

URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

59083

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 07.X.1967 (P 122 917)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 1.IV.1970

Kl. 30 h, 6

MKP C 12 k

5/00

UKD

Współtwórcy wynalazku: Charles Gale, Earl Ose

Właściciel patentu: Eli Lilly and Company, Indianapolis (Stany Zjed-
noczone Ameryki)Sposób wytwarzania mieszanki szczepionkowej przeciw gorączce
transportowej bydła

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania szczepionki przeciw gorączce transportowej bydła, zawierającej inaktywowaną mieszaninę wirusa Myxovirus parainfluenza-3 oraz drobnoustrojów Pasteurella, z dodatkiem adiuwanta. Szczepionka wytwarzana sposobem według wynalazku, wykazuje zdolność do zasadniczo całkowitego uodpornienia bydła przeciwko zakażeniu wirusowemu przez Myxovirus parainfluenza-3 oraz przeciwko pasterellozie, związanym z gorączką transportową.

Występowanie wirusa Myxovirus parainfluenza-3 oraz drobnoustrojów Pasteurella w drogach oddechowych bydła zostało dowiedzione niewątpliwie. Obecnie stwierdzono również z całą pewnością, że stanowią one etiologiczne ważne czynniki w zespole chorobowym, zwanym gorączką transportową. Etiologiczne czynniki tego zespołu chorobowego tworzą prawdopodobnie kompleks złożony z kilku elementów.

Znanych jest kilka sposobów wytwarzania mieszanek szczepionkowych do uodporniania zdrowego bydła przeciwko chorobie, a raczej zespołowi chorobowemu gorączki transportowej. Sposób dotychczas najczęściej stosowany jest opisany w Journal of the American Veterinary Medical Association, tom 142, nr 8, str. 884—887. Polega on na tym, że jako część wirusową mieszanki stosuje się wirus parainfluenza-3, a jako część bakteryjną hodowlę Pasteurella, przygotowaną ze szczepów Pasteurella multocida i Pasteurella hemolytica,

2

wyosobnionych z płuc cieląt chorych na gorączkę transportową. Gotowa część bakteryjna zawiera 25,0 części Pasteurella multocida, 25,0 części Pasteurella hemolytica, 48,6 części lekkiego oleju mineralnego i 1,4 części emulgatora. Gotowa szczepionka zawiera równe ilości inaktywowanej formaliny części wirusowej i części bakteryjnej. Przeprowadzone badania (The Cornell Veterinarian, tom 54, nr 1, str. 41—49) wykazały jednak, że szczepionka ta nie zabezpiecza dostatecznie bydła przed gorączką transportową. O negatywnych wynikach stosowania znanej szczepionki zawierającej Myxovirus parainfluenza-3 inaktywowanej formaliną informuje również artykuł zamieszczony w Journal of the American Veterinary Medical Association, tom 142, nr 8, str. 881—883.

Cechą znanych szczepionek przeciwko gorączce transportowej bydła jest między innymi to, że jako adiuwant zawierają olej mineralny.

Stwierdzono, że znacznie skuteczniej działającą mieszaninę szczepionkową przeciwko gorączce transportowej otrzymuje się jeżeli zamiast oleju mineralnego stosuje się adiuwant zawierający jon glinowy, taki jak żel wodorotlenku glinowego, tlenek glinowy w postaci zdyspergowanej lub fosforan glinowy.

Sposób według wynalazku polega na tym, że do mieszaniny hodowli Myxovirus parainfluenza-3, hodowli Pasteurella multocida i hodowli Pasteurella hemolytica dodaje się żel wodorotlenku gli-

nowego, zdyspergowany tlenek glinowy lub fosforan glinowy, przy czym ilość adiuwanta dobiera się tak, aby otrzymać preparat o stężeniu jonów glinu chemicznie równoważnym stężeniu, otrzymanemu przez dodanie około 10–50 ml wodnej zawiesiny o zawartości Al_2O_3 wynoszącej w stosunku wagowym 1,3% na 100 ml hodowli drobnoustrojów i aby otrzymany preparat wykazywał gęstość 5–10 krotnie wyższą niż próbką McFarlanda nr 1, według skali testu metodą McFarlanda. Przed dodaniem lub po dodaniu adiuwantu, drobnoustroje inaktywuje się pojedynczo lub w mieszaninie za pomocą znanego środka inaktywującego, a następnie zobojętnia ewentualnie nadmiar środka inaktywującego i do preparatu dodaje dopuszczalny do stosowania pozajelitowego antyseptyk w ilościach bakteriostatycznych i fungistatycznych.

Adiuwant stosowany według wynalazku powinien zawierać jon glinowy w postaci odpowiadającej przepisom farmakopei. Może to być wodny roztwór odpowiedniej soli glinowej lub też w postaci adsorbentu stałego albo uwodnionego żelu, zawierających jon glinowy. Przykładami odpowiednich postaci jonu glinowego są wolne żele lub wodne dyspersje wodorotlenku albo tlenku glinowego oraz sole glinu, a także mieszane sole glinowe różnych kwasów. Najodpowiedniejszymi postaciami materiałów zawierających jon glinowy są: wodny żel wodorotlenku glinowego, wodna zawiesina aktywnej glinki (tlenku glinowego), oraz uwodniony fosforan glinowy w postaci świeżo skręconej, wyróżniającej się bardzo dużą aktywnością. Materiały te można wytwarzać za pomocą podwójnej wymiany między odpowiednimi solami prekursorowymi w wodnych roztworach lub zawiesinach, po czym odpowiedni strącony osad odsącza się i przemywa w warunkach gwarantujących odpowiednią sterylność, aż do chwili użycia.

Fosforan glinowy można wytwarzać na przykład przez zmieszanie wodnych roztworów chlorku glinowego i ortofosforanu dwusodowego, albo roztworów siarczanu glinowo-potasowego i ortofosforanu trójsodowego. Powstały osad odsącza się i przemywa wodą, aby usunąć substancje rozpuszczalne, po czym osad ten w stanie wilgotnym można dodać do zinaktywowanej hodowli wirusa albo do mieszaniny wirusowo-bakteryjnej, jak opisano powyżej. Z mieszaniną wirusowo-bakterijną albo ze zinaktywowaną hodowlą wirusa miesza się materiał zawierający jon glinowy w postaci wodnego roztworu żelu albo dyspersji na stałym adsorbencie. W materiale tym stężenie związku glinu wynosi około 0,5–5% wagowych, a najlepiej około 1–2% wagowych. Ten związek glinowy dodaje się w ilości chemicznie równoważnej około 10–50 ml, najlepiej 20–30 ml wodnej zawiesiny 1,3% wagowych tlenku glinowego na 100 ml mieszaniny hodowli wirusa z hodowlą bakterii albo zinaktywowanej hodowli wirusa. Powstałą mieszaninę należy dokładnie wymieszać, w celu zapewnienia równomierności składu. Zazwyczaj wystarcza mieszanie w ciągu 15 minut.

Do inaktywacji drobnoustrojów stosuje się znane środki inaktywujące, na przykład aldehyd mrówkowy, p-propiolakton, hydroksylaminę, fenol lub chloroform. Najodpowiedniejszym inaktywato-

rem jest aldehyd mrówkowy, toteż w dalszym opisie jako inaktywator wymienia się dla uproszczenia tylko ten związek. Ewentualny nadmiar aldehydu mrówkowego zobojętnia się roztworem wodorosiarczynu metalu alkalicznego, korzystnie wodorosiarczynu sodowego. Przed zmieszaniem mieszanek wirusowo-bakteryjnej z adiuwantem korzystnie jest doprowadzić wartość pH mieszanek do 6,4–6,8, dodając w zależności od potrzeby odpowiednią ilość kwasu lub zasady, na przykład kwasu solnego lub wodorotlenku sodowego.

Próbki inaktywowanej mieszanek wirusowo-bakteryjnej odstawia się do badań na antygenowość bakteriologiczną i wirusową, a główną porcję produktu konserwuje się za pomocą znanego środka antyseptycznego, na przykład soli sodowej estru etylortęciowego kwasu salicylowego. Otrzymana zinaktywowana mieszanina wirusowo-bakteryjna z adiuwantem może być stosowana w tej postaci, albo też można ją stężyć przez lanie cieczy nad osadu. Takie stężenie szczepionki nie jest możliwe w przypadku znanych szczepionek, zawierających adiuwant olejowy.

Mieszanek wirusowo-bakterijną przygotowuje się w ten sposób, że Myxovirus parainfluenza-3 rozmnaża się zwykłymi metodami w hodowli tkankowej z nerki zarodka lub dorosłego bydła, małpy, królika albo w hodowli podobnych, jednowarstwowych zanurzonych komórek nerkowych pierwotnych, bądź też komórek linii tkankowej tak długo, aż komórki zakażone wirusem wykażą efekt cytopatogeniczny, charakterystyczny dla tego szczepu wirusa. W osobnym zabiegu hoduje się *Pasteurella multocida* i oddzielnie *Pasteurella hemolytica* na agarze albo w ciekłych środowiskach pożywkowych. W razie potrzeby zjadliwość bakterii można zwiększyć, hodując bakterie najpierw na tkankach worków omocznikowego i owodniowego zarodka kurzego albo na tkankach myszy, królików lub świnek morskich. Następnie płon każdej z tych bakterii zbiera się osobno z ich środowisk hodowlanych, mieszając razem porcje płonowego płynu wirusa z odpowiednimi środowiskami zawierającymi bakterie, aby otrzymać osobne żywe mieszaniny: wirus *Pasteurella multocida* oraz wirus *Pasteurella hemolytica*.

Oddzielne mieszaniny wirusowo-bakteryjne doprowadza się w przybliżeniu do jednakowej gęstości leżącej w granicach 5–10-krotnej, a korzystnie około 7–8-krotnej gęstości próbki McFarlanda nr 1, mierzonej typową metodą McFarlanda. Następnie łączy się poszczególne mieszaniny wirusowo-bakteryjne, reguluje wartość pH kombinowanej mieszanek w sposób wyżej podany, po czym mieszanekę tę inaktywuje się i miesza z adiuwantem lub inaktywuje po zmieszaniu z adiuwantem.

Zgodnie z wynalazkiem, można hodowlę Myxovirus parainfluenza-3, hodowlę *Pasteurella hemolytica* i hodowlę *Pasteurella multocida* inaktywować osobno, a następnie mieszać te hodowle przed lub po dodaniu adiuwantu. Korzystnie jest dodawać adiuwant do zinaktywowanej hodowli wirusa jeszcze przed zmieszaniem z zinaktywowanymi hodowlami *Pasteurella hemolytica* i *Pasteurella multocida*. Umożliwia to wykonanie oddzielnych prób dla mieszanin wirusa z bakteriami *Pasteurella he-*

molytica oraz wirus z bakteriami *Pasteurella multocida*, aby określić proporcje hodowli wirusa oraz hodowli *Pasteurella hemolytica* i *Pasteurella multocida* potrzebne do wytworzenia optymalnych mieszanek wirusowo-bakteryjnych. Po zmieszaniu adiuwanta z hodowlą wirusa można dodać obliczone ilości zainaktywowanych hodowli *Pasteurella hemolytica* i *Pasteurella multocida* w celu otrzymania mieszanek szczepionkowej o żądanej gęstości.

Proces według wynalazku korzystnie jest prowadzić w ten sposób, że Myxovirus parainfluenza-3 namnaża się znaną metodą hodowli tkankowej z nerki bydłej tak długo, aż 50—70 % komórek wykaże charakterystyczny efekt cytopatogeniczny, po czym hodowlę tę miesza się z hodowlami bakterii użytymi w ilości nie większej niż 25 % objętościowych otrzymanej mieszanek wirusowo-bakteryjnej. Gęstość tej mieszanek nastawia się tak, aby równała się około 7-8-krotnej gęstości próbki McFarlanda nr 1, a jako adiuwant stosuje się wodną zawiesinę żelu wodorotlenku glinowego, zawierającą około 1—2 % wagowych wodorotlenku glinowego. Otrzymaną mieszaninę miesza się z aldehydem mrówkowym w takiej ilości, aby uzyskać stężenie tego związku wynoszące około 0,075—0,125 % wagowych, a następnie do tak zainaktywanej mieszaniny wirusowo-bakteryjnej dodaje się soli sodowej estru etylortęciowego kwasu salicylowego w ilości około 0,4—0,6 ml 10 % roztworu na 1 litr mieszaniny.

Hodowle posiewowe wirusa Myxovirus parainfluenza-3 stosowane do wytwarzania mieszanek szczepionkowej według wynalazku powinny odpowiadać następującym wymaganiom: wirus powinien wywoływać charakterystyczny efekt cytopatogeniczny w komórkach hodowli tkankowej z nerki bydłej w ciągu 2—5 dni, powinien być neutralizowany swoistą surowicą odpornościową przeciwko parainfluenza-3, powinien powodować hemaglutynację (HA) czerwonych ciałek krwi świnki morskiej, o także hemadsorpcję krwinek czerwonych świnki morskiej w zakażonych hodowlach. Zawierające wirus hodowle posiewowe stosowane podczas wykonania niniejszego wynalazku powinny wykazywać miano zjadliwości (miano HA) 1:40 lub wyższe wobec czerwonych krwinek świnki morskiej oraz miano zakaźności w hodowlach tkankowych z nerki bydłej wynoszące 10^8 na mililitr lub wyższe. Hodowle wirusa kontroluje się jak zwykle na jałowość bakteriologiczną oraz na nieobecność drobnoustrojów z rodzaju wywołujących pleuropneumonię (zapalenie płuc i opłucnej).

Hodowle posiewowe oraz hodowle produkcyjne wirusa namnaża się w szczepach komórek pierwotnych, w szczepach komórek linii tkankowej, albo w szczepach komórek diploidalnych z nerki zarodka lub dorosłego bydła, albo z nerki zarodka lub dorosłej małpy. Szczepy te przygotowuje się przez trypsynowanie tkanek i zawieszenie komórek w zrównoważonym roztworze soli Hanksa i Earle'a, wzbogaconym małą ilością hydrolizatu laktoalbuminy. Środowisko hodowli produkcyjnej może w razie potrzeby zawierać surowicę bydłą, lecz nie jest to konieczne. Jako środki konserwujące

mieszaninę można stosować drobne ilości penicyliny i streptomycyny.

Stosowane naczynia mogą mieć dowolną odpowiednią pojemność. Wynalazcy hodowali wirus w butelkach aptecznych o pojemności od 60 ml aż do 5-litrowych, szklanych butli Povitsky'ego. Hodowlę posiewową wirusa liofilizuje się ze sterylną wodą destylowaną i odpowiednim stabilizatorem.

Środowisko do hodowli produkcyjnej zakaża się w warunkach aseptycznych 4—6 % objętościowych liofilizowanej hodowli posiewowej. W tym środowisku hoduje się wirus aż do osiągnięcia miana wynoszącego co najmniej 10^8 , a najlepiej co najmniej 10^6 zakażonych wirusem komórek w jednym mililitrze. Na przykład odpowiednie miano wirusa można osiągnąć przez inkubowanie w ciągu 2—7 dni w temperaturze około 35—38°C zakażonego wirusem środowiska komórek pierwotnych z nerki bydłej.

Plon wirusa, czyli obciążone nim ciecz z hodowli tkankowej z naczyń wolnych od bakterii i innych zanieczyszczeń zbiera się przez aseptyczne przeniesienie płynów hodowlanych, łącznie z komórkami, bezpośrednio do stadium mieszania z bakteriami albo do odpowiednich naczyń zbiorczych. Ciecz te stosuje się do wymywania środowiska pożywkowego każdego z obu rodzajów bakterii po upływie 2—7 dni od chwili zakażenia nimi tego środowiska. Ciecz zawierającą żywy wirus można stosować natychmiast, albo w razie potrzeby można ją zamrozić i przechować w temperaturze chłodzi lub zamrażalnika, aby zwiększyć otrzymany plon wirusa i zachować ciecz do późniejszego użycia. Aby taka ciecz mogła być użyta do wymywania bakterii zgodnie z wynalazkiem, powinna wykazywać miano HA 1:40 lub wyższe wobec czerwonych krwinek świnki morskiej oraz miano zakaźności wirusowej w tkankowych hodowlach z nerki bydłej wynoszące co najmniej 10^8 cząstek wirusa w 1 ml środowiska.

Posiewowe hodowle drobnoustrojów *Pasteurella* można rozmnażać zwykłymi metodami na pożywkach dostępnych w handlu.

Podczas wytwarzania większych ilości każdego z obu rodzajów bakterii liofilizowaną ampulką każdego szczepu bakterii stosuje się do zakażenia dużych objętości agaru lub bulionu tryptozowego przeznaczonych po 7—24 godzinnym inkubowaniu jako posiew produkcyjny. Ilość posiewu może się zmieniać, zależnie od użytego naczynia. Zazwyczaj stosuje się ilość posiewowej hodowli bakterii na bulionie dostateczną do pokrycia powierzchni agaru. Przy użyciu ciekłych środowisk hodowlanych zakaża się środowisko za pomocą około 1—5 % objętości posiewu w produkcyjnej hodowli na bulionie. Hodowle bakterii inkubuje się w temperaturze około 35—38°C w przeciągu czasu wystarczającym do zwiększenia miana bakterii, co najmniej do 10^7 , a korzystnie do 10^8 zdolnych do życia komórek bakteryjnych w 1 mililitrze.

Jak zaznaczono powyżej, osobne hodowle *Pasteurella hemolytica* oraz *Pasteurella multocida* można mieszać z cieczą z hodowli tkankowej żywego wirusa parainfluenza-3, a następnie mieszaninę inaktywować aldehydem mrówkowym albo też wszystkie trzy hodowle można inaktywować oddzielnie,

7
dodając do nich odpowiednie roztwory aldehydu mrówkowego, następnie pozostawić w spokoju aż do chwili użycia i dopiero wtedy mieszać. Łącząc hodowlę tkankową wirusa z hodowlami bakterii, należy zwrócić uwagę na proporcje cieczy z hodowli wirusa oraz cieczy z hodowlanych bakterii, aby osiągnąć końcową gęstość cieczy wirusowo-bakteryjnej równoważną wyżej wspomnianej gęstości według skali McFarlanda. Aby otrzymać mieszaninę ostateczną o wyżej wskazanej gęstości według skali McFarlanda, można również mieszać z inaktywowaną mieszaniną hodowli wirusa i hodowli bakterii.

Po zmieszaniu cieczy z hodowli tkankowej wirusa z każdą z cieczy z hodowli bakterii, można w każdej z mieszanin wirusowo-bakteryjnych osiągnąć zasadniczo jednakową gęstość za pomocą dodatku cieczy z hodowli tkankowej wirusa albo hodowli bakterii, zależnie od potrzeby. Jeżeli hodowle *Pasteurella* rozmnaża się w środowisku ciekłym, to do rozcieńczenia poszczególnych spłuczyn *Pasteurelli* do żądanej gęstości końcowej stosuje się wystarczającą ilość cieczy z hodowli tkankowej wirusa. W mieszaninie wirusowo-bakteryjnej hodowla *Pasteurelli* nie powinna stanowić więcej niż około 25% objętości.

Jeżeli zgodnie z wynalazkiem po doprowadzeniu oddzielnych mieszanin *Myxovirus parainfluenza-3* — *Pasteurella multocida* oraz *Myxovirus parainfluenza-3* — *Pasteurella hemolytica* do żądanej gęstości miesza się z sobą zasadniczo równe objętości poszczególnych składników, wówczas wartość pH otrzymanej mieszaniny doprowadza się do 6,4—6,8 za pomocą dodatku kwasu, na przykład 0,1 n kwasu solnego, albo zasady, jak na przykład wodorotlenku sodowego. Do tak otrzymanej mieszaniny o nastawionym pH dodaje się adiuwanta zawierającego jon glinowy.

Według wynalazku można również inaktywować trzy hodowle oddzielnie aldehydem mrówkowym, po ustaleniu proporcji hodowli wirusa i hodowli *Pasteurella hemolytica* oraz hodowli wirusa *Pasteurella multocida*, zapewniających żadaną gęstość mieszaniny, określoną na przykład wyżej opisanymi metodami testowymi. Z inaktywowaną hodowlą wirusa można łączyć z mieszaniną adiuwanta zawierającego jon glinowy jeszcze przed zmieszaniem z tą hodowlą określonych ilości hodowli *Pasteurella hemolytica* i *Pasteurella multocida*.

W stadium inaktywacji, czyli zabijania wirusa i bakterii, dodaje się aldehydu mrówkowego w ilości zapewniającej inaktywację wirusa i bakterii bez szkody dla antygenowości wytwarzanej szczepionki. Zazwyczaj wystarcza do tego celu około 0,075—0,125% wagowych aldehydu mrówkowego. Oczywiście aldehyd mrówkowy można stosować w dowolnej postaci zapewniającej zetknięcie się czynnego aldehydu mrówkowego z wirusem i bakteriami, a więc na przykład w postaci trójoksymetyleny, stałego polimeru aldehydu mrówkowego albo kondensatów aldehydu mrówkowego itp., które w środowisku wodnym wydzielają wolny aldehyd mrówkowy. Oczywiście jest również, że preparat formaldehydowy nie powinien zawierać żadnych substancji szkodliwych dla mieszaniny szcze-

8
pionkowej nawet w razie, gdyby jakieś substancje musiały pozostać w mieszaninie.

Inaktywacja wirusa i bakterii zostaje zasadniczo zakończona w ciągu około 6 godzin, jednakże ze względów ostrożności potraktowane formaldehydem hodowle przetrzymuje się co najmniej w ciągu około 24 godzin, lecz nie dłużej niż w ciągu 4 dni w temperaturze pokojowej. Po okresie przetrzymywania można mieszaninę w razie potrzeby zateżyć przez usunięcie części odcieku. Następnie nadmiar aldehydu w wytworzonej mieszaninie szczepionkowej neutralizuje się odpowiednim środkiem wiążącym. Odpowiedni do tego celu jest 10—35% jalowy wodny roztwór wodorosiarczanu sodowego.

Sprawdzanie wirusowego bezpieczeństwa szczepionki polega na zakażeniu 6 próbek jednowarstwowej bydłowej hodowli tkankowej 0,2 mililitrami roztworu 1:30 całkowitego produktu szczepionkowego pobranymi przed dodaniem antyseptyku konserwującego. Te 6 próbek z odpowiednimi próbami kontrolnymi obserwuje się w ciągu 7—9 dni. Jeżeli nie wystąpi efekt cytopatogeniczny, a próby kontrolne pozostaną zasadniczo normalne, to można uznać, że wirus został inaktywowany.

Moc mieszaniny można mierzyć kilkoma metodami. Jedną z nich zwaną metodą zahamowania aktywności hemaglutynacji (H) polega na dobraniu sześciu cieląt w wieku 3—6 miesięcy, których surowica krwi wykazuje miana HI niższe od 1:20 (mierzone standartowymi metodami wobec czerwonych krwinek świnki morskiej) i zakażeniu trojga z tych cieląt za pomocą dwóch domięśniowych wstrzyknięć 10 cm³ dawek szczepionki bakteryjnej w odstępach 2—3 tygodni. Wszystkie 6 cieląt w okresie badania trzyma się w jednej oborze. Po upływie 2—3 tygodni od drugiego wstrzyknięcia od wszystkich sześciorga cieląt pobiera się krew. Porównanie miana aktywności HI z badań przed- i poszczepiennych próbek surowicy krwi powinny wykazać konwersję miana HI surowicy na 1:80 lub więcej u cieląt szczepionych, a tylko nieznaczny wzrost miana surowicy u cieląt nie szczepionych. Moc mieszaniny można również oznaczać kontaktując szczepione i nie szczepione cielęta z kombinacją wirusa *Myxovirus parainfluenza-3* oraz hodowli *Pasteurella multocida* i *Pasteurella hemolytica*, podawaną jako aerosol albo drogą śródchawiczną lub inną odpowiednią drogą.

Objawy gorączki transportowej takie, jak podniesiona temperatura, kaszel i katar nie powinny wystąpić u cieląt szczepionych, natomiast powinny wyraźnie wystąpić u kontrolnych cieląt nie szczepionych. Moc można również oznaczać za pomocą testu neutralizacji odpowiedniej surowicy (SN) albo za pomocą porównania konwersji miana HI na świnkach morskich. Na konwersję serologiczną u świnek morskich wskazuje 10-krotny wzrost średniej geometrycznej miana GMT u szczepionych świnek morskich w porównaniu z niewielkim wzrostem GMT u nie szczepionych kontrolnych świnek morskich.

Charakterystyczne dla *Pasteurelli* właściwości antygenowe mieszaniny szczepionkowo-bakteryjnej według wynalazku można stwierdzić niżej opisanymi metodami.

Myszkom szwajcarskim o wadze 15–20 gramów dwa razy wstrzyknięto podskórnie po 0,2 ml gotowego produktu. Przerwa między obu wstrzyknięciami wynosiła 10–14 dni. W ciągu 7–14 dni po drugim wstrzyknięciu jednakowe liczby szczepionych i nie szczepionych myszek potraktowano 10-krotnymi rozcieńczeniami zjadliwej hodowli bulionowej *Pasteurella multocida*. Zarówno myszki szczepione, jak i kontrolne, dzieli się na grupy rozcieńczeniowe liczące po 5 albo więcej myszek. Co najmniej dwie grupy rozcieńczeniowe stosuje się dla myszek szczepionych i kontrolnych. Okres obserwacji po zarażeniu wynosi 7 dni. Punkty graniczne dawek powodujących 50% śmiertelność (LD) oblicza się zarówno dla myszek szczepionych jak i kontrolnych metodą Reeda i Muencha. Wynik testu uważa się za zadowalający, jeżeli LD₅₀ dla myszek szczepionych jest co najmniej o 2 logarytmy niższy od LD₅₀ dla myszek nie szczepionych.

Ilość szczepionki zalecana dla bydła wynosi co najmniej jedną dawkę 2–15 cm³ wstrzykiwaną domięśniowo albo podskórnie. Najlepiej jednak stosować dwie dawki około 10 cm³ z przerwą 1–4 tygodni między dwoma wstrzyknięciami.

Mieszankę szczepionkową według niniejszego wynalazku można włączać do skojarzonych mieszanek antygenowych umożliwiających jednocześnie uodpornienie bydła przeciwko dwum lub więcej chorobom. Takie kombinacje można robić na przykład z antygenami dla gatunku *Brucella*, gatunku *Clostridium* dla wirusa wirusowej biegunki bydłej (BVDV), dla bydłowego zakaźnego zapalenia błon śluzowych nosa i tchawicy (rhinotra cheitis) (IBR) itp.

Wynalazek wyjaśniono bardziej szczegółowo w poniższych przykładach. Przykłady I i II ilustrują wytwarzanie kombinowanych szczepionek według wynalazku. Sposób postępowania według przykładu II jest szczególnie odpowiedni do produkcji szczepionki na skalę handlową.

Przykład I. Przygotowanie wirusa. użytym wirusem jest hodowla wirusa Myxovirus parainfluenza-3, wyosobnionego przez R.S. Reisingera i zwanego zazwyczaj szczepem SF-4.

Hodowle posiewowe i produkcyjne Myxovirus parainfluenza-3 namnażano na jednowarstwowych hodowlach komórek z nerki zarodka bydłowego (BK), otrzymanych za pomocą trypsinowania i rozproszenia w zróżnicowanym roztworze soli Hanksa wzbogaconym 0,5% hydrolizatu laktoalbuminy i surowicą bydłą. Jako środki konserwujące zastosowano penicylinę i sterptomycynę.

Hodowle produkcyjne Myxovirus parainfluenza-3 prowadzono w 5-litrowych pyrexowych butlach Povitsky'ego. Użyta objętość posiewu stanowiła w przybliżeniu 5% objętości środowiska w butli produkcyjnej. Butle hodowlane zawierające posiew inkubowano w temperaturze 35–37°C w ciągu 3–5 dni albo dopóty, aż 65% zakażonych komórek wykazało odczyny cytopatogeniczne, charakterystyczne dla szczepu wirusa SF-4. Ciecze z hodowli tkankowej dostatecznie obciążone wirusem przeniesiono aseptycznie do zbiorników zlewanych. Plon hodowli tkankowej wirusa zebrany po upływie 3–7 dni po zakażeniu zastosowano nas-

tępnie, jak opisano poniżej, do zebrania z agaru hodowli dwóch różnych *Pasteurelli*.

Porcja bakterii *Pasteurella*. Hodowle posiewowe szczepu *Pasteurella multocida* P 1062 oraz szczepu *Pasteurella hemolytica* P 1148 hodowano osobno w ciągu 8–12 godzin w temperaturze 37°C na bulionie tryptozowym. Tymi posiewowymi hodowlami bakterii użytymi w objętości 0,1 ml zakażono 8–10-dniowe zarodki kurze, wprowadzając inoculum do worków omoczninowego i owodniowego. Po inkubacji trwającej w przybliżeniu 24 godziny (w ciągu tego okresu połowa zarodków obumarła) jaja ochłodzono i zmieszano płyny omoczninowy i owodniowy. Każdą z cieczy zawierających zebrany szczep bakterii poddano osobno liofilizacji. Te hodowle użyto jako inocula posiewowe.

Fiolkę każdego z powyższych szczepów bakterii przygotowano na tryptozonowym bulionie. Po inkubacji w ciągu 10–12 godzin w temperaturze 37°C hodowle te użyto do zakażenia bulionu tryptozowego, przeznaczonego następnie do zakażenia agaru. Po 12–15 godzinach inkubacji hodowlami tymi zakażono poszczególne podłoża agarowe, stosując ilość hodowli na tryptozowanym bulionie dostateczną do pokrycia całej powierzchni agaru. Był to agar skrobiowy z dodatkiem 1,5% agaru. Te produkcyjne hodowle agarowe inkubowano w temperaturze 37°C w ciągu 15–18 godzin po zakażeniu.

Z butli zawierających produkcyjną hodowlę bakterii po upływie 12 do 48 godzin zebrano plon, sphukując hodowle agarowe cieczą zawierającą plon hodowli tkankowej Myxovirus parainfluenza-3, użytym w dostatecznej ilości do usunięcia bakterii z agaru. Spłukiwanie prowadzono w taki sposób, aby otrzymać osobno mieszaninę wirusa i *Pasteurella hemolytica* oraz osobno mieszaninę wirusa i *Pasteurella multocida*.

Gęstość każdej z tych mieszanin doprowadzono do 7,5-krotnej gęstości próbówki nr 1 według skali McFarlanda przez dodanie cieczy z plonem hodowli tkankowej Myxovirus parainfluenza-3 a następnie połączono równe objętości mieszanin. W otrzymanej mieszaninie doprowadzono pH do wartości $6,6 \pm 0,2$ za pomocą 0,1 n kwasu solnego, a następnie zmieszano z żelazem wodorotlenku glinowego, zawierającym w przeliczeniu 1,3% Al₂O₃, biorąc na 100 ml mieszaniny hodowlanej 20 ml żelu wodorotlenku glinowego. Mieszaninę żelu z mieszaną hodowlaną wstrząsano w ciągu 15 minut, aby zapewnić równomierne rozproszczenie składników. Następnie dodano formaliny (38% wodny roztwór aldehydu mrówkowego) w postaci 10% wodnego roztworu formaldehydu tak, aby ostateczne stężenie formaliny w mieszaninie wynosiło 0,1% i wstrząsano całość w ciągu dalszych 15 minut. Tak potraktowaną mieszaninę przechowano, pozwalając jej reagować w ciągu 24 godzin w temperaturze pokojowej, a następnie skoncentrowano, zlewając w przybliżeniu połowę górnej warstwy cieczy nad osadu bakteryjnego.

Nadmiar aldehydu w pozostałej mieszaninie wirus — bakterie — żel wodorotlenku glinowego zobjętniono 35% jałowym wodnym roztworem wodorosiarczynu sodowego, po czym pobrano próbki produktu w celu zbadania na sterylność bakterio-

logiczną według wymagań standartowych i zapewnienia inaktywacji zawartych w nim wirusa i bakterii. Do całości produktu dodano soli sodowej estru etylortęciowego kwasu salicylowego w postaci 10% roztworu, biorąc 0,5 ml na litr produktu. Tak otrzymany produkt przechowywano w temperaturze chłodni aż do czasu napełnienia pojemników ostatecznych.

Sprawdzanie bezpieczeństwa wirusowego wykonano, zakazając 6 próbek hodowli jednowarstwowych tkanki bydłej za pomocą 0,2 ml rozcieńczenia 1:50 produktu całkowitego (jeszcze przed dodaniem do niego soli sodowej estru etylortęciowego kwasu salicylowego). Te 6 próbek oraz odpowiednie próbki kontrolne obserwowano w ciągu 7—9 dni. Nie stwierdzono efektu cytopatogenicznego (CPE) w naczynkach zaszczipionych, a również i kontroli pozostały zasadniczo normalne. W ten sposób stwierdzono inaktywację wirusa.

Przykład II. Środowisko do hodowli wirusa parainfluenza-3 oraz sposób namnażania wirusa.

Trypsynowane komórki hodowli tkankowej zarodka bydłego (BKTC), wyekstrahowane z korowych części nerek zawieszono w odpowiednim dla nich środowisku wzrostowym, inkubowano w temperaturze 35°C — 37°C dopóty, aż komórki BKTC stały się splewne. Odciek z środowiska wzrostowego odrzucono i zastąpiono podobnym środowiskiem wzrostowym, lecz zawierającym 1 ml posiewu żywego wirusa parainfluenza-3 (szczep SF-4) na każde 99 ml danego środowiska. Hodowle tkankowe BKTC zakażone w ten sposób wirusem inkubowano w temperaturze 35—37°C dopóty, aż dający się zaobserwować efekt cytopatogeniczny (CPE) osiągnie 65 do 100%, co następuje zwykle po 48—96 godzinach po zakażeniu wirusem. Środowiska komórkowe, zawierające wirus, zebrano razem z kilku naczyń. Po pobraniu próbek do oznaczenia miana HA, odmiareczkowania wirusa, oznaczenia gęstości, całość środowiska wzrostowego z żywym wirusem parainfluenza-3 inaktywowano za pomocą traktowania rozcieńczonym roztworem aldehydu mrówkowego (formalina handlowa), użytym w ilości dostatecznej, aby zapewnić stężenie równe około 1 części aldehydu mrówkowego na 1000 części zawiesiny wirusa.

Jeszcze przed dodaniem roztworu aldehydu mrówkowego do środowiska zawierającego wirus, rozcieńczono go dalej do stężenia 10% za pomocą środowiska utrzymującego BKTC. Środowisko wirusa parainfluenza-3 potraktowano aldehydem mrówkowym, mieszano mechanicznie w sposób energiczny jeszcze w ciągu około 15 minut. Środowisko wzrostowe użyte do rozmnażania komórek stanowiło mieszaninę: 24 g soli sodowej kwasu fenoloftaleinosulfonowego, 8,160 kg chlorku sodowego, 480 g chlorku potasowego, 246 g siarczanu magnezowego, 172,8 g jednozasadowego fosforanu sodowego, 1,2 kg dekstrozy, 318 g chlorku wapniowego, 6 kg hydrolizatu laktoalbuminy, 672 g wodorowęglanu sodowego, 8,3 g krystalicznej penicyliny G, 120 g siarczanu streptomycyny oraz dostateczną ilość wody tak, aby objętość całości wynosiła 1266 litrów. Mieszaninę mieszano mechanicznie w ciągu 10 minut, wyjałowiono w temperatu-

rze 120°C w ciągu 4 godzin, ostudzone do temperatury pokojowej i przed użyciem dodano do niej 24 litry surowicy bydłej.

Środowisko utrzymujące zawierało takie same składniki jak środowisko wzrostowe, z wyjątkiem soli sodowej kwasu fenoloftaleinosulfonowego, przy czym zamiast 672 g wodorowęglanu sodowego zawierało 2,664 kg tej soli, natomiast nie zawierało surowicy bydłej.

Pasteurella hemolytica. Hodowlę posiewową *Pasteurella hemolytica* prowadzono najpierw na tryptozowanych i tiaminowanych płytkach agarowych, inkubowano w temperaturze 35°C w ciągu 16—36 godzin, a po tym użyto do zakażenia tą bakterią tryptyzowanych i tiaminowanych hodowli bulionowych. W hodowlach bulionowych inkubowano *Pasteurella hemolytica* w ciągu 6—18 godzin w temperaturze 35°C. Po wykonaniu prób na nieobecność zanieczyszczeń zawartość kilku hodowli bulionowych *Pasteurella hemolytica* zebrano razem do sterylnych zbiorników i użyto jako hodowle posiewowe dla większych hodowli tego drobnoustroju. W razie potrzeby można *Pasteurella hemolytica* hodować w aparacie obrotowym, albo jak w niniejszym przykładzie — w dużych butlach wstrząsanych podczas inkubowania.

Środowisko wzrostowe zakażono hodowlą posiewową *Pasteurella hemolytica*, stosowaną w ilości stanowiącej około 3% objętości płynu hodowli produkcyjnej. Hodowle produkcyjne inkubowano w ciągu 18—24 godzin w temperaturze 35°C na trzęsawce. Następnie przeniesiono hodowle produkcyjne do wyjałowionych zbiorników. Gęstość hodowli *Pasteurella hemolytica* oznaczono za pomocą fotometru z filtrem zielonym, przyjmując za 100% przepuszczenie światła przez jałową pożywkę dla *Pasteurella hemolytica*. Fotometr skorelowano uprzednio tak, aby wskazywał gęstość o wartościach 7-8 według skali McFarlanda. Tak otrzymaną *Pasteurella hemolytica* inaktywowano za pomocą dodatku roztworu aldehydu mrówkowego. Następnie inkubowano ją w ciągu 48—72 godzin w temperaturze 53°C. Tak zainaktywowany produkt przechowywano w chłodni (5°C) aż do chwili użycia jej do wytwarzania mieszanki szczepionkowej według niniejszego wynalazku.

Środowisko wzrostowe do hodowania *Pasteurella hemolytica* składało się z 3,6 kg sproszkowanej mieszanki proteinowowitaminowej, wytworzonej za pomocą trawienia trypsyną kazeiny, 1,8 kg wyciągu drożdżowego, 1,2 kg tryptonu, 120 g siarczanu magnezowego, 324 g jednozasadowego fosforanu potasowego, 912 g dwuzasadowego fosforanu sodowego, 960 g dekstrozy w 90 litrach wody, do której dodano autolizatu drożdży i którą ogrzano do 45°C. Następnie wartość pH środowiska doprowadzono do 7,2—7,3 za pomocą 1 N roztworu wodorotlenku sodowego, a po tym dopełniono całość wodą do objętości 120 litrów.

Pasteurella multocida. *Pasteurella multocida* rozmnożono, jak opisano powyżej dla *Pasteurella hemolytica* z tą różnicą, że środowisko wzrostowe zawierało 480 gramów sacharozy zamiast dekstrozy. Po inkubowaniu i rozmnożeniu *Pasteurella multocida* oraz oznaczeniu gęstości przy użyciu fotometru, dodano do hodowli *Pasteurella multocida*

w celu inaktywacji bakterii roztworu aldehydu mrówkowego.

Osobne próby wykonano z małymi ilościami mieszanin inaktywowanej hodowli wirusa parainfluenza-3 oraz inaktywowanej hodowli *Pasteurella hemolytica*, aby oznaczyć proporcje każdego z tych składników potrzebne do wytworzenia mieszaniny o żądanej gęstości optycznej według skali McFarlanda.

Przed zmieszaniem inaktywowanego wirusa z inaktywowanymi hodowlami bakterii, hodowlę wirusa zmieszano z wyjałowioną 1,3% zawiesiną tlenku glinowego, biorąc jej 360 ml na litr hodowli wirusa i mieszając w ciągu 15 minut. Następnie do potraktowanej tlenkiem glinowym inaktywowanej hodowli wirusa dodano potrzebne ilości hodowli *Pasteurella hemolytica* i *Pasteurella multocida* i mieszano w ciągu 15 minut. Powstałą mieszaninę przechowywano w temperaturze 30°C w ciągu 24 godzin, po czym zdekantowano objętość odcieku odpowiadającą sumie objętości hodowli bakteryjnych oraz około 20% łącznej objętości mieszaniny hodowli wirusa z zawiesiną tlenku glinowego.

W otrzymanej stężonej zainaktywowanej mieszaninie wirus parainfluenza-3, *Pasteurella hemolytica* i *Pasteurella multocida*, zawierającej jon glinu zobojętniono aldehyd mrówkowy 35% roztworem wodorosiarczynu aż do osiągnięcia punktu końcowego wobec odczynnika Schiffa.

Podczas mieszania mieszaniny dodano aseptycznie tymerosalu w stosunku 0,5 ml na litr szczepionki. Aby oznaczyć sterylność całości pobrano próbki. Moc *Pasteurella multocida* oznaczono na myszach, moc wirusa — na świnkach morskich oraz moc wirusa — na cielętach. Całość szczepionki przechowywano w temperaturze 5°C aż do chwili umieszczenia w opakowaniu.

Zawiesinę tlenku glinowego użytą powyżej przygotowano w następujący sposób: dostępny w handlu żel tlenku glinowego rozcieńczono wodą destylowaną wolną od produktów pyrogenu i otrzymaną zawiesinę przepuszczono przez młyn Eppenbacha w celu rozdrobnienia cząstek żelu. Tak otrzymaną wodną zawiesinę żelu wyjałowiono, a następnie ochłodzono do temperatury pokojowej. Ostateczne stężenie żelu tlenku glinowego obliczono tak, aby zawiesina zawierała w przybliżeniu 1,3% wagowych tlenku glinowego (Al_2O_3).

Przykład III. Na cielętach i na świnkach morskich przebadano cztery serie mieszanek szczepionkowych według przykładu I, zarówno w stanie stężonym (to jest po zdekantowaniu połowy odcieku przed zobojętnieniem za pomocą $NaHSO_3$), jak i w stanie niestężonym, posługując się metodą oznaczania miana zahamowania hemaglutynacji (miana HI), jak i w stanie niestężonym, posługując się metodą oznaczania miana zahamowania hemaglutynacji (miana HI).

W tej próbie zakażono cielęta za pomocą śródmięśniowego wstrzyknięcia dwóch 10 ml porcji produktu szczepionkowego stosując 3-tygodniową przerwę między wstrzyknięciami. Niektóre cielęta zostały zakażone niestężoną mieszaniną, inne — mieszaniną stężoną. Świnkom morskim podano dawki równoważne o objętości 1 ml, stosując taki sam odstęp

między wstrzykiwaniami. Przygotowano również odpowiednie niezakażone kontrolne cielęta i świnki morskie. Wyniki miana zahamowania hemaglutynacji zebrano od wszystkich cieląt i świnek morskich. Wartości miana dla czterech serii badanej szczepionki zestawiono w poniższej tablicy:

Tablica

Nr serii	Szczepionka	Cielęta a	świnki morskie b	świnki morskie b
			(Nebraska)	(Indiana)
1	—(kontrolna)	7d	22	5d
	Niestężona	160	49	132
	Stężona	508	113	236
2	—(kontrolna)	0	9	—
	Niestężona	807	32	132
	Stężona	508	60	539
3	—(kontrolna)	25	10	—
	Niestężona	807	103	321
	Stężona	320	198	906
4	—(kontrolna)	160	11	—
	Niestężona	807	297	202
	Stężona	255	260	260

Znaczenie symboli literowych:

a — średnia z trzech cieląt

b — średnia z 8–10 świnek morskich

c — każda z liczb oznacza drugą liczbę w stosunku miana HI 1 : N, gdzie N jest liczbą w tablicy

d — tylko jedną klatkę zwierząt kontrolnych z Indiany użyto do badania, lecz przebadano na nich wszystkie cztery serie jednocześnie.

Te oraz inne dane ilustrują moc mieszanek szczepionkowej według wynalazku oraz świadczą o tym, że zarówno świnki morskie jak i cielęta można stosować do mierzenia skuteczności szczepionki. Odkrycie to zostało potwierdzone również za pomocą analizy statystycznej.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania mieszanek szczepionkowej przeciw gorączce transportowej bydła, zawierającej inaktywowaną mieszaninę wirusa Myxovirus parainfluenza-3 oraz drobnoustrojów *Pasteurella* z dodatkiem adiuwanta, **znamienny tym**, że jako adiuwant do mieszaniny hodowli Myxovirus parainfluenza-3, hodowli *Pasteurella multocida* i hodowli *Pasteurella hemolytica* dodaje się żel wodorotlenku glinowego, tlenek glinowy w postaci zdyspergowanej lub fosforan glinowy, przy czym ilość adiuwanta dobiera się tak, aby otrzymać preparat zawierający jony glinu w ilości chemicznie równoważnej stężeniu otrzymanemu przez dodanie około 10–50 ml wodnej zawiesiny o zawartości 1,3% wagowo Al_2O_3 na 100 ml hodowli drobnoustrojów i aby preparat ten wykazywał gęstość 5–10-krotnie wyższą niż próbka McFarlanda nr 1 według skali testu metodą McFarlanda, przy czym drobnoustroje przed wprowadzeniem adiuwanta lub po jego wprowadzeniu poddaje się pojedynczo lub w mieszaninie inaktywacji znanym środkiem inaktywującym, a następnie zobojętnia się ewentualnie nadmiar środ-

ka inaktywującego, a do preparatu dodaje w ilościach bakteriostatycznych i fungistatycznych antyseptyk, dopuszczalny do stosowania pozajelitowego.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako środek inaktywujący stosuje się aldehyd mrówkowy.

3. Sposób według zastrz. 1 i 2, **znamienny tym**, że nadmiar środka inaktywującego zobojętnia się wodnym roztworem wodorosiarczynu metalu alkalicznego.

4. Sposób według zastrz. 1–3, **znamienny tym**, że wartość pH połączonej mieszanki wirusowo-bakteryjnej nastawia się na 6,4–6,8 przed zmieszaniem mieszanki z adiuwantem.

5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że ciętkłą hodowlę tkankową wirusa Myxovirus parainfluenza-3 zamraża się przed zmieszaniem jej z hodowlami bakterii.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że

Myxovirus parainfluenza-3 namnaża się znaną metodą hodowli tkankowej z nerki aż 50–70% komórek wykaże charakterystyczny efekt cytopatogeniczny, po czym hodowlę tę miesza się z hodowlami bakterii, użytymi w ilości nie większej niż 25% objętościowych otrzymanej mieszanki wirusowo-bakteryjnej, której gęstość nastawia się tak, aby równała się około 7–8-krotnej gęstości próbówki McFarlanda nr 1, a jako adiuwant stosuje się wodną zawiesinę żelu wodorotlenku glinowego, zawierającą około 1–2% wagowych wodorotlenku glinowego i otrzymaną mieszaninę miesza się z aldehydem mrówkowym w takiej ilości, aby uzyskać stężenie tego związku wynoszące 0,075–0,125% wagowych, po czym do tak zinaktywowanej mieszaniny wirusowo-bakteryjnej z adiuwantem dodaje się soli sodowej estru etylortęciowego kwasu salicylowego w ilości około 0,4–0,6 ml 10% roztworu na 1 litr produktu.