszkyho kmen "Phylaxia" očkuje na primární fibroblastovou buněčnou kulturu kuřecího zárodku a pomnoží se. Získaná, viry obsahující kapalina, se inaktivuje známým inaktivačním prostředkem, s výhodou ethyleniminem, a pak se smísí se známým adjuvantem, s výhodou s inkompletním olejovým adjuvantem.

Vynikající imunizační působení způsobem podle vynálezu vyrobené vakciny vyplývá z několika skutečností. Z tuzemské epidemie pocházející virulentní kmen "Phylaxia" je charakterizován těmito biologickými vlastnostmi: může se úspěšně množit jak v buněčných kulturách tak také v hostitelských zvířatech, má vysoký infekční titr a má dobrou schopnost imunizační.

K vynikající účinnosti přispívá také šetrný inaktivační proces, za jehož parametrů (teplota, koncentrace inaktivačního prostředku, doba) zůstávají chránicí antigeny zachovány. Inaktivační prostředek ethylenimin se před použitím ve formě zředěného vodného roztoku cyklizuje. Imunizační působení šetrně inaktivovaného antigenu se ještě zvyšuje inkompletním adjuvantem "Phylaxia".

V následujících příkladech popsaným způsobem připravená vakcína se používá k imunizaci vepřů, hovězího dobytka a psů, přičemž se imunizace s výhodou opakuje.

Vynález blíže objasňují následující příklady praktického provedení.

P ř í k l a d 1

Příprava očkovacího viru

Intracerebrálně se infikují králíci o hmotnosti 2 až 2,5 kg kmenem viru Aujeszkyho nemoci "Phylaxia" deponovaném v maďarském zemském ústavu pro zdraví pod číslem 00236/82, izolovaném při akutní epidemii. Na zvířatech se pozorují charakteristické symptomy Aujeszkyho nemoci, smrt nastává po 72 až 96 hodinách. Za sterilních podmínek se vyjme mozek a z něho se za použití fyziologického roztoku chloridu sodného připraví 10% suspenze. Použije se jí pro hromadné pomnožení viru.

P ř í k l a d 2

Výroba suspenze virů

Podle příkladu 1 získaný virulentní očkovací vir se namnoží na primární na fibroblastové jednovrstvové buněčné kultuře kuřecího embrya nebo na podobné jednovrstvové buněčné kultuře v Rouxově baňce o obsahu 2 000 ml (nebo v rotující baňce kolébacího zařízení).

Jako růstového roztoku pro buněčnou kulturu se používá Hanksova roztoku nebo roztoku MEM-H, k udržování a k namnožení viru se používá Earlova roztoku nebo roztoku MEM-E. Složení těchto roztoků je uvedeno v těchto literárních pramenech: J. Nat. Cancer Inst. 8, 83, 1974; Proc. Soc. exp. Biol. Med. 71, 196, 1949; Science 139, 1959; Bakács, Farkas: Orvosi virologia, Medicina, Budapest).

Pro růst jednovrstvové buněčné kultury používáný Hanksův roztok nebo roztok MEM-H se obohatí 10 % telecího séra, zatímco roztok, používáný pro pomnožení viru neobsahuje žádné telecí serum. Po vytvoření jednovrstvové buněčné kultury se růstový roztok slije.

Na kulturu se nalije vir obsahující udržovací roztok. Kultury se inkubují při teplotě 37 °C až do úplného rozrušení buněk (po přibližně 48 až 72 hodinách). Získaná suspenze virů je pak vhodná pro výrobu inaktivované vakcíny, jestliže je sterilní a infekční titr, měřený v buněčné kultuře, je alespoň 10^7 TCID₅₀/ml.

P ř í k l a d 3

Inaktivace a formulace

Způsobem podle příkladu 2 získaná suspenze virů se inaktivuje po dobu 6 hodin při teplotě 37 °C ethyleniminovým roztokem o koncentraci 200 µg/ml. Roztok se připraví bezprostředně před svým použitím cyklizací bromethylaminu. Pak se ethylenimin rozloží natriumthiosulfátem a hodnota pH inaktivované suspenze se upraví na 7,2 až 7,4.

Pro kontrolu, zdali je suspenze skutečně inaktivní, se popsáním způsobem nasazená buněčná kultura očkuje inaktivovanou suspenzí a očkují se jí dále králíci o hmotnosti 2 až 2,5 kg a ovce o hmotnosti 25 až 30 kg.

Virový materiál se pak smísí se stejným objemem inkompletního olejového adjuvantu "Phylaxia". (Olejový adjuvant "Phylaxia" je nový a sestává z 73 % oleje Marcol 52 a z 27 % povrchově aktivní látky, která je směsí známých tenzidů SPAN 80, SPAN 20 a TWEEN 60. Výraz "Marcol 52" se používá ve veškeré imunologické odborné literatuře a ve výrobě vakcíny pro olej vyráběný firmou Esso.)

Vodná suspenze virů a olejový adjuvant se zpracují ve vysokotlakém emulgátoru na stálou suspenzi, která se nerozpadá v teplotním oboru 0 až +45 °C. Hotová vakcína se za sterilních podmínek plní do ampulí a ampule se pak vzduchotěsně uzavřou.

P ř í k l a d 4

Zkouška na očkovací reakci

Popsaným způsobem získané vakciny se v dávce 2 ml naočkují intramuskulárně těmto zkušebním zvířatům: králík, ovce, pes, sele, ve stáří 2 dnů, tří týdnů a osmi týdnů a prasnice v poslední třetině březosti. Vepři se pozorují po dobu tří měsíců, ostatní zvířata po dobu šesti týdnů. V průběhu této doby nedošlo k žádné reakci na očkování.

P ř í k l a d 5

Imunizace selat.

Selata ve stáří dvou dnů, tří týdnů a osmi týdnů se vakcinují intramuskulárně vždy 2 ml vakciny. Po třech týdnech se vakcinace opakuje. U ošetřených zvířat vznikají specifické protilátky, které chránějí selata před intranasální infekcí dávkou 2×10^6 TCID₅₀ virulentního Aujeszkyho viru, zatímco neošetřená kontrolní selata při stejné dávce uhynou.

P ř í k l a d 6

Vytváření kolostrální imunity

Chovné prasnice se v poslední třetině březosti intramuskulárně ošetří vakcinou podle příkladu 3 použitou v množství 2 ml. Ošetření se opakuje po třech týdnech, přičemž se doba ošetření volí tak, aby bylo druhé očkování dva týdny před předpokládaným dnem vrhu selat.

V kolostru ošetřených prasnic vznikají specifické obranné látky, a proto se může naměřit ještě sedmý den v krevním seru sajících selat střední neutralizační titr 1:16. Tento viry neutralizační titr poskytuje ochranu proti virulentnímu viru v dávce infekce 2×10^6 TCID₅₀.

Kontrolní naočkování 30, 60. a 90. den (když obsah ochranných látek v kolostru klesá) vede u ošetřené skupiny k mortalitě 18, 26 a 40 %, zatímco všechna selata neimunizovaných prasnic uhynou. V mléce obsažené specifické ochranné látky chrání tudíž mladá zvířata ve stáří, kdy jsou pro onemocnění nejnáchylnější.

P ř í k l a d 7

Vakcinace selat v období kolostrální imunity

Selata imunizovaných prasnic podle příkladu 6 mající kolostrální imunitu se očkují 7. a 28. den způsobem podle příkladu 3 vždy 2 ml vakciny. Specifické ochranné látky se vytvoří ve vysokém titru (1:44). Ve stáří 60 dní se selata intranasálně infikují virulentním virem v dávce 2×10^6 TCID₅₀.

Pokusná zvířata nevykazují žádné symptomy, zatímco kontrolní zvířata od neimunizovaných prasnic a nevakcinovaná selata ze 100 % hynou. Je tedy možno úspěšně imunizovat inaktivovanou vakcinou také sající selata mající kolostrální imunitu.

P ř í k l a d 8

Četnost očkování

Způsobem podle příkladu 6 v průběhu své březosti dvakrát vakcinované chovné prasnice se při nové březosti opět očkují 2 ml vakciny (opakované očkování). Tím se v kolostru ošetřených chovných prasnic titr ochranných látek opět silně zvýší a jejich selata jsou pak chráněna proti kontrolní infekci 2×10^6 TCID₅₀.

Naproti tomu selata v průběhu druhé březosti neočkovaných chovných prasnic vykazují větší mortalitu (ve stáří 6 týdnů 35 %). To ukazuje význam nutnosti opakovaného očkování pro dosažení dostatečné kolostrální ochrany u chovných prasnic v průběhu jejich březosti.

P ř í k l a d 9

Imunizace ovcí

Ovce ve stáří 3 a 6 měsíců se imunizují 2 ml vakciny podle příkladu 3. Zvířata se 15 dní po vakcinaci infikují virulentním virem Aujeszkyho nemoci v dávce 1 000 TKID₅₀. Všechna zvířata z nevakcinované kontrolní skupiny hynou, zatímco ošetřené ovce nevykazují žádné příznaky nemoci.

P ř í k l a d 10

Psi ve stáří jednoho měsíce a šesti měsíců se ošetří vakcinou podle příkladu 3 v množství 2 ml. Ošetření se opakuje po třech týdnech. Ošetření psi 15 dnů po očkování a neošetřená kontrolní skupina se infikují virulentním virem. Titr ochranných látek v krvi imunizovaných psů je 1:32 a zvířata neonemocní, zatímco kontrolní skupina hyne za charakteristických příznaků nemoci.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob výroby inaktivované očkovací látky proti Aujeszkyho nemoci vypěstováním kmene viru Aujeszkyho nemoci na buněčné kultuře, sklízením a inaktivací viru a smísením a homogenizací inaktivovaného viru s olejovým adjuvancem, vyznačující se tím, že se jako kmen viru použije virulentní, pro vepře patogenní kmen viru Aujeszkyho nemoci "Phylaxia" OKI č. 00236/82 v množství alespoň 10⁷ TKID₅₀/ml.