



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 22.06.1968 (P. 127696)

Pierwszeństwo: 22.06.1967 (Francja)

Zgłoszenie ogłoszono: 26.02.1973

Opis patentowy opublikowano: 25.02.1977

MKP C12k 5/00

Int. Cl.² C12K 5/00

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Institut Merieux, Lion (Francja)

Sposób wytwarzania szczepionki przeciw pryszczycy bydłej

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania szczepionki przeciwko pryszczycy bydłej, umożliwiający osiągnięcie w warunkach wielkoprzemysłowych szczepionki o najwyższej aktywności biologicznej przy zachowaniu zwiększonej wydajności produkcji.

Znany, obecnie stosowany sposób wytwarzania szczepionki przeciwko pryszczycy bydłej polega na tym, że na odpowiedniej pożywce nabłonków z języków bydłych, hoduje się szczep wirusa tej zarazy, a następnie po wyhodowaniu i roztarciu tych nabłonków — otrzymuje się ciekły ekstrakt, pozwalający na uzyskanie zawiesiny wirusa, którą z kolei dla otrzymania szczepionki dezaktywizuje się.

Sposób wytwarzania szczepionki przeciwko pryszczycy bydłej zgodny z wynalazkiem, w którym wykorzystuje się wirusy uzyskane w wyniku wyhodowania na nabłonkach z języków bydłych w ciekłej pożywce, charakteryzuje się tym, że po przeprowadzeniu pierwszej hodowli, zbiera się pierwszą pożywkę, po czym dodaje się nowej pożywki do nabłonków, które posłużyły do pierwszej hodowli, przeprowadza się drugą hodowlę i zbiera drugą pożywkę, powtarza się ewentualnie trzeci raz ten sam proces, po czym wykorzystuje się zebrane pożywki, przygotowując je w znany sposób w celu wytworzenia z nich szczepionki.

Zgodnie z wynalazkiem hodowlę prowadzi się w temperaturze około 37°C, przy czym pierwszą ho-

2

dowlę prowadzi się w ciągu około 15—20 godzin, a drugą hodowlę prowadzi się w ciągu około 3—12 godzin. Do hodowli wykorzystuje się około 6 nabłonków języcznych na jeden litr pożywki, posiew pożywki wirusem pryszczycy bydłej przeprowadza się w ilości $0,2 \times 10^{10}$ DECP₅₀ na jeden litr pożywki, wykorzystując mieszaninę pożywek uzyskanych w wyniku hodowli, przy czym w trakcie hodowli pożywkę poddaje się ciągłemu dotlenianiu. Tak więc cechą charakterystyczną sposobu wytwarzania szczepionki według wynalazku jest wykorzystanie pojedynczej porcji nabłonków z języków bydłych dla otrzymania kilku kolejnych hodowli wirusa w różnych pożywkach i hodowle te zbiera się i uży-

skuje się z nich szczepionki znany sposóbem dezaktywizacji wirusa.
Chociaż w wybranym przykładzie wytwarzania szczepionki według wynalazku, stosuje się dwie następujące po sobie hodowle przy wykorzystaniu tego samego preparatu z nabłonków z języków bydłych, można w ramach wynalazku w taki sam sposób stosować wiele kolejnych hodowli wirusa. Możliwe jest również dokonanie ekstrakcji wirusa, znajdującego się w nabłonkach z języków bydłych — po zakończeniu hodowli, ale ta ekstrakcja z nabłonków z języków nie stanowi nieodzownej fazy sposobu wytwarzania według wynalazku, ponieważ część najbardziej interesująca w hodowli wirusa znajduje się w ciekłych pożywkach, a nie w preparacie z nabłonków.

Według wynalazku można stosować klasyczną pożywkę znaną pod nazwą pożywki Frenkel'a. Czas rozwoju kolejnych hodowli zależy od zastosowanych szczepów wirusa. Ogólnie — dobre rezultaty uzyskuje się przy prowadzeniu pierwszej hodowli w czasie od 15 do 20 godzin, natomiast druga hodowla dojrzewa w czasie około 3 do 12 godzin. W każdym szczególnym przypadku można określić optymalny czas dojrzewania hodowli przez zbadanie aktywności otrzymanej szczepionki. Dla dokładniejszego objaśnienia istoty wynalazku zostaną dalej opisane liczne sposoby wytwarzania, nie ograniczające jednak zakresu wynalazku.

Przykład I. Języki zabitych nie wcześniej jak przed godziną bydła, myje się wodą, a następnie alkoholem i napromieniowuje promieniami ultrafioletowymi, a następnie zdejmuje się z nich nabłonki. Po tym ścina się nabłonki przy pomocy urządzenia, podobnego do maszyny do krajania szynki. Otrzymane w ten sposób płatki nabłonków umieszcza się w cieczy konserwującej z dodatkiem antybiotyków i trzyma się w temperaturze około 4°C. Mogą one być tak zakonserwowane maksymalnie 48 godzin — przeważnie mniej niż 48 godzin. Hodowla wirusa powstaje przez umieszczenie nabłonków z języków bydła w ciekłej pożywce, a mianowicie 6 płatków nabłonków na litr ciekłej pożywki. Pożywkę w trakcie hodowli stale dotlenia się. Pożywka dojrzewa w temperaturze stałej 37°C. Temperatura ta jest utrzymywana za pomocą wody, przepływającej przez podwójny płaszcz, otaczający zbiornik z nierdzewnej stali, w którym dojrzewa hodowla lub za pomocą dowolnego innego urządzenia do regulacji temperatury. W tym sposobie wytwarzania stosuje się pożywkę o następującym składzie, odpowiadającym klasycznej pożywce Frenkel'a.

Pepton	3000 g
Cysteina chlorowodorowa	0,096 g
Hemina	0,036 mg
Insulina	0,9 jednostki międzynarodowej
Tyrosyna	0,09 mg
Glukoza	1,000 mg
Glutation	0,01 g
Na CL	7,2 g
KCL	0,18 g
Ca CL ₂	0,18 g
Mg CL ₂ , 6 H ₂ O	0,09 g
Na H ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	0,076 g
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	0,524 g
Na H CO ₃	1 g
Na OH (N)	1,25 g
Niacyna	0,001 g
Lizyna	0,200 g
Arginina	0,041 g
Metionina	0,200 g
Leucyna	0,130 g
Kwas pantotenowy	0,250 mg
Fenylalanina	0,025 g
Treonina	0,0425 g
Tryptofan	0,05 g
Histydyna	0,0305 g
woda do objętości	1000 ml

(porównaj: Dubouclard, Rumiancef, Fontaine i Mackowiak in Bull. Soc. Sci. Vet. Lyon, 1966, 68(3), S. 243-53.)

Zaszczepiono hodowlę wirusem „C Vosges”, a mianowicie w ilości 10¹⁰ DECP 50 na 30 języczków. Wyrażeniem DECP 50 oznaczono ilość wirusa, wywołującą zjawiska chorobotwórcze komórek w 50% przypadków w 1 mililitrze hodowli jednokomórkowej z komórek nerki świńskiej. Pożywkę doprowadza się do temperatury 37°C i w tej temperaturze prowadzi pierwszą hodowlę przez 15 godzin. Następnie odprowadza się pierwszą ciekłą pożywkę hodowli z pojemnika, przy czym pozostawia się zakażone nabłonki w pojemniku i napienia się znowu pojemnik taką samą ilością tej samej ciekłej świeżej pożywki, podgrzanej uprzednio do 37°C, powodując dojrzewanie drugiej hodowli w ciągu 4 godzin. Hodowlę następnie chłodzi się i odprowadza się drugą ciekłą pożywkę.

Stosowane pożywki posiadają następujące właściwości:

Ciecz powierzchniowa, odprowadzona po dojrzewaniu pierwszej hodowli:

25 Stopień związania : 1/4
Stopień zakażenia : 10 ^{8,4} DECP 50/ml
DVC 50 = 0,20 ml.

Ciecz powierzchniowa, odprowadzona po dojrzewaniu drugiej hodowli:

30 Stopień związania : 1/2
Stopień zakażenia nie
mniejszy : 10 ^{9,1} DECP 50/ml
DVC 50 = 0,11 ml.

Mieszanina połączonych obu powierzchniowych cieczy:

40 Stopień związania : 1/4
Stopień zakażenia nie
mniejszy : 10 ^{9,1} DECP 50/ml
DVC 50 = 0,08 ml

Przez DVC 50 rozumie się ilość szczepionki, która uodparnia 50% zaszczepionych świnek morskich. (Porównaj M. Rumiancef, J. Fontaine, C. Stellmanu i C. Mackowiak — Ext. Rev. Méd. Vét., sierpień — wrzesień 1965, 116, S. 597—607).

Stopień związania wyrażony jest rozcieńczeniem granicznym, jakie uzyskuje się przez całkowite związanie metodą półilościową Kolmer'a (Badania serologiczne typów i odmian pryszczycy na drodze reakcji wiązania — These Doct. Vet, R. Camand, Lyon, 1953, Bosc. edit.)

55 Stwierdzono więc, że właściwości użytkowe cieczy powierzchniowej powstałej z drugiej hodowli są lepsze, niż cieczy, pochodzącej z pierwszej hodowli, a mieszanina tych obu cieczy posiada również korzystniejsze własności, przewyższające pierwszą pożywkę.

60 Przykład II. Dla porównania i stwierdzenia wyższości sposobu według wynalazku — w porównaniu do sposobu według istniejącego stanu techniki, przeprowadzono w podanych niżej warunkach 65 hodowlę wirusa „O Flandros” przez okres 18 go-

dzin. Po tej jednej jedynej hodowli dokonano ekstrakcji nabłonków cieczą buforową po uprzednim roztarciu tych nabłonków. Otrzymano następujące dane:

Sama ciecz z hodowli:

Stopień związania : $\frac{1}{8}$
 Stopień zakażenia : 10 $8,3$ DECP 50/ml
 DVC 50 = 0,3 ml

Ciecz z hodowli z dodatkową cieczą ekstraktową:

Stopień związania : $\frac{1}{8}$
 Stopień zakażenia : 10 $8,2$ DECP 50/ml
 DVC 50 = 0,5 ml.

Ustalono więc, że domieszka ekstraktu nabłonku jęczmienia do cieczy powierzchniowej hodowli, obniża właściwości zawiesiny wirusa.

W przeciwieństwie do tego dodanie zgodnie z wynalazkiem do cieczy zebranej z pierwszej hodowli — cieczy pochodzącej z hodowli drugiej, poprawia właściwości tej pierwszej cieczy powierzchniowej. Zakażona ciecz, otrzymana sposobem według wynalazku, po ochłodzeniu do temperatury około 4°C może być korzystnie zadana chloroformem, z którym pozostaje w kontakcie przez 12 do 24 godzin. Osad oddziela się następnie przez odwirowanie, a wirus poddaje klarowaniu na płytkach filtru „C5”. Może on być następnie poddany dezaktywizacji w celu przygotowania szczepionki. Czynność przygotowania ma przebieg zwyczajny. Może ona następować na przykład przez adsorpcję wirusa za pomocą wodorotlenku aluminium i dezaktywizację przez wspólne działanie ciepła i formaliny. Jak widać — sposób według wynalazku wykazuje zaletę znacznego zwiększenia wydajności produkcji szczepionki przeciw pryszczycy. W efekcie uzyskuje się z tej samej ilości nabłonków jęczmienia była dwu-

krotnie większą ilość szczepionki w porównaniu do zwykłej metody i to szczepionki, wykazującej lepsze właściwości.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania szczepionki przeciwko pryszczycy bydłowej poprzez hodowlę wirusa pryszczycy na nabłonkach z języków bydłych w ciekłej pożywce, **znamienny tym**, że po przeprowadzeniu pierwszej hodowli, zbiera się pierwszą pożywkę, po czym dodaje się nowej pożywki do nabłonków, które posłużyły do pierwszej hodowli, przeprowadza się drugą hodowlę i zbiera drugą pożywkę, powtarza się ewentualnie trzeci raz ten sam proces, po czym wykorzystuje się zebrane pożywki, przygotowując je w znany sposób w celu wytworzenia z nich szczepionki.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się w temperaturze około 37°C.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pierwszą hodowlę prowadzi się w ciągu około 15—20 godzin.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że drugą hodowlę prowadzi się w ciągu około 3—12 godzin.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się około 6 nabłonków jęczmienia na jeden litr pożywki.
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że posiewa się pożywki wirusem pryszczycy bydłowej w ilości $0,2 \times 10^{10}$ DECP 50 na jeden litr pożywki.
7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wykorzystuje się mieszaninę pożywek, uzyskanych w wyniku hodowli.
8. Sposób według jednego z zastrz. 1, **znamienny tym**, że w trakcie hodowli pożywkę poddaje się ciągłemu dotlenianiu.