



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

265945

(11) (B1)

(13)

(51) Int. Cl.⁴

A 61 K 39/265

(22) Přihlášeno 11 06 87

(21) PV 4292-87.Q

(40) Zveřejněno 14 03 89

(45) Vydáno 13 04 90

(75)

Autor vynálezu

DEDEK LADISLAV MVDr. CSc., MACURA BŘETISLAV MVDr., OPAVA,
ŠTĚPÁNEK JAN MVDr. CSc., ZVOLE nad Perštejnem, PŠIKAL IVAN MVDr.,
BARTL MILAN MVDr., BRNO

(54) Vakcína proti infekční rhinotracheitidě inaktivovaná a způsob její výroby

(57) Řešení se týká vakcíny proti infekční boviní rhinotracheitidě. Ve vakcinační dávce je obsaženo 10^{7,35} TKID₅₀ inaktivovaného viru kmene CAMP V-317. Ke kultivaci viru se používají primární kultury telecí ledviny, které se kultivují v Earlově solné směsi s 10 % séra prostého protilátek proti viru IBR, při teplotě 34 až 38 °C po dobu 2 až 5 dnů, následně se zbaví buněčného detritu, chemicky se inaktivuje a upraví se do aplikační formy. Antigen se koncentruje například ultrafiltrací nebo ultracentrifugací. Chemická inaktivace se provádí glutaraldehydem ve výsledné koncentraci 0,02 až 0,05 hmot. při teplotách 4 až 40 °C. Inaktivovaný virus se pro použití smíchá s lipidním adjuvans do podoby tekuté vakcíny nebo se lyofilizuje s lyofilizačním médiem na bázi sacharózy a želatiny a před použitím se rozpouští v lipidním adjuvans.

Vynález se týká vakcíny proti infekční bovinní rhinotracheitidě skotu (IBR) a způsobu její výroby. V širším pojetí se vynález dotýká profylaxe infekční bovinní rhinotracheitidy, onemocnění, které hraje významnou roli v komplexu infekčních onemocnění skotu. Z tohoto důvodu je studiu a prevenci věnována velká pozornost. Diagnostickým šetřením založeným na využití imunoenzymatických testů bylo prokázáno, že IBR je v našich chovech značně rozšířena a působí jako činitel, který významně negativně ovlivňuje ekonomiku chovu skotu v jednotlivých zemědělských závodech. Především proces reprodukce, odchovu zdravých telat a nákazy prostých býčků od potenciálních matek.

Nákaza je charakterizována tím, že se klinicky manifestuje v několika formách a ohrožuje zvířata všech věkových kategorií, a tím může přivodit přímé i nepřímé ztráty. Nejzávažnější a u nás nejčastěji zjišťovanou formou je respirační onemocnění telat a narušení průběhu březosti (úhyn plodu, aborty) u krav.

Původce, virus IBR, má tendenci persistovat v organismu zvířat bez zjevných příznaků a vylučovat se jen v určitých momentech vyprovokovaných působením faktorů vnějšího prostředí (léčba kortikosteroidy, transport zvířat, souběžná invaze *Dictyocaulus viviparus*, superinfekce virem PI-3, porod u krávy apod.). Tato infikovaná zvířata však hrají významnou roli v rozšiřování nákazy. Latentně infikované matky mohou vzhledem k exacerbací infekce vyprovokované porodem přenášet infekční virus na svá telata, která mohou být zdrojem infekce pro další zvířata.

Současné epizootologické poznatky odvozené na základě rozsáhlých sériologických vyšetření ukazují, že titry protilátek v krevních sérech jednotlivých zvířat vystavených přirozené kontaktní infekci jsou rozdílné a kolísají v širokém rozmezí - od negativních až k vysoce pozitivním hodnotám. Koncentrace protilátek v krevních sérech a v kolostru a mléce krav je odrazem stupně celkové imunity daného zvířete a determinuje jak možnost exacerbace latentních infekčních procesů (řestup viru do březí dělohy), tak i vnímavost novorozeneckých telat k infekci.

Z hlediska komplexní profylaxe IBR je tedy důležité navodit a trvale udržet vysokou úroveň imunity u všech v chovu ustájených a infekci vystavených zvířat.

Cílem autorského kolektivu proto bylo vyvinout vhodný neškodný a vysoce účinný imuno-preparát - inaktivovanou vakcínu s dostatečně dlouhou dobou expirace a definovat indikaci pro její použití v prevenci IBR i v rámci komplexních profylaktických programů zaměřených na úplné ozdravení chovů od této nákazy.

V současné době jsou v zemích s rozvinutou živočišnou výrobou a vyspělou veterinární službou ke specifické imunoprofylaxi IBR využívány jednak vakcíny živé, obsahující atenuovaný virus IBR, jednak vakcíny inaktivované.

Jednoznačnou přednost atenuovaných vakcín, tj. nízké výrobní náklady, výrazně snižuje skutečnost, že kmeny viru IBR navozují stav latentní infekce a mohou být společně s virulentními kmeny hostitelem vylučovány a rozšiřovány na vnímavá nevakcinovaná zvířata (PASTORET aj., *Infect. Immun.*, 29, 1980, 483 až 488). Atenuované vakcíny jsou tedy použitelné jen ke snižování ztrát a omezení výskytu klinicky manifestních infekcí. V žádném případě nelze s jejich použitím počítat při celkovém tlumení nákazy a ozdravování (NETTLETON aj., *Vet. Rec.*, 107, 1980, 379 až 382).

Z toho důvodu je v současné době preferováno použití inaktivovaných vakcín, u kterých je vznik latentní infekce vyloučena které zvyšují celkovou úroveň stáda, omezují reaktivaci latentních infekcí, spolehlivě chrání plod a znemožňují infekci. Umožňují postupné vytěšňování viru z populace skotu. Jsou proto použitelné i v rámci imunoprofylaktických programů orientovaných na postupné ozdravování chovů od IBR.

(SWEAT, R. L., J. Am. Vet. Med. Ass., 182, 1983, 809 až 811).

je připravována v lyofilizovaném stavu, prodlužuje dobu její expirace na nejméně 12 měsíců.

tí v lipoidním adjuvans.

tomnosti.

případně v jejich kolostru

Zvířata infikovaná bez vakc.	9	8,00	5,65	5,65	6,34	14,25
Zvířata infikovaná s vakc.	30	7,55	57,01	120,81	170,85	80,63
Zvířata neinf. s vakc.	23	0	2,20	47,55	-	-

vakcíny proti IBR a po čelenžní i. nas. infekci virulentním kmenem IBR.

před vakcinací (infekcí)	BTL	SI = 0	SI = 0	SI = 0	SI = 0
	LMI	0 %	0 %	0 %	0 %
	LAI	0 %	0 %	0 %	0 %
první reakce	BTL	6d., SI = 4	0d., SI = 0	-	-
po revakcinaci	LMI	3d., 20%	17d., 15%	-	-
	LAI	3d., 45%	3d., 20%	-	-
Nejvyšší reakce po revakcinaci	BTL	21d., SI = 9,5	0d., SI = 0	18d., SI = 70	-
	LMI	3d., 20%	17d., 15%	31d., 40%	-
	LAI	3d., 45%	21d., 40%	3d., 63%	-

		Tele-1	Tele-2	Tele-3	Tele-4
První reakce	BTL	3d., SI = 5	3d., SI = 2,9	-	14d., SI = 2
po i. nas.	LMI	7d., 40%	7d., 45 %	-	3d., 29%
infekci	LAI	3d., 35%	14d., 20%	-	3d., 60%
virem IBR					
Nejvyšší reakce po i.	BTL	11d., SI = 11,1	16d., SI = 25	11d., SI = 27	14d., SI = 2
nas. infekci	LMI	7d., 40%	7d., 45%	7d., 48%	3d., 29%
virem IBR	LAI	14d., 45%	14d., 20%	14d., 30%	3d., 60%
Vylučování viru IBR					
nosní sliznicí po i. nas. inf.		neg.	3 dny $10^3 - 10^{0,5}$ TKID ₅₀	neg.	7 dní $10^{5,75} - 10^1$ TKID ₅₀
Titř sérových protilátek v době i. nas. inf. (ELISA)		1:6 300	1:1 350	1:7 100	neg.
Klinické příznaky onemocnění po i. nas. inf.		-	-	-	-

Legenda: Tele-1 - vakcinováno 2x
 Tele-2 - vakcinováno 2x
 Tele-3 - vakcinováno 3x
 Tele-4 - kontrolní, nevakcinované
 BTL = test blastické transformace lymfocytů
 LMI = test inhibice imigrace leukocytů
 LAI = test inhibice adherence leukocytů
 SI = stimulační test
 d = dny po vakcinaci nebo infekci

P ř í k l a d 1

Uvedený příklad předmět vynálezu nijak neomezuje ani nevyčerpává.

Virový antigen

Pro výrobu vakcíny se použije virus infekční bovinní rhinotracheitidy kemne CAMP V-317, který byl izolovaný z telat nemocných akutním respiračním onemocněním v buněčných kulturách primárních telecích ledvin kultivovaných v Earlově solné směsi doplněné o 0,3 % laktalbumin-hydrolyzátu. Pro výrobu vakcíny je možno použít virus s titrem $10^{6,8}$ TKID₅₀ v 1 cm³ a vyšším.

Buněčná kultura pro pomnožení viru

K infekci se použije 5 dnů stará kultura primárních telecích ledvinových buněk pomnožených v Earlově solné směsi s 0,3 % hmot laktalbumin-hydrolyzátu a 10 % hmot. bovinního inaktivovaného séra prostého protilátek proti viru bovinní rhinotracheitidy. Kontrola nepřítomnosti specifických protilátek proti viru IBR se provádí ELISA testem a virus neutralizačním testem.

Narostlá kultura se zbaví růstového média se sérem a infikuje se virem IBR absorpcí dávkou 0,05 TKID₅₀ na buňku. Po absorpci viru na buněčnou kulturu se přidá udržovací médium - Earlova solná směs s 0,3 % hmot. laktalbumin-hydrolyzátu. Infikované buněčné kultury se inkubují 4 dny při 37 °C. V této době dojde ke vzniku cytopatogenního efektu.

Pomnožený virus se zbaví buněčného detritu při přetřetí 3 000 g odstředěním po dobu 15 minut. Čistý virus se pak koncentruje přes ultrafiltr zachycující částice s molekulovou hmotností vyšší jak 20 000. Virus se koncentruje 10x. Koncentrovaný virus se inaktivuje glutaraldehydem v koncentraci 0,125 % hmot. při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin. U inaktivované-

ho viru se upraví pH na 7,0; přidá se protektivní lyofilizační médium obsahující želatinu a sacharózu a provede se lyofilizace. Lyofilizovaný antigen se před použitím ředí v lipidním adjuvans a aplikuje se zvířatům. Výhodou takto připravené vakcíny je dlouhá doba expirace.

K ředění vakcíny je možno použít lipidní adjuvans následujícího složení:

Destilovaná voda	3 000 cm ³
Parafinový olej	1 600 cm ³
Lanolin	300 g
Tween 80 (polyoxyetylovaný monoolean sorbitolu)	100 g

P ř í k l a d 2

Koncentrovaný a inaktivovaný virus připravený podle příkladu 1 se smíchá s lipidním adjuvans a takto vzniklá vakcína se do použití uchovává v tekutém stavu.

Složení tekuté vakcíny:

Koncentrovaný antigen IBR	30 cm ³
Parafinový olej	62 cm ³
Montanid 103	8 cm ³

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Vakcína proti infekční bovinní rhinotracheitidě inaktivovaná, vyznačující se tím, že obsahuje minimálně $10^{6,8}$ TKID₅₀ inaktivovaného viru infekční bovinní rhinotracheitidy kmene CAMP V-317 v jedné vakcinační dávce.

2. Způsob výroby vakcíny vyznačující se tím, že virus se kultivuje v buněčné kultuře primární telecí ledviny, k jejíž kultivaci bylo použito sérum prosté specifických protilátek proti viru infekční bovinní rhinotracheitidy při teplotě 34 až 38 °C po dobu 2 až 5 dnů, následně se zbaví buněčného detritu, chemicky se inaktivuje a upraví do aplikační formy.

3. Způsob výroby vakcíny podle bodu 2 vyznačující se tím, že se virový antigen koncentruje například ultrafiltrační nebo ultracentrifugací.

4. Způsob výroby vakcíny podle bodu 2 vyznačující se tím, že chemická inaktivace se provádí glutaraldehydem ve výsledné koncentraci 0,02 až 0,5 % hmot. při teplotách 4 až 40 °C.

5. Způsob výroby vakcíny podle bodu 2 vyznačující se tím, že inaktivovaný virus se před použitím smíchá s lipidním adjuvans do podoby tekuté vakcíny.

6. Způsob výroby vakcíny podle bodu 2 vyznačující se tím, že inaktivovaný virus se lyofilizuje s lyofilizačním médiem na bázi sacharózy a želatiny a před použitím se rozpouští v lipidním adjuvans.