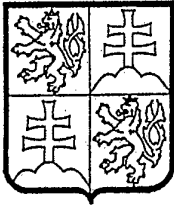


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 276 528

(21) Číslo přihlášky : 1467-90. V

(22) Přihlášeno : 27 03 90

(30) Prioritní data :

(40) Zveřejněno : 15 10 91

(47) Uděleno : 24 04 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 17 06 92

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :

A 61 K 39/295

(73) Majitel patentu : VÝZKUMNÝ ÚSTAV VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ, BRNO

(72) Původce vynálezu : MÁDR VOJTĚCH MVDr. CSc., BRNO

(54) Název vynálezu : Inaktivovaná vakcína proti virovým původcům reprodukčních poruch u prasnic a způsob její přípravy

(57) Anotace :

Řešení se týká inaktivované vakcíny proti reprodukčním poruchám u prasnic, charakterizovaných tzv. SMEDI syndromem. Vakcína sestává ze dvou virových složek: parvoviru prasat a enteroviru prasat. Typ enteroviru je volen tak, aby byla zabezpečena imunita proti prevaluujícímu typu. Vakcína se připravuje tak, že se oba virové antigeny pomnožují izolovaně na primárních buněčných kulturách prasečích ledvin. Pomnožené virové suspenze se klarifikují odstředěním a titrují se na přítomnost viru. K inaktivaci virů se s výhodou používá formalin. Suspenze inaktivovaných antigenů v udržovacím médiu se mísí s lipoidním adjuvans v poměru: 1 obj. díl inaktivovaného parvoviru, 1 obj. díl inaktivovaného enteroviru a 1 obj. díl lipoidního adjuvans.

Předmětem vynálezu je bivalentní inaktivovaná vakcína proti významným virovým původcům reprodukčních poruch u prasnic, parvoviru a enteroviru, a způsob její přípravy.

Vakcína je určena k imunoprofylaxi prasnic proti parvoviru a enteroviru, které jsou příčinami reprodukčních poruch, charakterizovaných tzv. SMEDI syndromem. Hlavními příznaky syndromu jsou potraty, odúmrtí a mumifikace plodů, rození málo životných selat a následná snížená plodnost. Obranou proti uvedeným infekcím jsou především humorální protilátky, jejichž tvorbu lze navodit parenterální inokulací inaktivovaných virů, stimulovaných vhodnými adjuvantii.

Imunizace proti parvoviru byla dosud řešena vývojem různých druhů vakcín. Nedostatkem těchto vakcín je, že zabezpečují ochranu pouze proti jednomu z původců.

Serologickým a virologickým vyšetřením v chovech se zvýšeným výskytem mrtvě rozených selat bylo prokázáno značné rozšíření prasečího enteroviru typu 6.

Na základě epizootologických rozborů bylo zjištěno, že se oba viry v chovech prasat vyskytují paralelně a klinické projevy mohou být vyvolány souběžným účinkem obou původců. Vývoj bivalentní vakcíny proti parvoviru a enteroviru, který je cílem vynálezu, je proto motivován snahou o zabezpečení imunoprofylaxe proti SMEDI syndromu v plné šíři.

Zárukou splnění uvedeného požadavku je inaktivovaná vakcína proti virovým původcům reprodukčních poruch u prasnic, charakterizovaných SMEDI syndromem, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že inaktivovaná vakcína sestává ze stejných objemových dílů suspenze inaktivovaného parvoviru prasat v udržovacím médiu, suspenze inaktivovaného enteroviru prasat typu 6 v udržovacím médiu a lipoidního adjuvans, obsahujícího ve 100 objemových dílech 5 obj. dílů lipofilního neionogenního tenzidu ze skupiny polyoxyethylenesterů nebo polyoxyethylensorbitanesterů kyseliny laurové, palmitové, stearové nebo olejové, s výhodou polyoxyethylensorbitanmonooleátu, 45 obj. dílů parafinového oleje a 50 obj. dílů fyziologického roztoku.

Podstata způsobu přípravy této bivalentní vakcíny, který je rovněž předmětem vynálezu, spočívá v tom, že se uvedené virové antigeny pomnožují každý zvlášť na primárních buněčných kulturách epitelu prasečích ledvin, známým způsobem klarifikují, inaktivují formalinem a po smísení emulgují v lipoidním adjuvans.

Charakteristika použitých virových kmenů:

Parvovirus 42/82 P byl izolován z placenty prasnice poražené v raném stadiu březosti z chovu s endemickým výskytem reprodukčních poruch. Identifikace viru byla provedena serologicky srovnáním se sbírkovým kmenem parvoviru prasat. Kmenový virus je udržován ve zmraženém stavu při -70°C .

Enterovirus 42/82 E byl izolován z fétu prasnice poražené v raném stadiu březosti z chovu s endemickým výskytem reprodukčních poruch. Virus byl serologicky typizován jako 6. typ prasečího enteroviru. K typizaci byla použita sada typových sér připravených imunizací králíků sbírkovými kmeny prasečích enterovirů. Kmenový virus je udržován ve zmraženém stavu při -70°C .

Množení parvoviru

Virus je množen na rozrůstajících se primárních kulturách prasečích ledvin. Buňky získané trypsinací fragmentů prasečích ledvin jsou suspendovány v živném médiu a nasazeny v denzitě 10^5 v 1 ccm do kultivačních nádob. Inkubace probíhá v termostatu při $+37^{\circ}\text{C}$. Za 24 h jsou kultury kontrolovány pod mikroskopem a pokud jsou na stěně nádob zjišťovány drobné ostrůvky nově narostlých buněk, je kultura vhodná k infekci parvovirem.

Virus je přímo aplikován do média rozrostlých buněčných kultur v 5%ním objemu kultivačního média. Virus se množí pozvolna, největší koncentrace dosahuje cca po 5 denní inkubaci, kdy se paušálně sklízí. V průběhu inkubace se buněčná kultura postupně rozrůstá a souběžně se virus pomnožuje bez výrazného cytopatogenního efektu. Po skončení inkubace se kultura zmrazí při teplotě nižší než -20°C . K uvolnění viru se doporučuje kultivační láhve

2x až 3x zmrazit a opět rozmrazit, načež se virová suspenze lehce odstředí. Koncentrace viru se stanoví hemaglutinačním testem s morčecími krvinkami. Specifita viru se ověřuje hemaglutinačně inhibičním testem se sérem monospecificky pozitivním na parvovirus. Virus, který bude zpracován na vakcínu v průběhu 14 dnů lze ponechat v chladírně při +4 °C, při delším skladování se zmrazuje na -20 °C.

Množení enteroviru

Virus je pomnožován na kompletním porostu buněčné kultury epitelu prasečích ledvin. Buněk získané trypsinací tkáňových fragmentů jsou suspendovány do živného média a nasazeny v denzitě 10^5 v 1 ccm do kultivačních nádob. Kultury jsou inkubovány při teplotě 37 °C až do dosažení kompletního porostu na stěně lahvi, což bývá obvykle za 4 dny. Živné médium je slito a nahrazeno udržovacím médiem bez séra a kultury jsou připraveny k infekci virem.

Virus je inokulován přímo do udržovacího média v množství 2 až 3 % objemu kultivačního média v nádobě.

Enterovirus se vyznačuje rychlým růstem doprovázeným typickým cytopatogenním efektem charakterizovaným zakulacováním buněk a jejich uvolňováním ze skla. Po úplném rozpadu buněčné kultury se lahve s narostlým virem jednou zmrazí na -20 °C a po rozmrazení se mírným odstředěním vyčeří. Koncentrace viru v suspenzi je ověřována titrací na primárních buněčných kulturách prasečích ledvin ve zkumavkách. K přípravě vakcíny je vhodný virus o titru minimálně 10^{-5} TCID₅₀/0,1 ccm.

Specifita viru se ověřuje seroneutralizačním testem se specifickým sérem na prasečí enterovirus typu 6. Vytitrovaný virus s ověřenou sterilitou a specifitou je připraven k výrobě vakcíny. Virus lze skladovat 14 dnů při teplotě +2 °C, při delším skladování se doporučuje zmrazit při -20 °C.

Příprava vakcíny

Inaktivace parvoviru a enteroviru probíhá odděleně. K virovým suspenzím se za stálého míchání pozvolna přidává při pokojové teplotě zředěný formalin (10 %), a to na 100 ml virové suspenze 1 ccm zředěného formalínu tak, aby bylo dosaženo výsledné koncentrace formalínu 0,1 %. Inaktivace probíhá při pokojové teplotě 5 až 6 h. Potom se virová suspenze uloží do lednice při +2 °C.

Po 3 denní inkubaci při teplotě +2 °C se ověřuje, zda buněčné suspenze neobsahují rezidua živého viru. Inokulací buněčných kultur se ověřuje absence enteroviru a hemaglutinačním testem s morčecími krvinkami absence parvoviru.

K přípravě bivalentní vakcíny se míchá:

- 1 díl inaktivovaného parvoviru
- 1 díl inaktivovaného enteroviru
- 1 díl lipidního adjuvantia

Směsi se míchají při pokojové teplotě 4 až 6 h. Potom se vakcína uloží do chladírny při teplotě +2 °C. Vakcína má vzhled homogenní šedobílé emulze, její konzistence se nemění ani po několikaměsíčním skladování.

U vakcíny se provádí tyto zkoušky:

Zkouška sterility

Vakcína se naočkuje na plotny krevního agaru a do tekutého živného média. Po přiměřené době inkubace se nesmí vyskytnout bakteriální a plísňové kontaminace.

Zkouška neškodnosti

Zkouška neškodnosti se provádí na dvou odstavených selatech. Selata se očkují dávkou 3 ccm intramuskulárně. Po naočkování se selata klinicky sledují 10 dní. Během pozorovací doby nesmí dojít ke zvýšení teploty a ke zhoršení zdravotního stavu.

Zkouška účinnosti

Doporučuje se provádět na skupině 4 až 6 králíků. Králíci jsou imunizováni à 1 ml a po 14 dnech revakcinováni stejnou dávkou. Za 10 dní po revakcinaci se odebere krev pro serologické vyšetření specifických protilátek. Imunita proti enteroviru je dostačující pokud seroneutralizační titr dosáhne minimální hodnoty 1 : 128. Imunita proti parvoviru je dostačující pokud u poloviny imunizovaných králíků dosáhne hemaglutinačně inhibiční titr minimální hodnoty 1 : 32.

Pozn. Tvorba protilátek proti parvoviru prasat u králíků je relativně nižší než proti enteroviru.

Délka expirace vakcíny je 8 měsíců od data výroby, za předpokladu, že byla uložena při teplotě +2 až 4 °C.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Inaktivovaná vakcína proti virovým původcům reprodukčních poruch u prasnic, charakterizovaných SMEDI syndromem, vyznačující se tím, že sestává ze stejných objemových dílů suspenze inaktivovaného parvoviru prasat v udržovacím médiu, suspenze inaktivovaného enteroviru prasat typu 6 v udržovacím médiu a lipidního adjuvans, obsahujícího ve 100 objemových dílech 5 obj. dílů lipofilního neionogenního tenzidu ze skupiny polyoxyethylen-esterů nebo polyoxyethylensorbitanesterů kyseliny laurové, palmitové, stearové nebo olejové, s výhodou polyoxyethylensorbitanmonocleátu, 45 obj. dílů parafinového oleje a 50 obj. dílů fyziologického roztoku.

2. Způsob přípravy vakcíny podle nároku 1, vyznačující se tím, že se uvedené virové antigeny pomnožují každý zvlášť na primárních buněčných kulturách epitelu prasečích ledvin, známým způsobem klarifikují, inaktivují formalinem a po smísení emulgují v lipidním adjuvans.