



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

213 847

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 15 01 80
(21) PV 295 - 80

(51) Int. Cl.³ A6 1K 39/40

(40) Zveřejněno 15 09 81
(45) Vydáno 01 05 84

(75)
Autor vynálezu ŠIMON VLADIMÍR MVDr.,
HORÁVOVÁ PAVLA ing.,
KREJČÍ JOSEF MVDr., BRNO

(54) Inaktivovaná absorbatová vakcína proti infekční keratokonjunktivitidě skotu

1

Vynález řeší aktivní ochranu skotu vakcínou proti onemocnění infekční keratokonjunktivitidou, které je vyvoláno bakterií *Moraxella bovis*.

Pokusy o tlumení infekční keratokonjunktivitidy skotu imunoprophylaktickými opatřeními byly založeny na pozorování, že telata dříve onemocnělá infekční keratokonjunktivitidou skotu vzdorovala infekce homologními kmeny *Moraxella bovis* (HUGHES, D.E. - PUGH, G.W. - McDONALD, T.Y.: Experimental bovine infectious keratoconjunctivitis caused by sunlamp irradiation and *Moraxella bovis* infection: Resistance to re-exposure with homologous and heterologous *Moraxella bovis*. Am. J. vet. Res., 29, 1968, s. 829 - 833). Později bylo pokusně zkoušeno několik druhů očkovacích látek. Poměrně příznivých výsledků bylo dosaženo, použilo-li se k očkování živé kultury *Moraxella bovis* (HUGHES, D.E. - PUGH, G.W.: Experimentally induced bovine infectious keratoconjunctivitis: Effectiveness of intramuscular vaccination with viable *Moraxella bovis* culture. Am. J. vet. Res., 32, 1971, s. 879 - 886.) Dále bylo ověřeno, že částečnou protekční účinnost lze dosáhnout i vakcínou inaktivovanou formaldehydem. Přitom byl stanoven též optimální interval mezi vakcínacemi v délce 14 dní (HUGHES, D.E. - PUGH, G.W.: Experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis: Relationship of vaccination schedule to protection against exposure with homologous *Moraxella bovis* culture. Am. J. vet. Res., 36, 1975, s. 263 - 265.)

V Brazílii byly proti infekční keratokonjunktivitidě skotu zkoušeny živé vakcíny, připravené jednak z jednotlivých kmenů *Moraxella bovis*, jednak z jejich kombinací. Dobré protekce bylo dosaženo tehdy, bylo-li k infekci užito homologního kmene. Užilo-li se kmenů heterologních, byla protekce velmi variabilní (BAPTISTA, P.J.H.P.: *Querato - conjuntivite infecciosa dos bovinos*: (I) Resistencia de bovinos vacinados com culturas vivas a agressao experimental com amostras homologa e heterologa de *Moraxella bovis*. (II) Etiologia. (III) Imunologia. Bol. Inst. Pesquisas vet. "Desidério Finamor", 3, 1975, s. 5 - 35.) V USA ve státě Oregon bylo užito k tlumení infekční keratokonjunktivitidy skotu podobně s dobrým výsledkem autogenní vakcíny připravené z kultury *Moraxella bovis* izolované z čerstvého případu onemocnění (STOREY, R.C. - STODDARD, P. - BARGER, R.: An autogenous vaccine in succesful treatment of infectious keratitis in cattle. Vet. Med. small.Anim.Clin., 72, 1977, s. 1050-1051.) Přes některé dobré výsledky vakcíny s obsahem jak živých, tak umrtvených bakterií *Moraxella bovis*, poskytovaly jen částečnou ochranu před onemocněním. Později byla vyzkoušena další vakcína obsahující koncentrát fimbrií *Moraxella bovis* rozbitých ultrazvukem a suspendovaných ve vodě nebo v oleji. Telata očkováná fimbriovou vakcínou s olejovým adjuvans měla ochrannou imunitu proti infekci homologním kmenem *Moraxella bovis* (PUGH, G.W. - HUDGES, D.E. - BOOTH, G.D.: Experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis: Effectiveness of a pilus vaccine against exposure to homologous strains of *Moraxella bovis*. Am.J.vet.Res., 38, 1977, s. 1519 - 1522.) Pokusy zvýšit ochrannou protilátkovou odpověď vakcínou obohacenou inkompletním Freundovým adjuvans (HUGHES, D.E. - PUGH, G.W. - BOOTH, G.D.: Induced infectious bovine keratoconjunctivitis: Vaccination with whole cell bacetrins of *Moraxella bovis* mixed with Freund's incomplete adjuvant. Am.J.vet.Res., 38, 1977, s. 1905 - 1907.) nebo vakcínou s *Mycobacterium paratuberculosis* se nesetkaly s úspěchem (PUGH, G.W. - McDONALD, T.J. - LARSEN, A.B.: Experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis: Potentiation of a *Moraxella bovis* pilus vaccine s immunogenicity by vaccination with *Mycobacterium paratuberculosis* bacterin. Am.J.vet.Res., 39, 1978, s. 1656-1661.) O odlišném typu vakcíny proti infekční keratokonjunktivitidě skotu bylo referováno z Uruguaye. Obsahovala autolysované kultury *Moraxella bovis*, *Staphylococcus aureus* a *Corynebacterium pyogenes*, byla inaktivována formaldehydem a jako adjuvans byl přidán hydroxid hlinitý. Vakcína měla velmi dobrý ochranný i léčebný efekt (QUINONES SOWERBY, C.A.: Nueva vacuna contra la queratoconjunctivitis de los bovinos. Vet. Uruguay, 5, 1978, s. 27 - 34.) Podobného složení je vakcína francouzské provenience "KÉRABOV", vyráběná firmou IFFA Mérieux. Informace o její ochranné účinnosti v našich chovech skotu se různí. Dobré výsledky byly zaznamenány při léčbě infekční keratokonjunktivitidy skotu. Lze léčit buď lokálně (FLEMING, G.A.: Bovine infectious keratoconjunctivitis. Vet. Rec., 97, 1975, s. 486.), nebo celkově, a doporučuje se oba způsoby léčby kombinovat (PUGH, G.W. - McDONALD, T.J.: Infectious bovine keratoconjunctivitis: Treatment of *Moraxella bovis* infections with antibiotics. 81 st Annual Meeting of the United States Animal Health Association, Minneapolis, Minnesota.) Při tlumení infekční keratokonjunktivitidy byla rovněž porovnávána účinnost léčby a vakcinace a zjistilo se, že léčilo-li se stádo skota očním furazolidovým sprayem každý týden od května do srpna, omezila se incidence onemocnění více než vakcinací autogenním bakterií *Moraxella bovis* umrtveným formaldehydem (HUGHES, D.E.

- KOHLMEIER, R.H. - PUGH, G.W.: Comparison of vaccination and treatment in controlling naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. Am. J.vet.Res., 40, 1979, s. 241 - 244.) Tlumení infekční keratokonjunktivitidy skotu léčbou je však pracné a v podmínkách velkochovů a pastevního odchovu skotu neproveditelné. Schůdnější cestou je imunizace účinnou vakcínou připravenou z homologních, plně virulentních kmenů *Moraxella bovis*.

Narůstající problém infekční keratokonjunktivitidy skotu vedl k vyvinutí vakcíny, jejíž dobrá protekční účinnost byla v pokusech ověřena (ŠIMON, V. - HOŘAVOVÁ, P. - KREJČÍ, J.: Imunoprophylaxe infekční keratokonjunktivitidy skotu. (Výzkumná zpráva) Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1979. 20s.

Byla vynalezena inaktivovaná adsorbátová vakcína proti infekční keratokonjunktivitidě skotu, která má nahradit vakcínu francouzské proveniencce "KÉRABOV", v našich podmínkách nedostatečně účinnou.

Podstatou vakcíny je, že obsahuje suspenzi bakterií *Moraxella bovis* o počtu 10^8 až 10^{10} CFU/1 ml v množství 30 až 50 objemových %, suspenzi fimbrií téhož bakteriálního kmene o densitě dané propustností do 80 % při vlnové délce 540 nm v množství 30 až 50 objemových % a zbytek do 100 % objemových % tvoří adjuvans a inaktivační činidlo.

Vysoké ochranné účinnosti vakcíny je dosahováno vlastnostmi vybraného bakteriálního kmene, plně virulentního, který kromě hemolytického a dermonekrotického toxinu tvoří fimbrie, které jsou rozhodujícím znakem patogenity a virulence kmenů *Moraxella bovis*. Účinnost vakcíny byla ověřena ve dvou za sebou následujících pokusech. Při prvním pokusu bylo zařazeno do vakcinované skupiny 37 a do kontrolní 49 telat. Po experimentální infekci provedené za 27 dní po posledním očkování byl ve skupině vakcinovaných telat nalezen pouze jeden případ nepatrné jizvy rohovky. V kontrolní skupině neočkovaných telat bylo zjištěno 10 případů, 38,8 % keratitid různého stupně. V druhém pokusu bylo zařazeno do vakcinované skupiny 19 a do kontrolní 42 telat. Po experimentální infekci provedené za 28 dní po posledním očkování bylo zjištěno onemocnění keratitidou pouze u jednoho telete, tj. 5,3 %. V kontrolní skupině neočkovaných telat bylo diagnostikováno 10 případů keratitid, tj. 23,8 %. Rozdíl v počtu onemocnělých kusů je významný na hladinu významnosti $p = 0,05$.

Vakcína se připravuje z bakteriálního kmene *Moraxella bovis*, který má tyto vlastnosti: gramnegativní krátké silnější tyčinky, hemolytické, nepohyblivé, neredukující nitráty v nitrity, neprodukující indol, nefermentující uhlohydráty, s proteolytickou schopností, s pozitivním oxidásovým testem, v lakmusovém mléce tvořící tři ohraničené zóny - horní zona temně modrá, střední zona tvořená kaseinem levandulové barvy, spodní zona z koagulovaného kaseinu, nerostoucí na Simonsově citrátovém médiu. Na agarovém médiu s 5 - 10 % ovčí krve roste v lesklých, šedě bílých konvexních koloniích, ostrých krajů, o průměru 1 - 3 mm, mírně vtlačených do média. Kultury izolované z patologického materiálu, které nebyly vícekrát pasážovány na krevním agaru, tvoří pevné, adherující kolonie, ve fyziologickém roztoku autoaglutinující. Příčinou autoaglutinability je tvorba fimbrií. Kmeny *Moraxella bovis* z různých lokalit jsou antigenně rozdílné.

Příklad provedení:

Vakcína obsahuje:

Příklad provedení:

Vakcína obsahuje:

suspenzi bakterií <i>Moraxella bovis</i> o počtu 10^9 CFU/1 ml		40	objemových %
suspenzi fimbrií o densitě dané propustností 80 % při vlnové délce 540 nm		40	objemových %
sterilní gel hydroxidu hlinitého		19,6	- " - %
formaldehyd		0,4	- " - %

Suspenze bakterií se zpravidla získává smytím nárůstu s povrchu krevního agaru pomocí fyziologického roztoku, agarová plotna o průměru 10 cm se smývá 2 ml sterilního fyziologického roztoku.

Fimbrie se získávají homogenizací bakteriální suspenze 20 minut při 10 000 otáčkách za minutu za stálého ochlazování. Homogenizát se centrifuguje 60 minut při 6000 ot./min. za teploty 3 - 5 °C. Fimbrie v supernatantu se precipitují při 4 °C po dobu 18 - 24 hod. po přidání chloridu hořečnatého do koncentrace 0,1 mol/l. Precipitované fimbrie se centrifugují při 6000 ot./min. po dobu 60 minut. Sediment se rozpustí v šestkrát menším objemu sterilní destilované vody, než byl původní objem bakteriální suspenze. Suspenze fimbrií se upraví na denzitu o propustnosti 80 % při 540 nm. Vyšší propustnost fimbriové suspenze je možná, ale výrobně zbytečně nákladná.

Bakteriální suspenze se kontroluje na přítomnost fimbrií buď elektronopticky, nebo hemaglutinační zkouškou (SANDHU, T.S. - WHITE, F.H. - SIMPSON, C.F.: Association of pili with rough colony type of *Moraxella bovis*. Am.J.vet.Res., 35, 1974, č. 3, s. 437 - 439).

Sterilita vakcíny se kontroluje po uskladnění při 4 - 5 °C za 72 hodin vyočkováním na krevní agar.

Neškodnost vakcíny se kontroluje intramuskulární injekcí v dávce 5 ml teleti ve věku kolem 6 - 10 týdnů stáří. V místě vpichu nesmí dojít k zánětlivé reakci.

Vakcína má ochrannou účinnost proti infekcím bakteriemi *Moraxella bovis*, které jsou antigenně homologní s kmenem užitým ve vakcíně. Antigenní shodnost terénních kmenů a vakcinačních kmenů *Moraxella bovis* se kontroluje buď precipitací v agarovém gelu, nebo pasivní hemaglutinací. Antigen k těmto reakcím se připravuje dezintegrací suspenze fimbrií ultrazvukem. Tekutý antigen se upraví na denzitu 50 % propustnosti při 540 nm. Protilátky se připravují postupnými intravenózními injekcemi na králících hmotnosti cca 2 kg podle tohoto časového rozvrhu:

1. týden 3 dny po sobě 0,5 ml, 2 - 3 týdny následující 3 dny po sobě 1 ml antigenu. Králíci se vykrvují za 14 dní po posledním očkování. Antigenní shodnost se projeví zřetelnými precipitačními liniemi při precipitaci v agarovém gelu nebo téměř shodnými vysokými titry při pasivní hemaglutinaci.

Telata se očkují v nejnižším stáří 8 týdnů dávkou 5 ml do krční svaloviny 2x v intervalu 14 - 21 dnů. Mladý skot od 150 kg výše se očkuje dávkou 8 ml rovněž 2x v intervalu 14 - 21 dnů do krční svaloviny.

Vakcína může být skladována půl roku při teplotě 5 °C. Imunita po vakcinaci trvá cca 12 měsíců. Vakcína má autoaglutinační vlastnosti a proto je nutno před upotřebením aglutinát

roztřepat. Účinnost vakcíny byla prokázána v dříve popsanych pokusech. Vakcínou bylo zatím naočkováno 390 telat bez projevů poruch zdravotního stavu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Inaktivovaná adsorbátová vakcína proti infekční keratokonjunktivitidě skotu, vyznačující se tím, že obsahuje suspenzi bakterií *Moraxella bovis* o počtu 10^8 až 10^{10} CFU/1 ml v množství 30 až 50 objemových %, suspenzi fimbrií téhož bakteriálního kmene o densitě dané propustností do 80 % při vlnové délce 540 nm, v množství 30 až 50 objemových % a zbytek do 100 % objemových % tvoří adjuvans a inaktivační činidlo.