



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202 789

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 03 10 78
(21) PV 6386-78

(51) Int. Cl.³ A 61 K 39/155

(40) Zveřejněno 30 05 80
(45) Vydáno 01 06 83

(75)

Autor vynálezu KRUPKA VRATISLAV MVDr., IVANOVIC NA HANÉ,
JIRAN EDUARD MVDr., CSc., LITOMĚŘICE a
DEDEK LADISLAV MVDr., OPAVA

(54) Vakcína proti myxomatóze králíků živá MXT a způsob její výroby

1

Vynález se týká vakcíny proti myxomatóze králíků živé MXT a způsobu její přípravy z patogenního kmene a je určena k vakcinaci králíků všech kategorií.

Myxomatóza králíků po svém rozšíření na evropském kontinentě po roce 1950 působí stále velké ztráty na domácích i divokých králících. V minulosti byla propracována úspěšná cesta imunizace a v některých zemích byla i zavedena ochrana na základě interferenční imunity proti myxomatóze pomocí Shopeho fibromu. /Jacotot, A., Vallee, A. a Virat, B., 1955, Ann. Inst. Pasteur, 88, s. 381 - 383; Rowe, B., Mansi, W. a Hudson, J.R., 1956, J. Comp. Path. Therap., 66, s. 290 - 298/.

Rovněž v Československu se k prevenci myxomatózy používá vakcína, připravená z orgánové suspenze králíků, obsahující Shopeho virus fibromatózy. /Mádr, V., Macura, B., Petlach, J., 1967, Immunoprofylaxia, ČSSR, 2, s. 90 - 96/.

Řada zahraničních experimentálních prací, věnovaných aktivní imunizaci králíků proti myxomatóze, prokázala nevhodnost použití vakcín, vyrobených z inaktivovaného viru nebo chemickou cestou oslabeného. /Mc Kerchner, D.G., 1952, Amer. J. Vet. Res., 13, s. 425 - 429; Sanchis-Bayarri, V., Resende, M. a Garcia-Martines, A., 1953, Bull. Acad. Vet. France, 26, s. 361 - 365/

Podrobnou práci o modifikaci viru myxomatózy a jeho vlastnostech zveřejnil Saito, J. K., Mc Kerchner, D.G. a Castrucci, G., 1964, J. Inf. Dis., 114, s. 417 - 428, kde uvádí dobrou účinnost a neškodnost modifikovaného kmene. Jacotot, A., Virat, B., Reculard, P., a Vallee, A., 1967, Ann. Inst. Pasteur, 113, s. 221 - 237 zjistili u Saitova kmene, že nebyl zcela neškodný pro králíky.

Jiran, E., Sladká, M., Kunštýř, I., 1970, Zbl. Vet. Med., B 17, s. 418 - 428 zjistili u Saitova kmene, že není rovněž zcela neškodný. Podařilo se jim však po 12 pasážích na buněčných liniích oslabit jej natolik, že nezpůsobil konjunktivální reakce a po 35 pasážích ani reakce po i.d. aplikaci králíkům. Virus nebylo možné použít k výrobě vakcíny proto, že nebylo možné jej dokonale stabilizovat a nebyly rovněž dostatečné podklady o jeho dokonalé neškodnosti a o formách aplikace.

Virus v 55. pasáži byl lyofilizován a pak skladován při +4 °C po dobu 8 let. Z takto skladovaného viru pak bylo provedeno 7 pasáží na buněčných kulturách kory králíčí ledviny. Tímto postupem byl získán plně apatogenní virus při zachování imunizačních vlastností. Lyofilizací stabilizovaný a vlivem nového prostředí změněný virus se stává součástí tohoto vynálezu a je uložen v Čs. sbírce mikroorganismů - Sbíre zoonozogenních mikroorganismů Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, Hudcova 60, Brno - Medlánky.

Uvedené nedostatky odstraňuje vakcína připravená podle tohoto vynálezu. Tato vakcína je představována apatogenním vakcinačním virem myxomatózy kmene CAPM V-219, ke kterému se přidává protektivní médium a je v lyofilizovaném stavu, čímž je zajištěna vysoká stabilita preparátu po dlouhou dobu skladování. Vakcína je expedována tak, že v 1 balení je lyofilizovaný vakcinační virus a v jedné lékovce je zředovač. Před vlastní aplikací se lyofilizovaný virus rozpustí ve zředovači. Vakcínou se imunizují králíci s.c. v dávce 1 cm³ nebo perorálně v dávce 2 cm³.

K přípravě vakcíny se používá apatogenní vakcinační kmen viru myxomatózy sbírkové číslo CAPM V-219 o titru 10⁴ až 10⁷ TKID₅₀ v 1 cm³ v lyofilizovaném stavu, který se před použitím rozpustí ve zředovači, který je představován pufrovaným fyziologickým roztokem.

Vakcinační virus se pomnožuje na buněčných kulturách králíčích tkání při teplotě 32 až 34 °C po dobu 36 až 96 hodin, pokud se cytopatogenní efekt nerozšíří na 80 - 100 % plochy buněčného porostu. Pro pomnožování viru je možno použít primární, diploidní i liniové buňky králíčí, zpravidla odvozené z kory ledviny zpravidla po dobu 36 až 48 hodin po infekci kultur.

Vakcínu představuje suspenze apatogenního viru, minimální esenciální médium, lyofilizační médium a zředovač.

- 1/ Apatogenní vakcinační virus myxomatózy CAPM V-219
- 2/ Monolayer buněk kory králíka
- 3/ Minimální esenciální médium
- 4/ Antibiotika

5/ Lyofilizační médium

6/ Zředovač k vakcíně

ad 1/ Pro výrobu vakcíny proti myxomatóze králíků živé MXT je používán atenuovaný kmen viru myxomatózy, sbírkové číslo CAPM V-219, uložený v Čs. sbírce mikroorganismů - Sbírce zoopatogenních mikroorganismů Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, Hudcova 60, Brno - Medlánky.

ad 2/ Buněčnou kulturu představují primární nebo liniové buňky kory králičí ledviny.

ad 3/ Minimální esenciální médium růstové:

Minimální esenciální médium	900 cm ³
Sérum bovinní ultrafiltrované	100 cm ³
Zásobní roztok neomycinu	1 cm ³
Zásobní roztok penicilinu	10 cm ³
Zásobní roztok fungicidinu	3 cm ³
7,5% roztok NaHCO ₃	10 cm ³

Uvedené složení je příkladem a obsah 7,5% roztoku NaHCO₃ je možno měnit od 10 do 20 cm³.

Minimální esenciální médium udržovací:

Minimální esenciální médium	1000 cm ³
Zásobní roztok neomycinu	1 cm ³
Zásobní roztok penicilinu	10 cm ³
Zásobní roztok fungicidinu	3 cm ³
7,5% roztok NaHCO ₃	10 cm ³

Uvedené složení je příkladem, je možno měnit koncentraci antibiotik a množství 7,5% roztoku NaHCO₃ od 10 do 30 cm³.

ad 4/ Pro růstová a udržovací média jsou použita antibiotika v těchto konečných koncentracích:

Draselná sůl penicilinu	320 m.j./1 cm ³
Síran neomycinu	50 /ug /1 cm ³
Fungicidin	50 /ug /1 cm ³

Koncentrace penicilinu je možno používat od 100 do 500 m.j. na 1 cm³ média.

ad 5/ Složení lyofilizačního média:

Želatina	50 g
Sacharóza	75 g
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	38,2 g
KH ₂ PO ₄	0,49 g
Voda destilovaná ad	1000 cm ³

ad 6/ Složení zředovače:

NaCl	8 g
KCl	2 g

202 789

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2,38 g
KH_2PO_4	0,2 g
Voda destilovaná ad	1000 cm^3

Popis příkladu provedení

Narostlý monolayer buněčné kultury v minimálním esenciálním médiu s 10 % séra bovinního ultrafiltrovaného inaktivovaného se infikují apatogenním vakcinačním kmenem viru myxomatózy CAPM V-219 v udržovacím minimálním esenciálním médiu bez séra v dávce 0,25 až 0,5 TKID₅₀ na buňku tak, že se virus přidá do média a tato směs média a viru se napouští do kultivační nádoby s buněčným porostem /po předchozím odstranění růstového média/ v množství 100 až 120 cm^3 . Infikované kultury se inkubují při 33 °C po dobu 36 až 96 hodin, zpravidla 36 až 48 hodin až dojde k rozrušení buněčného porostu cytopatogenním působením viru na 80 až 100 % plochy. Pak se provede sklizeň viru, jeho titrace, zkoušky na bakteriologickou sterilitu a do jejich ukončení před zpracováním viru na vakcínu se skladuje v zamraženém stavu při -20 °C až -70 °C. Sklizený virus musí mít minimální titr viru 10³ TKID₅₀ v 1 cm^3 .

Před kompletací vakcíny se virus rozmrazí, smíchá s tekutým lyofilizačním médiem v poměru 2 díly viru a 1 díl lyofilizačního média, rozplní se do lékovek, provede se zamražení a lyofilizace. Lyofilizovaná vakcína je pak uzavřena pod gumovou zátkou ve vakuované lékovce.

K vakcíně se připraví sterilní zředovač, který se rozplní do lékovek. Před aplikací vakcíny králíkům se lyofilizát rozpustí ve zředovači, protřepe se a vakcína se aplikuje králíkům podkožně nebo per os. U každé vyrobené šarže vakcíny jsou prováděny kontrolní zkoušky neškodnosti, účinnosti a bakteriální sterility.

Výsledky pokusů:

Tabulka - 1 Zkoušky neškodnosti na králících

Způsob aplikace	Dávka vakcíny cm^3	Násobek překročení vakc. dávky	Počet zvířat	Reakce v průběhu sledování po dobu 21 dnů
Podkožně	2	1 x	2	bez reakcí
Vnitrokožně	4 x 0,25	-	2	bez reakcí
Podkožně	1	-	8	bez reakcí
Podkožně	40 rozděleně	40 x	4	bez reakcí

Při zkouškách neškodnosti ani po 40 násobné vakcinační dávce nedošlo u vakcinovaných králíků k onemocnění myxomatózou.

Tabulka - 2 Zkouška účinnosti po podkožní aplikaci

Způsob aplikace	Dávka vakcíny cm ³	Členžní dávka viru myx.	Počet zvířat	Výsledek po členžní	
				přežilo	onemocnělo
Podkožně	1	1000 ID ₅₀	8	8	0
Nevakc. kontroly	-	1000 ID ₅₀	2	0	2

Vakcinační dávka 1 cm³ vakcíny zajišťuje 100 % ochranu králíkům při členžní 1000 ID₅₀ plně virulentního viru myxomatózy.

Tabulka - 3 Stanovení počtu protekčních dávek v 1 vakcinační dávce

Ředění vakcíny	Vakcinační dávka cm ³	Doba členže	Počet králíků	Výsledek po členžní	
				přežilo	onemocnělo
10 ⁰	1 cm ³ podkožně	9. den po vak-	3	3	0
10 ⁻¹	příslušného ře-	cinaci členž	3	3	0
10 ⁻²	dění vakcíny	1000 ID ₅₀ plně	3	3	0
10 ⁻³		virulentního	3	0	3
10 ⁻⁴		viru myxomatózy	3	0	3
10 ⁻⁵			3	0	3
Kontroly			2	0	2

1 vakcinační dávka obsahuje v 1 cm³ 316 PD₅₀ /protekčních dávek/ proti 1000 ID₅₀ plně virulentního viru myxomatózy.

K pokusům uvedeným v popisu tohoto vynálezu bylo použito vakcíny připravené z viru o titru 10⁶ TKID₅₀ v cm³.

Uvedená vakcína rozšiřuje sortiment přípravků pro prevenci myxomatózy a je jednou z prvních vakcín z apatogenních kmenů myxomatózy.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

- 1/ Vakcína proti myxomatóze králíků živá MXT, vyznačující se tím, že obsahuje apatogenní kmen viru myxomatózy králíků /Myxoma virus/ CAPM V-219 o titru 10⁴ až 10⁷ TKID₅₀ v 1 cm³ v lyofilizovaném stavu a zředovač.
- 2/ Vakcína podle bodu 1, se vyznačuje tím, že zředovač je tvořen 8 g chloridu sodného, 2 g chloridu draselného, 2,38 g hydrofosforečnanu sodného do 1 dkg hydrátu Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 0,2 g dihydrofosforečnanu draselného KH₂PO₄, doplněném destilovanou vodou na 1 litr.
- 3/ Způsob výroby vakcíny podle bodu 1, vyznačující se tím, že se kmen viru myxomatózy CAPM V-219 pomnožuje na buněčných kulturách z králíčích tkání při teplotě 32 až 34 °C po dobu 36 až 96 hodin, pokud se nedosáhne 80 až 100 % cytopatogenní efekt.

202 788

- 4/ Způsob výroby vakcíny podle bodu 3 a 4, vyznačující se tím, že kmen viru se pomnožuje na primárních, diploidních a liniových buňkách kory ledviny králíka.
- 5/ Způsob výroby vakcíny podle bodu 3, 4, 5, vyznačující se tím, že doba pomnožení viru je 36 až 48 hodin.