

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

109 646

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 19.04.78 (P. 206218)

Pierwszeństwo: 21.04.77 Holandia

Zgłoszenie ogłoszono: 26.03.79

Opis patentowy opublikowano: 31.02.1982

Int. Cl.²
C12K 7/00

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: N.V. Philips Gloeilampenfabrieken, Eindhoven
(Holandia)

Sposób wytwarzania osłabionego szczepu wirusa zakaźnego zapalenia żołądka i jelit

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania osłabionego szczepu wirusa zakaźnego zapalenia żołądka i jelit (TGE), stosowanego do wytwarzania szczepionki, która może być stosowana do ochrony świń, a zwłaszcza prosiąt przed tą chorobą.

TGE jest wysoce zakaźną chorobą świń, występującą prawie na całym świecie i powodującą znaczne straty w hodowli. TGE jest prawie zawsze śmiertelne dla prosiąt zakażonych w pierwszych tygodniach życia. Ponieważ uodpornienie czynne prosiąt w tym wieku nie jest możliwe, od pewnego czasu czynione są próby nadawania prosiątkom odporności biernej, poprzez maciory.

Z nielicznych doniesień wiadomo, że prosiątkom można nadać odporność bierną poprzez siarę zwierzęcia macierzystego (belgijski opis patentowy nr 669 881). Ostatnie doniesienia mówią, że odporność bierną u prosiąt można wywołać doustnym zakażeniem maciory zjadliwym wirusem TGE, jednakże próby osiągnięcia tego celu przy użyciu wirusowych szczepów, osłabionych pasażami, w hodowli komórkowej zawiodły lub dały jedynie ograniczony stopień ochrony (Infection and Immunity, 1976 str. 1642—1646). Jest to spowodowane tym, że przy takich seryjnych pasażach znacznie zmniejsza się nie tylko zjadliwość wirusa, lecz również jego zdolność nadawania odporności.

Ponieważ zakażenie macior wirusem zjadliwym jest związane z dużym ryzykiem, taki sposób

2

ochrony prosiąt przeciw TGE jest niepożądany i niedopuszczalny.

Nieoczekiwanie stwierdzono, co stanowi przedmiot wynalazku, że możliwe jest uzyskanie osłabionego, niezjadliwego, mającego zdolność nadawania odporności wirusa TGE, przez poddanie zjadliwego wirusa TGE bardzo dużej liczbie kolejnych pasażów seryjnych na hodowlach tkankowych tarczycy.

W szczególności stwierdzono, że osłabiony, niechorobotwórczy, mający zdolność nadawania odporności szczep wirusa TGE otrzymuje się, podając wirusa zjadliwego 250—350, korzystnie około 300 seryjnych pasażów na hodowlach tkankowych tarczycy świńskiej.

Wiadomo, że odporność prosiąt przeciw wirusowi TGE, uzyskana poprzez siarę świni zakażonej wirusem zjadliwym zależy od wytwarzania przeciwciała IgA (immunoglobuliny A) w gruczołach mlecznych [Amor. J. Vet. Res. 36 (1975), 267—271].

Ponadto wykazano, że wystarczająca ilość przeciwciała IgA jest u maciory wytwarzana jedynie wówczas, gdy wirus namnaża się na całej lub prawie całej długości jelita cienkiego [E. H. Bohl i inni, Infect. Immun. 11, (1975), 23—32 i E. H. Bohl i inni, Infect. Immun. 6 (1972), 289—301].

Ponieważ ilość przeciwciała IgA zmniejsza się powoli [F.J. Bourne i inni, Immunol. 24, (1973), 157—162], na podstawie oznaczenia ilości przeciwciała IgA, wydzielanych w sianie, można ocenić, czy w

danym przypadku jest możliwe dobre uodpornienie bierne.

Wirus, osłabiony sposobem według wynalazku, po doustnym podaniu maciorze namnaża się na całej długości jelita zwierzęcia, co powoduje, że prosięta od tej maciory stają się w pełni uodpornione przeciwciałami IgA, zawartymi w siarze, na zakażenie wywołane zjadliwym wirusem TGE. Szczególnie zaskakujące jest stwierdzenie, że po tak dużej liczbie pasażów wirus zachowuje zdolność nadawania zwierzętom odporności.

Miana przeciwciała IgA próbek siary oznaczone w próbach zobojętniania osocza, są przedstawione w poniższej tablicy 1. Próbkę odwirowywano, rozcieńczano fizjologicznym roztworem NaCl (1:10) i ogrzewano w ciągu 30 minut w 40°C. Z kolei za pomocą mieszaniny 1:1 1 N HCl i 2 M kwasu octowego doprowadzano próbki do pH = 4,6–4,65 i mieszało je w ciągu 20 minut. Po odwirowaniu (12 000g, 4°C) w ciągu nocy dializowano je wobec 0,1 M tris- (hydroksymetylo) aminometanu + 0,2 M NaCl, doprowadzonego do pH = 8,0 za pomocą 1 N HCl, zateżano do połowy objętości w 5% polimerze Carbowax (ciężar cząsteczkowy 20 000) i nanoszono na kolumnę (2,5 × 100 cm) z nośnikiem Sephadex-G-200. Elucję prowadzono buforem tris-NaCl, pH = 8,0.

Tablica 1

Miano przeciwciała IgA	
liczba pasażów	miano w sferze
2	1 : 50
120	1 : 30
300	1 : 25
350	1 : 2,5

Jak wynika z powyższych danych, po podaniu maciorom wirusa TGE, osłabionego sposobem według wynalazku, po 300 pasażach, miano przeciwciała IgA w siarze jest stosunkowo wysokie.

Oslabienie wirusa sposobem według wynalazku przeprowadzono jak następuje.

Wyjściowego wirusa zjadliwego wyizolowano z zakażonej świni w „Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere” w Monachium. Ten bardzo zjadliwy szczep wirusa, dalej oznaczany symbolem B-1, izolowano bezpośrednio na tkankę świńskiej tarczycy.

Kultury tkankowe tarczycy świńskiej sporządzano z trzycz, uzyskanych w monachijskiej rzeźni. Tarczycę, po usunięciu błony i powierzchniowej sterylizacji (dwukrotnie 95% alkoholem) pocięto na kawałki wielkości 1–2 mm i trzykrotnie przemyto w PBS (solanka buforowana fosforanem). Do tak spreparowanego materiału dodano 37% roztworu trypsyna-PBS (bez Ca²⁺ i Mg²⁺) i przeprowadzono frakcjonowaną obróbkę trypsyną w 37°C. Dwie pierwsze frakcje trypsyny odrzucono (po obróbce w ciągu godziny), a frakcje 3 i 4 (obróbka w ciągu 1,5 godziny) przesączono i przechowywano w 4°C. Aktywność trypsynową inhibitowano dodaniem osocza.

Po zakończeniu powyższej obróbki, trypsynową zawiesinę komórkową wirowano w ciągu 10 minut (500 g). Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w PBS i ponownie wirowano. Z kolei osad komórek przeniesiono do 10 ml pożywki hodowlanej.

Jako pożywkę zastosowano roztwór soli Earle'a. Zastosować można w tym celu również inne pożywki. Pożywka wzrostowa zawierała 10% osocza cielęcego, a pożywka zachowawcza 5%. Ponadto pożywka zawierała w 1 litrze 50 ml hydrolizatu laktalbuminy i ewentualnie antybiotyk lub kilka antybiotyków. Hodowle prowadzono w normalnych naczyniach do hodowli tkankowej, np. w płaskich butlach ze szkła lub z tworzywa sztucznego. Pożywkę hodowlaną wymieniano po 2–3 dniach. Po 4–6 dniach w 37°C pierwotne hodowle komórkowe były zwykle pokryte warstwą komórek.

Do pasażów szczepu B1 wirusa TGE i oznaczania zakaźności wirusa w różnych częściach jelita cienkiego zastosowano wtórne hodowle komórkowe tarczycy świńskiej. Wtórne hodowle komórkowe uzyskano przez posiew pierwotnych hodowli komórkowych w stosunku 1:2.

Oslabienie wirusa przeprowadzono za pomocą 250–350 seryjnych pasażów na wtórnych komórkach tarczycy świńskiej, w 37°C. Pasáže prowadzono zwykłym sposobem. Na podstawie efektu cytopatogenicznego i miareczkowania wirusa stwierdzono, że miano wirusa osiąga zwykle wartość maksymalną po inkubacji w ciągu 24–28 godzin.

Przedmiot wynalazku jest ilustrowany poniżej następującymi przykładami.

Przykład I. Tarczycę świńską otrzymano ze zwykłych zarżniętych świń w rzeźni monachijskiej. Transportowanie przeprowadzono za pomocą PBS (solanka buforowana fosforanem), zawierającą 200 mg nebacetyny i 4 mg amfoterycyny w litrze.

Po wyodrębnieniu przeprowadzono sterylizację powierzchni (dwukrotnie 95% alkoholem), tarczycę cięto na kawałki 1–2 mm i przemywano trzykrotnie PBS.

Trypsynowy roztwór PBS w ilości 0,37% (który był wolny od Ca²⁺ i Mg²⁺) dodano do otrzymanych w ten sposób kawałków materiału tkankowego i poddano działaniu frakcjonowanej trypsyny w temperaturze 37°C. Pobierano pierwszą frakcję trypsynową (otrzymaną po 1 godzinie działania trypsyny), a następnie 3–4 frakcje (każdą otrzymaną po 1,5 godziny działania trypsyny).

Zawiesinę komórki-trypsyna osączono i frakcję przechowywano w temperaturze 4°C. Aktywność trypsyny określono po dodaniu serum.

Na zakończenie zawiesinę komórki-trypsyna odwirowano w czasie 10 minut, otrzymując 500 g materiału tkankowego. Supernatant oddzielano, a osad powtórnie rozpuszczano w PBS i odwirowywano powtórnie. Osad komórkowy wprowadzano do 10 ml roztworu i otrzymane komórki oceniano za pomocą 1% roztworu błękitu trypanu.

Stosowano wyjściowe komórki kulturowe w stężeniu 500 000 komórek w 1 ml roztworu. Pierwsze dwa dni kultury nie miały tendencji do rozkładania na ściankach szklistej warstwy komórek. Środowisko zmieniano po 2–3 dniach, chociaż często nie było to konieczne. Zazwyczaj po 4–6 dniach

kultury komórkowe tarczycy świńskiej były pokryte tkanką nabłonkową. Jeżeli nie, kultury odrzucono.

Kultury komórkowe dla subkulturowania wydzielano ze szklatego nalotu za pomocą roztworu solanka—trypsyna—wersenian, zawierającego:

100 ml solanki (wolnej od Ca^{2+} i Mg^{2+})

50 ml 1,25% roztworu trypsyny

25 ml 1% roztworu wersenianu

10 ml 8,8% roztworu NaHCO_3

oraz wodę do 1000 ml.

Materiał komórkowy przemywano i zalewano wymienionym roztworem. Po 15 minutach komórki łatwo wyodrębniano. Po odwirowaniu (około 500 g w czasie 3 minut) komórki wprowadzano do butelek i rozdzielano w stosunku 1:2.

Przykład II. Wpływ seryjnego pasażu na tkankę tarczycy świńskiej na zjadliwość wirusa zbadano na nowonarodzonych prosiętach. Do prób brano po 2 prosięta z miotu, podając im po 2 ml zawiesiny wirusa z pasażu nr 2 (2×10^4 PFU/ml), 120 (2×10^6 PFU/ml), 250 (8×10^6 PFU/ml), 300 (4×10^6 PFU/ml) i 350 (4×10^6 PFU/ml). PFU/ml oznacza liczbę jednostek płytkotwórczych w ml.

W wieku 1—2 dni zwierzęta doświadczalne odłączono od macior, które nie miały przeciwciał neutralizujących wirusa TGE i karmiono je z butelki. W drugim dniu życia prosięta zakażono doustnie podaniem 2 ml jednej z powyższych zawiesin

seryjnie pasażowanego wirusa. Dziesięciu prosiętom kontrolnym dano po 2 ml pożywki hodowlanej.

Kliniczny przebieg choroby sprawdzano 2 razy dziennie. Prosiętom, które przeżyły, pobrano 10 dnia krew na oznaczenie przeciwciał. Oznaczenia przeprowadzono metodą mikromiareczkowania [K.H. Witte, Arch. ges. Virusforsch. 33 (1971), 171—176].

Otrzymane wyniki przedstawiono w tablicy 2.

Pierwsze objawy biegunki obserwowano po upływie czasu inkubacji. Wymioty wystąpiły tylko u prosiąt, które otrzymały wirusa z drugiego pasażu. Dla tego pasażu czas inkubacji wynosił 16—18 godzin. Przy wyższych poziomach pasażowania następowało wydłużenie czasu inkubacji wzrastające do 80 godzin przy pasażu nr 300.

Po zakażeniu wirusem z pasażu nr 2, 120 i 250, zwierzęta dostały biegunki, która trwała kilka dni. Prosięta, które otrzymały wirusa z pasażu nr 300 miały stolec o rozrzedzonej konsystencji jedynie w ciągu kilku dni, natomiast te, które otrzymały wirusa z pasażu nr 300, nie wykazały żadnych objawów choroby.

Prosięta, zakażone szczepem wirusa z pasażu nr 2, padły w 1—2 dni po zakażeniu. Żadne z prosiąt (6) nie przeżyło zakażenia wirusem po 120 pasażach. Z czterech prosiąt, zakażonych wirusem po 250 pasażach, przeżyło jedno. Przeżyły wszyst-

Tablica 2

Liczba pasaży	Nr prosięcia	Kliniczne objawy w dniu									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	13	—		x							
	14	—		+++	x						
120	15	—	—	++	++	+++	x				
	16	—	—	+	++	++	+++	++	+++	x	
	17	—	—	—	++	+++	+++	x			
	18	—	—	+	+	++	++	x			
	19	—	—	++	+++	+++	x				
	20	—	—	+	++	++	++	++	x		
250	85	—	—	—	++	++	+++	x			
	86	—	—	—	+++	+++	x				
	87	—	—	—	—	++	++	++	x		
	88	—	—	—	+++	+++	+	+	—	—	1 : 128
300	51	—	—	—	—	—	(+)	—	—	—	1 : 8
	92	—	—	—	—	—	(+)	—	—	—	1 : 16
	53	—	—	—	—	—	(+)	—	—	—	1 : 4
	54	—	—	—	—	—	(+)	—	—	—	1 : 64
350	76	—	—	—	—	—	—	—			
	77	—	—	—	—	—	—	—			
	78	—	—	—	—	—	—	—			
	79	—	—	—	—	—	—	—			
	80	—	—	—	—	—	—	—			
	81	—	—	—	—	—	—	—			
	82	—	—	—	—	—	—	—			
	83	—	—	—	—	—	—	—			

+ do +++ biegunka słaba do silnej

x martwe

— brak objawów

kie prosięta, zakażone wirusem po 300 i 350 pasażach.

Z powyższych danych wynika, że do 250 pasaży następuje jedynie niewielkie osłabienie zjadliwości. Zakażenie takim wirusem zwykle powoduje wystąpienie poważnych objawów chorobowych i śmierć. Przykład III. Przykład ten ma na celu określenie, w jakim odcinku jelita cienkiego następuje namnażanie wirusa, osłabionego sposobem według wynalazku, w zależności od liczby pasaży. W tym celu nowonarodzonym prosiętom podano zawiesiny wirusa po liczbie pasaży jak w doświadczeniu A i w identyczny jak w tym doświadczeniu sposób. Natychmiast po zaobserwowaniu pierwszych objawów typowego zakażenia wirusem TGE, prosięta, które były przetrzymywane w izolacji i zakażane indywidualnie, zostały uśmiercone. Pobrano z nich łącznie 10 próbek jelita cienkiego, w równych odstępach po 25—35 cm, poczynawszy od dwunastnicy. Próbek tych użyto do oznaczenia miana wirusa, rozprzestrzenionego w różnych częściach jelita cienkiego. Miano oznaczono po homogenizacji próbki w moździerzu i wirowaniu 10% zawiesiny w PBS.

Z odwirowanej cieczy sporządzono 10-krotne rozcieńczenia i każdym z nich, w ilości po 0,2 ml,

inkubowano po 4 próbowki hodowlane z komórkami tarczycy świńskiej. Po inkubacji w ciągu 7 dni w 37°C odczytano efekt cytopatogenetyczny i oznaczono miano metodą Kärbera [Naunyn-Schmiedeberts Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 162 (1931) 480—482].

Otrzymane wyniki przedstawiono w tablicy 3.

Jak wynika z danych przedstawionych w tablicy 3, zjadliwy wirus z pasażu nr 2 namnażał się na całej długości jelita cienkiego, z wyjątkiem dwunastnicy. To samo dotyczy wirusa z pasażu nr 120 i 250. Dla wirusa z pasażu nr 2 miano wynosiło od 0,5 do 1,0 log₁₀ TCID₅₀/0,2 ml, natomiast dla wirusa z pasażu nr 120 od 2,0 do 4,0 i 4,5 log₁₀ TCID₅₀/0,2 ml. Podobne miano znaleziono dla pasażu nr 250 i 300. Natomiast w przypadku pasażu nr 350 namnażanie wirusa mogło być wykazane jedynie w środkowej części jelita cienkiego.

Przykład IV. Przykład ten wykazał, że wirus po 300 pasażach, otrzymany sposobem według wynalazku, podany ciężarnej maciorze, skutecznie chroni prosięta przed zakażeniem zjadliwym wirusem TGE ze szczepu Millera.

Doświadczenie prowadzono z dwoma grupami, obejmującymi łącznie 13 macior. W momencie

Tablica 3

Liczba pasaży	Czas inkubacji	Miano wirusa w odcinku jelita nr	Liczba pasaży	Czas inkubacji	Miano wirusa w odcinku jelita nr
1	2	3	1	2	3
2	16 godzin (dośw. 1) 18 godzin (dośw. 2)	1 : nieoznaczalne 2 : 0,5 3 : 0,5 4 : 0,5 5 : 1,0 6 : 0,5 7 : 0,5 8 : 0,5 9 : 0,5 10 : 0,5	300	76 godzin (dośw. 1) 80 godzin (dośw. 2)	1 : 1,5 2 : 1,0 3 : 3,0 4 : 3,0 5 : 4,0 6 : 3,5 7 : 2,5 8 : 3,5 9 : 3,5 10 : 4,5
120	30 godzin (dośw. 1) 34 godziny (dośw. 2)	1 : 2,0 2 : 2,5 3 : 2,5 4 : 3,5 5 : 3,0 6 : 4,5 7 : 3,0 8 : 2,5 9 : 3,0 10 : 2,5	350	brak objawów	1 : nieoznaczalne 2 : nieoznaczalne 3 : nieoznaczalne 4 : nieoznaczalne 5 : 2,5 6 : 3,0 7 : 0,5 8 : nieoznaczalne 9 : nieoznaczalne 10 : nieoznaczalne
250	40 godzin (dośw. 1) 52 godziny (dośw. 2)	1 : nieoznaczalne 2 : 1,5 3 : 1,5 4 : 2,0 5 : 3,0 6 : 2,0 7 : 2,5 8 : 3,5 9 : 2,5 10 : 2,5	kontrola nie zakażona brak objawów		1—10 : nieoznaczalne

rozpoczęcia doświadczenia wszystkie maciory były wolne od przeciwciał wirusa TGE.

Grupa I obejmowała 8 macior uodpornionych doustnie dwukrotnie w około 5 tygodni oraz 2 tygodnie przed przewidywanym porodem. Uodpornienie przeprowadzono doustnie przez podawanie 4 ml zawierającego wirusa materiału, znajdującego się w kapsułce kwasoodpornej.

Grupa II obejmowała 4 maciory, które otrzymywały połowę dawki doustnej (2 ml) w kapsułce oraz połowę donosowo. Materiał, zawierający wirus, był nieszkodliwy wobec macior. Jedną maciore stosowano jako kontrolną, przy czym maciore ta nie otrzymała wirusa.

Zjadliwego wirusa testowego szczepu Millera wirusa TGE otrzymano, wprowadzając 10% zawiesinę w PBS drobno roztartego jelita cienkiego z wirusem po trzech pasażach przez prosięta. Po odwirowaniu podzieleniu na porcje objętości po 2 ml i zamrożeniu do temperatury -70°C , powyższy materiał stosowano do zakażenia wszystkich prosiąt, pochodzących z 13 macior w trzecim dniu życia. W tym celu podawano każdemu prosięciu po 1 ml zawiesiny, która była rozcieńczona tak, że zawierała 100–1000 PID. PID oznacza dawkę zakażającą prosięcia.

Otrzymane wyniki przedstawiono w tablicy 4.

Tablica 4

Miano neutralizujące osocza maciory i prosiąt po biernym uodpornieniu pasażem nr 300 szczepu TGE B1 i liczba prosiąt żyjących 15 dni po narodzeniu

Maciora nr	Miano ¹⁾ 1 dzień po narodzeniu	Miano ¹⁾ dzień po narodzeniu prosięcia			Prosięta narodzone/żywe po zakażeniu
		3	7	14	
1	2	3	4	5	6
Grupa I					
15	A 8	16	32	64	
	B < 1	8–32	16–32	8–16	4/4
22	A 16	16	8	156	
	B < 1	2–8	2–16	2–16	11/7
23	A 32	32	64	128	
	B < 1	16–128	8–128	16–64	10/10
25	A 32	64	64	64	
	B < 1	16–128	16–64	4–32	11/11
26	A 4	4	4	64	
	B < 1	1–4	2–4	8–64	6/5
39	A 16	16	32	256	
	B < 1	2–32	8–32	32–128	8/7
42	A 2	2	16	256	
	B < 1	2	2–32	4–256	6/4
44	A 64	64	>256	16	
	B < 1	16–256	128–256	8–16	7/7
Grupa II					
17	A 16	16	64	32	
	B < 1	16–32	4–32	4–32	5/5
29	A 32	32	128	256	
	B < 1	16–64	2–64	128–256	7/6
33	A 128	256	128	128	
	B < 1	256–512	128–256	16–128	9/9
35	A 16	16	64	64	
	B < 1	16–32	4–16	8–32	3/3
45	A < 1	< 1	< 1	128	
kontrolna					
	B < 1	< 1	—	—	6/0

Uwagi: Miano 1 oznacza całkowite zobojętnienie przez nierozcieńczone serum.

A — serum maciory

B — serum prosięcia

11

Po zakażeniu wirusem złośliwym szczepu Millera 55 z 63 prosiąt, tj. 87% z grupy I przeżyło to zakażenie. W grupie II 23 z 24 prosiąt przeżyło. Jednakże wszystkie 6 prosiąt z grupy kontrolnej padło w ciągu 7 dni po narodzeniu.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania osłabionego wirusa zakaźnego zapalenia żołądka i jelit, **znamienny tym,**

12

że zjadliwy szczep tego wirusa TGE izoluje się bezpośrednio na tkankę tarczycy świńskiej i poddaje 250—300 pasażom w temperaturze 37°C.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym,** że jako zjadliwy szczep wirusa stosuje się szczep B1.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym,** że w każdym pasażu wirus inkubuje się w temperaturze 37°C, w ciągu 1—2 dni, oddziela ciecz zawierającą wirus i poddaje ją następnym pasażom na komórkach tarczycy świńskiej.