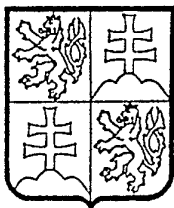


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 275 785

(11) Číslo dokumentu :

(21) Číslo přihlášky : 4066-89.V

(22) Přihlášeno : 03 07 89

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B 6

(51) Int. Cl.⁵ :

A 61 K 39/125

(40) Zveřejněno : 12 02 91

(47) Uděleno : 20 12 91

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18 03 92

(73) Majitel patentu : BIOVETZ š.p., NITRA

(72) Původce vynálezu : ŽUFFA TOMÁŠ, MVDr., NITRA, ŠVRČEK ŠTEFAN doc.
MVDr.CSc., KOŠICE, SALAJ JURAJ MVDr.CSc.,
NITRA, ZAJAC JÁN MVDr., BENÍŠEK ZDENĚK MVDr.
CSc., BENKO GUSTÁV MVDr., VRTIAK OTO JAROSLAV
akademik, SULIOVÁ JUDITA RNDr.CSc., VALIGA
JOZEF MVDr., VALOČÍK JÚLIUS MVDr., FEJFAR
VOJTECH MVDr., KOŠICE

(54) Název vynálezu : Inaktivovaná olejová vakcína proti vírusovej
hemoragickej chorobe králikov a spôsob jej
prípravy

(57) Anotace :

Riešenie sa týka inaktivovanej olejovej vakcíny proti hemoragickej chorobe, vhodnej na profylaxiu vírusového ochorenia králikov a spôsobu jej prípravy na vnímavých králikoch. Vakcína je určená na ochranné očkovanie vnímavých zvierat proti uvedenému ochoreniu. Vakcína je tekutá a vyznačuje sa tým, že 0,5 cm³ obsahuje 1 000 až 5 000 hemaglutinačných jednotiek inaktivovaného vírusu hemoragickej choroby králikov kmeňa BN 0788 CAMP V-363, emulgovaného v olejovom adjuvans. Vírus hemoragickej choroby sa pomnožuje na vnímavých králikoch, infekčné vírusové suspenzie sa inaktivujú formaldehydom, betapropionlaktónom alebo 2-brometylaminhydrobromidom a emulgujú so zmesou adjuvantných olejov.

Vynález sa týka inaktivovanej olejovej vakcíny proti vírusovej hemoragickej chorobe králikov a spôsobu jej prípravy na vnímavých králikoch.

Hemoragická choroba králikov je nové, akútne, vírusové, vysoko infekčné ochorenie, ktoré s rôznou intenzitou postihuje králiky od veku 5 týždňov bez ohľadu na plemennú príbuznosť. Prvé hromadné hynutie králikov zaznamenali LUI, S.S. - XUE, H.P. - at al.: A new viral disease in rabbits. Veterinary Medicine (Xumu yu Shouyi) 1984, 16 (6), 253-255, China Nanjing Univ. v jesenných a zimných mesiacoch roku 1984 v provincii Jinsau v Číne. Infekcia má epizootický charakter, v roku 1985 až 1986 bola zistená v Sovietskom zväze a začiatkom roku 1987 sa preniesla na niektoré chovy králikov lokalizované na Východnom Slovensku. Počas dvoch rokov sa ochorenie rozšírilo na celom území ČSSR a spôsobilo citeľné straty v postihnutých chovoch.

LUI, S.S. - XUE, H.P. - at al.: A new viral disease in rabbits, Veterinary Medicine (Xumu yu Shouyi) 1984, 16 (6) 253-255, China Nanjing Univ. popísali pôvodcu, ako malý neobalený vírus ikosahedrálnej symetrie s veľkosťou virionu 18 až 33 nm, ktorého sférické nukleokapsidy priemeru 20 nm obsahujú jednovláknitú RNK. PU, B.Q. a kol.: Micro HA tests for the detection of antibody titres to so-called "Haemorrhagic pneumonia" in rabbits, Chin. Journ. Vet. Med., 1985, XX, 10, 16-17 zaradili vírus do čeľade Picornaviridae, ŠMÍD, B. a kol.: Zprávy o dosažených výsledcích výzkumu virové hemoragické pneumonie králíků (moru králíků) 3242-3244/88/I na základe podrobných elektronoptických štúdií do rodu Calicivirus. Vírus aglutinuje erytrocyty oviec, vtákov a ľudské erytrocyty skupiny 0, ktoré sú na dôkaz vírusu v infikovaných orgánových suspenziách najcitlivejšie (LUI a kol.: A new viral disease in rabbits, Veterinary Medicine (Xumu yu Shouyi) 1984, 16 (6) 253-255, China Nanjing Univ.

Izolovaním pôvodcu a jeho identifikovaním sa otvorila cesta pre štúdium epizootológie, patogenézy a imunogenézy novej vírusovej infekcie králikov.

Na základe experimentálnej infekcie vnímavých králikov, stanovili LUI a kol.: A new viral disease in rabbits, Veterinary Medicine (Xumu yu Shouyi) 1984, 16 (6) 253-255, China Nanjing Univ. inkubačnú dobu pri hemoragickej chorobe na 24 až 72 hod. a dobu trvania choroby od niekoľkých hodín do jedného až dvoch dní. Klinické príznaky ochorenia sú málo výrazné, králiky strácajú plachosť, prestávajú prijímať potravu, pričom jediným typickým príznakom ochorenia je krvavý, penovitý výtok z nosa, ktorý sa zisťuje približne u 40 % infikovaných zvierat krátko pred úhynom. Patologicko-anatomický obraz po prirodzenej a experimentálnej infekcii popísali ako prví XU a kol.: Study of pathology of viral haemorrhagic disease in rabbits, Anim. Husb. and Vet. Med., 1985, 17, 4, 153-155. Makroskopicky sa zisťujú hemoragická hepatitída, hemoragický edém pľúc, hemoragická tracheitída, nefritída, katarálna gastroenteritída a nekróza žľaz. Histologicky boli zistené hemoragie vo všetkých orgánoch, membránová glomerulonefritída, hemoragická bronchopneumónia, nehnisavá encefalitída a demyelinizácia neurónov.

Infikované králiky vytvárajú proti vírusu hemoragickej choroby hemaglutinačne inhibičné protilátky, ktoré u prechorených zvierat dosahujú stredné až vysoké hodnoty (PU a kol.: Micro HA test for the detection of antibody titres to so-called "Haemorrhagic pneumonia" in rabbits, Chin. Journ. Vet. Med., 1985, II, 10, 16-17.

Pokusy o aktívnu imunizáciu králikov proti hemoragickej chorobe sa zakladajú na poznatku, že prekonanie infekcie vyvoláva chránenosť proti ochoreniu a praktická imunizácia na poznatku, že inaktivované štruktúry vírusu zodpovedné za vyvolanie protilátok a imunity, sú v natívnom stave príčinami ochorenia. Východiskovým materiálom pre získanie vírusového materiálu na prípravu vakcín sú infekčné orgány získané z experimentálne infikovaných zvierat. Tie sa podrobujú rozdielnym purifikačným a inaktivačným postupom s cieľom pripraviť vysoko účinné a neškodné vakcíny. Ako prví pripravili orgánovú vakcínu, inaktivovanú 0,4 hmotnostnými percentami formaldehydu LUI a kol.: A new viral disease in rabbits,

Veterinary Medicine (Xumu yu Shouyi) 1984, 16 (6) 253-255, China Nanjing Univ., ktorej dobrú imunizačnú účinnosť v laboratórnych a terénnych podmienkach potvrdili GU a kol.: An inactivated vaccine against haemorrhagic in rabbits, Chin.Journ.-Vet.Med., 1986, 12.2. 50-51. V roku 1987 bola v ZSSR pripravená inaktivovaná orgánová vakcína bez adjuvantných prímiesí a v roku 1988 boli v ČSSR pripravené dve inaktivované vakcíny založené na rozdielnych vakcinačných kmeňoch.

Technológia prípravy uvedených vakcín sa zakladá na príprave vírusových suspenzií z orgánov infikovaných králikov, ktoré sa vhodným spôsobom inaktivujú. Imunostimulačný účinok pripravených vírusových suspenzií sa môže potencovať prídavkom vhodných adjuvantných komponentov.

Predložené riešenie spočíva v tom, že bol vypracovaný spôsob infekcie králikov nami izolovaným kmeňom BN 0788 CAMP V-363 vírusu hemoragickej choroby a spôsob prípravy infekčných orgánových tekutín s vysokým obsahom HA jednotiek, boli definované podmienky šetrnej inaktívácie infekčnosti vírusu pomocou vybraných inaktivovaných látok a zvýšenia imunogénnej účinnosti pripravenej vakcíny prídavkom adjuvantných olejov. Dodržaním definovaných technologických postupov sa pripraví vakcína s vysokými kvalitatívnymi parametrami.

Bola pripravená inaktivovaná olejová vakcína proti vírusovej hemoragickej chorobe králikov, ktorá v $0,5 \text{ cm}^3$ obsahuje 1 000 až 5 000 hemaglutinačných jednotiek inaktivovaného vírusu BN 0788. Pripravuje sa z pečeni a slezín experimentálne infikovaných králikov, ktoré sa homogenizujú s pufovaným fyziologickým roztokom a prídavkom tiomersalu. Výsledná 10 až 20 % hmot. orgánová suspenzia, ktorá obsahuje v 1 cm^3 10 000 hemaglutinačných jednotiek sa chemicky inaktivuje pomocou formaldehydu, betapropionlaktónu alebo 2 brometylaminu hydrobromidu. Inaktivovaná zmes sa potom emulguje s 20 až 50 % hmot. zmesi adjuvantných olejov. Takto pripravená inaktivovaná olejová vakcína proti vírusovej hemoragickej chorobe králikov vykazuje nasledovné imunobiologické vlastnosti:

- a) je neškodná pre zvieratá všetkých vekových kategórií,
- b) navodí tvorbu špecifických hemaglutinačných protilátok v titre 1:160 až 1:5120,
- c) vyvolá včasnú a dlhotrvajúcu chránenosť očkovaných zvierat proti ochoreniu a infekcii.

Vynález bližšie objasňujú nasledujúce príklady praktického prevedenia:

Spôsob prípravy vírusovej suspenzie

Na produkciu vírusového materiálu sa použijú králiky bez protilátok proti vírusu hemoragickej choroby. Králiky vopred vyšetrené hemaglutinačne-inhibičným testom sa infikujú parenterálne, napr. intra pulmonálne dávkou $1,0 \text{ cm}^3$ 10 % hmot. orgánovej suspenzie kmeňa BN 0788 CAMP V-363. Za 24 až 72 hodín dochádza k prudkej horúčkatej reakcii s početným úhynom. V tomto čase sa od uhynutých a klinicky chorých králikov odoberajú pečeň a slezina, ktoré sa individuálne kontrolujú na obsah vírusu hemaglutinačným testom. Na ďalšie spracovanie sa použijú orgány, z ktorých 10 % hmot. orgánovej suspenzie vo fyziologickom roztoku s prídavkom 0,01 % hmot. tiomersalu obsahuje najmenej 10 000 hemaglutinačných jednotiek v 1 cm^3 . Orgány sa až do spracovania uchovávajú v zmrazenom stave. Z vybraných orgánov s požadovaným obsahom vírusu sa pripraví 10 % hmot. orgánová suspenzia s fyziologickým ústojným roztokom, ktorý obsahuje tiomersal v množstve 0,01 % hmot. Suspenzia sa vyčirí pomalou sedimentáciou acentrifugáciou pri teplote 2 až 8 °C. Pred inaktíváciou musí suspenzia obsahovať najmenej 10 000 hemaglutinačných jednotiek vírusu v 1 cm^3 .

Spôsoby inaktívácie vírusu

- a) Inaktívácia vírusu formaldehydom:

Do vyčirenej 10 % hmot. orgánovej suspenzie vírusu BN 0788 sa pridá 0,2 % hmot. for-

maldehydu, zmes sa dokonale premieša a inkubuje pri 30 °C počas 72 h pri 2 až 8 °C počas ďalších 72 h.

b) Inaktivácia vírusu betapropiónlaktónom:

Do vyčírenej 10 % hmot. orgánovej suspenzie vírusu BN 0788 sa pridá 0,3 % hmot. beta-propionlaktónu, zmes sa dokonale premieša a inkubuje pri 37 °C počas 24 h.

c) Inaktivácia vírusu 2-brometylaminhydrobromidom:

Do vyčírenej 10 % hmot. orgánovej suspenzie vírusu BN 0788 sa pridá 10 % hmot. 0,1 M roztoku 2-brometylamin hydrobromidu o pH 7,6 a zmes vírusu a inaktivačného činidla sa uloží pri teplote 25 °C na 8 h. Počas inaktívácie sa vírusová suspenzia opakovane premieša.

Spôsob prípravy emulzie

Suspenzia orgánového inaktivovaného vírusu hemoragickej choroby sa uchováva pri 2 až 8 °C. 80 hmot. dielov orgánovej suspenzie sa emulguje s 20 hmot. dielmi adjuvantných olejov, ktoré obsahujú ľahký minerálny olej a emulgátory a vytvárajú s orgánovou suspenziou dvojitú emulziu olej vo vode pomocou emulgačného zariadenia IKA-Ultra Thurax T/45/6. Emulgácia prebieha pri najvyšších obrátkach dvakrát po dobu piatich minút s desaťminútovou prestávkou. Pripravená emulzia sa zlieva do sterilných fliaš, ktoré sa uzavru gumovými zátkami.

Príklad 1

Králiky vopred vyšetrené HI testom sa infikujú intra pulmonálne dávkou 1,0 cm³ 10 % hmot. orgánovej suspenzie kmeňa BN 0788 CAMP V-363. Za 48 hodín dochádza k prudkej horúčkatej reakcii s početným úhynom. V tomto čase od uhynutých a klinicky chorých králikov sa odoberajú pečene, ktoré sa kontrolujú na obsah vírusu hemaglutinačným testom. Na ďalšie spracovanie sa použijú orgány, z ktorých 10 % hmot. orgánovej suspenzie vo fyziologickom ústojnom roztoku s prídavkom 0,01 % hmot. tiomersalu obsahuje najmenej 10 000 hemaglutinačných jednotiek vírusu v 1 cm³. Orgány sa až do spracovania uchovávajú v zmrazenom stave. Z vybraných orgánov sa pripraví 10 % hmot. orgánová suspenzia s fyziologickým ústojným roztokom, ktorý obsahuje tiomersal v množstve 0,01 % hmot. Suspenzia sa vyčirí pomalou sedimentáciou a centrifugáciou pri teplote 4 °C. Do vyčírenej 10 % hmot. orgánovej suspenzie s obsahom najmenej 10 000 hemaglutinačných jednotiek vírusu v 1 cm³ sa pridá 0,2 % hmot. formaldehydu, zmes sa dokonale premieša a inkubuje pri 30 °C počas 72 h a pri 4 °C počas ďalších 72 h.

Kompletná vakcína sa pripraví zmiešaním 80 hmot. dielov orgánovej suspenzie s 20 hmot. dielmi adjuvantných olejov na zariadení IKA-Ultra Thurax T/45/6. Emulgácia prebieha pri najvyšších obrátkach, dvakrát po dobu piatich minút s desaťminútovou prestávkou.

Výsledky skúšok

Neškodnosť a dobrú imunizačnú účinnosť vakcíny proti hemoragickej chorobe králikov potvrdili výsledky získané po aplikácii 250 000 dávok (t.j. overovacia výroba) vakcíny králikom rôznych plemien a vekových kategórií. Použitie olejového adjuvans vo vakcíne proti hemoragickej chorobe králikov schválila aj Komisia pre veterinárne biopreparáty a liečivá dňa 6.6.1990 pri príležitosti obhajoby záverečnej správy k predmetnej vakcíne.

Vysokú účinnosť inaktivovanej vakcíny potvrdzujú výsledky imunizácie a čelenže. 45 králikov bez protilátok proti vírusu HCHK bolo rozdelených do troch skupín po 15 zvierat a očkovaných inaktivovanou olejovou vakcínou proti hemoragickej chorobe králikov dávkou 0,5 ml nasledovne:

1. skupina - očkovaná pod kožu za lopatku
2. skupina - očkovaná vnútro svalovo do stehna
3. skupina - kontrolná, neočkované králiky

Krvné vzorky sa odoberali pred očkovaním a potom v týždňových intervaloch.

Králiky prvej skupiny vytvorili za týždeň po očkovaní HI protilátky v titroch 1:80 až 1:2560 s priemerným titrom vyjadreným v dvojkových logaritmoch $\log_2$ 9,53. Za 4 týždne po očkovaní predstavoval priemerný titer skupiny hodnotu 9,33 $\log_2$.

U králikov druhej pokusnej skupiny boli za 7 dní po očkovaní zistené protilátky v titroch 1:160 až 1:5120 s priemerným titrom skupiny 10,83 $\log_2$.

U králikov tretej kontrolnej skupiny sa počas celého sledovaného obdobia nezistil signifikantný vzostup špecifických protilátok proti vírusu HChK. Obr. 1.

Za 4 týždne po vakcinácii boli všetky králiky infikované i. pulm. dávkou 1 cm³ virulentným vírusom BN 0788. Výsledky infekcie vyjadrené v tab. 1 a obr. 1 preukazne potvrdzujú spoľahlivú protektívnu účinnosť inaktivovanej olejovej vakcíny. Králiky 1. a 2. pokusnej skupiny, očkované inaktivovanou vakcínou reagovali na i. pul. aplikáciu virulentného vírusu BN 0788 ďalším vzostupom HI protilátok, ktoré za 2 týždne po infekcii dosiahli hodnoty 12 až 14 $\log_2$. V pozorovacom období sa nezaznamenal úhyn ani v jednej z uvedených pokusných skupín králikov. Z 15 kontrolovaných neočkovaných králikov uhynulo 11, t.j. 73,3 %. Štyri králiky, ktoré infekciu prekonal, obsahovali za dva týždne po infekcii rovnaké hodnoty HI protilátok, ako králiky vakcínované a následne infikované.

Dobrá protektívna účinnosť vakcíny potvrdzujú výsledky pokusu, v ktorom bolo 6 králikov vystavených kontaktnej infekcii súčasne s očkovaním. Do troch klietok boli spoločne umiestnené po dva králiky infikované i. pulm. dávkou 1 ml virulentného vírusu BN 0788, a po dva králiky očkované s.c. dávkou 0,5 ml inaktivovanej olejovej vakcíny. V pozorovacom čase 14 dní uhynuli zo šiestich infikovaných králikov 4 kusy, ale všetky vakcínované králiky vystavené kontaktnej infekcii prežili. Výsledky vyjadruje tab. 2.

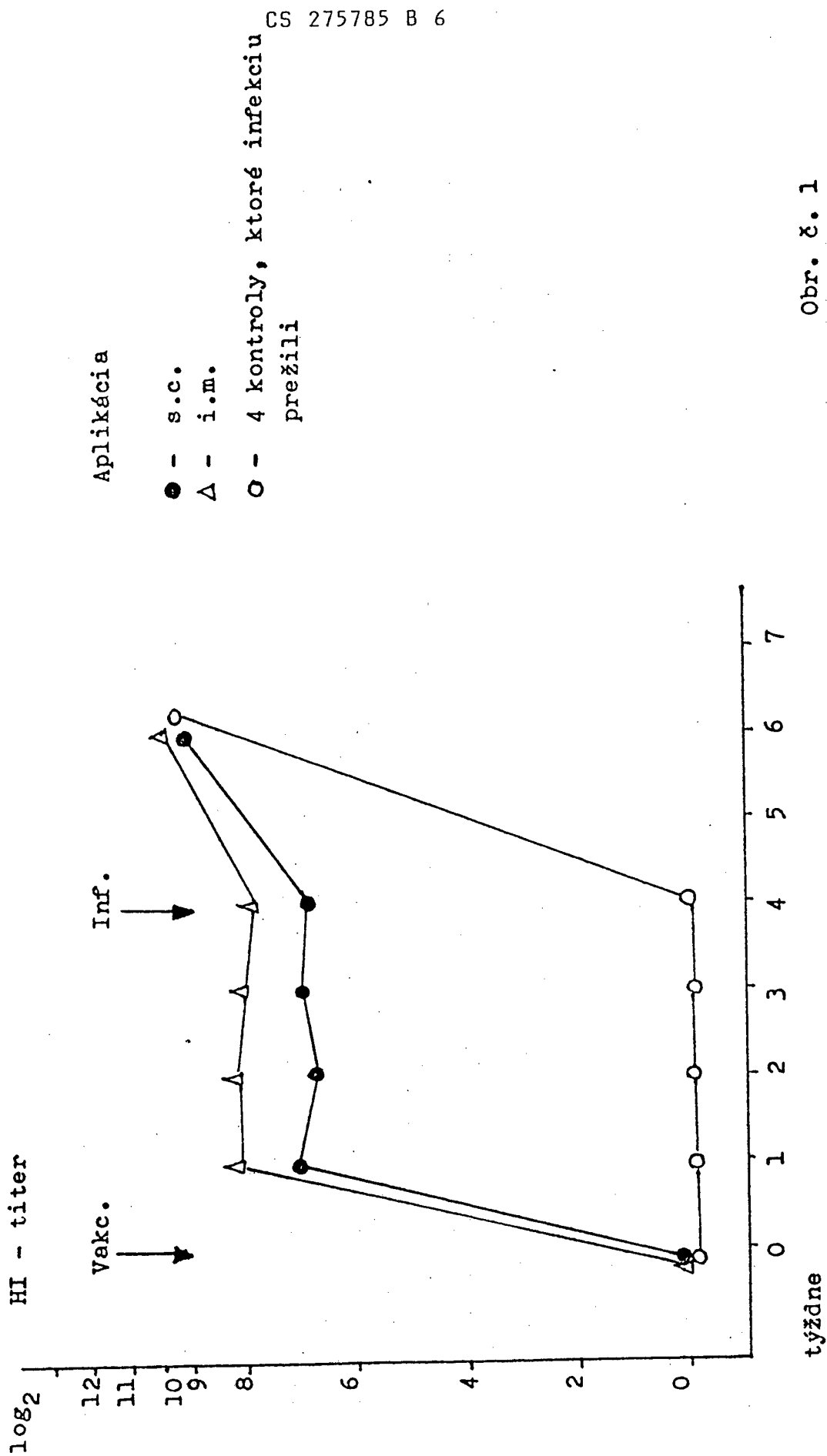
Účinnosť inaktivovanej olejovej vakcíny, inaktivovanej vakcíny bez olejového adjuvansu a sovietskej vakcíny vyjadruje tab. 3. Najlepšiu účinnosť (najvyššie hodnoty priemerných titrov protilátok vo všetkých sledovaných časových intervaloch) vykazovala inaktivovaná olejová vakcína. Najmenej účinná bola sovietska vakcína (formolvakcína s hydroxidom hliníovým z orgánového homogenátu).

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Inaktivovaná olejová vakcína proti vírusovej hemoragickej chorobe králikov, vyznačujúca sa tým, že v 0,5 cm³ obsahuje 1 000 až 5 000 hemaglutinačných jednotiek chemicky inaktivovaného vírusu hemoragickej choroby králikov BN 0788 CAMP V-363 emulgované v olejovom adjuvansu.
2. Spôsob výroby vakcíny podľa bodu 1 homogenizáciou pečiení a slezín infikovaných vnímavých králikov pufrovanom fyziologickom roztoku s obsahom 0,01 až 0,02 % hmot. tiomersalu a chemickou inaktiváciou, vyznačujúci sa tým, že sa orgánová suspenzia z pečiení a slezín vnímavých králikov infikovaných vírusom hemoragickej choroby králikov BN 0788, CAMP V-363 s obsahom 2 až 20 % hmot. orgánovej masy a obsahujúca najmenej 10 000 hemaglutinačných jednotiek v 1 cm³ emulguje s 20 až 50 % hmot. zmesi adjuvantných olejov.
3. Spôsob výroby vakcíny podľa bodu 2, vyznačujúci sa tým, že zmes adjuvantných olejov obsahuje ľahký minerálny olej a emulgátory.

Priemerné hodnoty titrov HI-protilátok pri králikoch po vakcinácii inaktivovanou ošejovou vakcínou, a po následnej infekcii virulentným vírusom BN 0788

5



Obr. č. 1

Kontrola imunogenity inaktivovanej olejovej
vakcíny

Výsledky infekcie vakcínovaných a nevakcínovaných
králikov

Spôsob aplikácie vakcíny	Počet infikova- ných králikov	Úhyn	%
s.c.	15	0	0
i.m.	15	0	0
Kontrola	15	11	73,3

Tab. 1

Kontrola protektívneho účinku inaktivovanej
olejovej vakcíny proti hemoragickej chorobe
králikov

Králiky	Počet kusov	Úhyn do 7 dní	Úhyn do 14 dní
Infikované i. pulm.	6	4 /67%/	0
Vakcínova- né	6	0	0

Tab. 2

Porovnanie anti géennej aktivity inaktivovanej olejovej vakcíny, vývojovej vakcíny tekutej a sovietskej komerčnej vakcíny proti hemoragickej chorobe králikov metódou HI-testu za 7., 14., 28, 60 a 200 dní po imunizácii

V A K C Í N A	Číslo zvierata	D e ň p o V a k c i n á c i i				
		7.	14.	28.	60.	200.
Inaktivovaná olejová vakcína	1	1 : 160	1 : 540	1:320	1:160	1:40
	2	1:320	1:320	1:160	1:160	1:40
	3	1:160	1:320	1:320	1:320	1:80
	4	1:320	1:320	1:160	1:80	1:40
	5	1:160	1:160	1:160	1:80	1:80
	6	1:80	1:640	1:640	1:160	1:40
	7	1:80	1:160	1:160	1:80	1:80
	8	1:160	1:640	1:640	1:160	1:80
	Ø	1 : 180	1 : 400	1 : 320	1 : 150	1 : 60
	9	1:80	1:32	1:160	1:160	1:80
	10	1:160	1:160	1:320	1:80	1:80
	11	1:80	1:320	1:160	1:80	1:40
	12	1:40	1:40	1:80	1:40	0
	13	1:160	1:160	1:80	1:80	1:40
	14	1:160	1:640	1:320	1:160	1:40
Vývojová vakcína tekutá	15	1:40	1:160	1:160	1:160	1:80
	16	1:80	1:320	1:160	1:80	0
	Ø	1 : 100	1 : 265	1 : 180	1 : 105	1 : 45
	17	1:80	1:80	1:40	1:40	0
	18	1:80	1:320	1:160	1:80	1:20
	19	1:40	1:40	1:40	0	0
	20	1:40	1:80	1:160	1:40	0
	21	1:80	1:160	1:80	1:40	1:40
	22	1:40	1:160	1:160	1:80	1:40
	23	1:40	1:320	1:160	1:80	1:20
Sovietska vakcína	Ø	1 : 60	1 : 165	1 : 130	1 : 50	1 : 17