



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

201 802
(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlásené 02 02 78

(21) PV 681-78

(51) Int. Cl. A 61 K 39/245,
C 12 N 7/06

(40) Zverejnené 29 02 80

(45) Vydané 30 04 83

(75)

Autor vynálezu ŽUFFA ALOJZ doc.MVDr.CSc.,
BRÁNYIK ALEXANDER ing.CSc.,
SALAJ JURAJ MVDr.,
ŽUFFOVÁ JOLANDA ing., NITRA
MENŠÍK JAROMÍR doc.MVDr.CSc., KLADKY
STĚPÁNEK JAN MVDr.CSc., BRNO

(54) Inaktivovaná adjuvantná vakcína proti Aujeszkeho chorobe a spôsob jej prípravy

1

Vynález sa týka inaktivovanej adjuvantnej vakcíny proti Aujeszkeho chorobe vnímavých druhov hospodárskych a užitkových zvierat a spôsobu jej prípravy.

Vírus Aujeszkeho choroby vyvoláva nákazlivé ochorenie u viacerých druhov hospodárskych a užitkových zvierat, to je ošipáných, hovädzieho dobytku, oviec, psov, mačiek a kožušínových zvierat, ktoré sa vyznačuje vysokou morbiditou a mortalitou a zapríčiňuje vysoké národohospodárske straty. Ochranné očkovanie proti Aujeszkeho chorobe sa doposiaľ robí predovšetkým pomocou živých vakcín, vyrábaných z atenuovaných, respektíve avirulentných kmeňov /Žuffa, A., Grunert, Z., 1974: Les vaccines utilisés en Tchécoslovaquie contre la maladie D Aujeszky., Cah. Méd. Vét. 43, 334-337; Bártha, A., 1961: Kísérletek az Aujeszky-féle vírus virulenciájának szelídítésére., Magyar állatorv. lapja 16 /2/, 42-45/. Živé vakcíny z avirulentných kmeňov sú neškodné a ich aplikácia v primeranej dávke vyvoláva u očkovaných zvierat ochranu proti klinickému ochoreniu pri ich kontakte s infekciou /Žuffa, A., 1976: The significance of specific prophylaxis for control of Aujeszky's disease., Proc. 4-th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Ames USA, G 10 /En/; Szabó, A., Grunert, Z., 1971: Persistence of virulent Pseudorabies Virus in Herds of Vaccinated and Nonvaccinated Pigs., Acta Virologica, 15, 87-94/. Proti používaniu živých vakcín sa vyslovujú námietky, že sa nimi vnáša do chovu a populácie ošipáných infekčné agens, ktoré môže u vakcinovaných zvierat pretrvávajúť a pri presune vakcinovaných zvierat do zdravých chovov sprostredkovať prenos infekcie /Škoda, R., 1976: The

control of Aujeszky's disease in large swine units by use of attenuated live vaccines. Proc. 4-th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Ames USA, G 6/, Baskerville, A., Ferran, J.B., Dow, C., 1973; Aujeszky's disease in pigs., Vet. Bull. 43/9/, 465-480/. Tieto námietky proti používaniu živých vakcín sa stali opodstatnenými najmä potom, čo sa dokázalo, že vírus Aujeszkyho choroby, rovnako ako iné herpetické vírusy ľudí a zvierat, môže po primárnej infekcii, doprevádzanej klinickým ochorením alebo prebiehajúcej inaparentne, navodiť pretrvávajúcu latentnú infekciu /Sabó, A., Rajčáni, J. 1976; Latent pseudorabies virus infection in pigs., Acta virologica, 20, 208-214/.

Používanie živých vakcín je preto indikované v oblastiach enzooticky zamorených Aujeszkyho vírusom, kým v oblastiach a štátoch so sporadickým výskytom Aujeszkyho choroby sa odporúča používať vakcíny inaktivované.

Osobitný význam a uplatnenie najde účinná inaktivovaná vakcína proti Aujeszkyho chorobe pri ochrannom očkovaní hovädzieho dobytku a oviec. Tieto druhy zvierat sú totiž na infekciu Aujeszkyho vírusom veľmi vnímavé, pričom ochorenie prebieha vo všetkých prípadoch letálne. Živé vakcíny, neškodné pre najnižšie vekové kategórie uvedených druhov zvierat, musia sa preto vyrábať z avirulentných kmeňov s limitovanou schopnosťou reprodukcie v organizme očkovaných. To však znamená, že pri antigénnej stimulácii sa uplatňuje len malé množstvo inokulovaného vakcinačného vírusu, čoho prejavom je pomerne slabá imunitná odpoveď. Pri inaktivovanej vakcíne možno do aplikačnej dávky koncentrovať pomerne veľké množstvo vírusového materiálu, ktorého antigenitu možno ďalej potencovať väzbou na vhodné adjuvans.

Inaktivované vakcíny, vyrábané z orgánov experimentálne infikovaných zvierat, sa ukázali ako neúčinné. Prvé pokusy o prípravu účinnej inaktivovanej vakcíny proti Aujeszkyho chorobe z vírusu napestovaného na bunkových kultúrach a inaktivovaného formaldehydom /Koch, A., Abraham, E., 1952: Immunisationsversuche mit dem Aujeszkschen Virus., Acta vet. Hung. II/4/, 270-279.; Žuffa, A. 1963: Versuch zur Immunisierung von Laboratoriumstiere und Schweinen mittels Formaldehyd- und UV/Strahlen inaktiviertem Aujeszky-Virus., Arch.f. Exptl. Vet.-med. 17/3/, 593-613/, alebo ultrafialovými lúčmi /predtým citovaný Žuffa, Béládi, I., Ivánovics, D., 1954: Immunisierung von Laboratoriumstieren mit dem Virus der Aujeszkschen Krankheit nach dessen Inaktivierung mit Ultraviolettstrahlen. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 2/1-2/, 151-160/, s použitím gélu hydroxidu hlinitého ako adjuvans, sa ukázali neúspešné. Ani rozrušenie infekčnosti Aujeszkyho vírusu, napestovaného na bunkových kultúrach, pomocou kyseliny dusitej nevedlo k príprave účinnej inaktivovanej vakcíny. Vo vakcínach pripravených z vírusov inaktivovaných pomocou saponínu /Barbinschi, G., Papadopol, M., 1966: Cercetari privind imuzarea in boala lui Aujeszky cu vacciu preparat din virus des cultura adsorbit si saponinat. Lucr. Inst Pasteur III/1-1964/, 71-84/, alebo kryštálovej violeti /Medjalkov, S. a spol., 1968: Versuche zur Herstellung von Vakzine gegen Aujeszksysche Krankheit aus inaktiviertem Virus. 1. Mitt. Arch. exp. Vet. Med. 22, 499-507/, nemožno vylúčiť prítomnosť infekčného vírusu /predtým citovaný Baskerville a spol. 1973/. Efektívnejšou sa ukázala vakcína pripravená Haralambievom a spol. /Haralambiev, H., Mermer-ski, K., Simeonov, S., 1967: Untersuchungen über die Immunogenität der mit Aethanol inaktivierten Vakzine gegen die Aujeszksysche Krankheit., Arch. exp. Vet. Med. 21/2/, 501-507/

z tkanivového vírusu inaktivovaného pomocou etanolu s pridaním parafínového oleja ako adjuvans. Nakoľko ide o jednoduché zmiešanie vody s olejom, dochádza po krátkodobom státi emulzie vakcíny k rozdeleniu na vodnú a olejovú fázu. Simeonov a spol. /Simeonov, S., Vasiliev, V., Jotov, M., 1973: Srovnatelno izpitvanie na saponinovi vaksiny protiv bolestta na Aujeszki., Vet. Med. Nauki 10/2/, 83-88/ nahradili olejové adjuvans saponinom. Porovnávali účinnosť troch inaktivovaných vakcín, pripravených pomocou formaldehydu, kryštáľovej violeti a saponínu. Borgen, H.C., Expensen, L., 1970: Immunizing effect of photoinactivated pseudorabies virus., Zbl. Bakt. I. Orig., 214/1/, 13-16, predložili v uvedenej publikácii dokaz o tom, že vystavenie Aujeszkyho vírusu posobeniu ultrafialových lúčov vedie k rozrušeniu jeho infekčnosti bez porušenia povrchových štruktúr virionov a tým k zachovaniu antigenity. Keďže testovanie imunizačných schopností vírusu inaktivovaného ultrafialovými lúčmi sa robilo aplikáciou veľkých, pre praktické účely nepoužiteľných dávok, a nakoľko technické ťažkosti inaktívácie a technologické problémy spracovania inaktivovaného vírusu na vakcínu ostali neďoriešené, nenašiel tento spôsob inaktívácie Aujeszkyho vírusu pri výrobe vakcíny proti Aujeszkyho chorobe praktické uplatnenie. Preukaznú imunitnú odpoveď vyvolala vakcína predstavujúca vírus napestovaný na bunkovej kulture stabilnej škrečkej línie BHK-21, inaktivovaný etyletylénimínom a viazaný na dietylamínoetyl dextran /Škoda, R., Wittmann, G., 1973: Die Immunisierung von Schweinen mit Vakzinen aus Inaktiviertem Aujeszky-Virus. Zbl. Vet. Med. B 20, 127-138/. Jednorázové podanie vakcíny ošipánym v primeraných dávkach vyvolalo aktívnu tvorbu protilátok a chránenosť proti infekcii definovaným množstvom virulentného vírusu. Neudáva sa však stupeň imunity po aplikácii nižších dávok vakcíny, resp. u dobytka len po dvojnásobnom očkovaní, ako sa to vyžaduje pre praktické používanie vakcíny.

DeLagneau a spol. /De Lagneau, J.F., a spol. 1975: Immunisation contre la maladie D'Aujeszky a l'aide d'un nouveau vaccin huileux a virus inactivé, Rec. Méd. Vet. 151/10/, 561-575/ použili pre inaktivovanie Aujeszkyho vírusu, pomnoženého na bunkovej línii IB-RS-2, klasický spôsob, to je formaldehyd a pre stimulovanie antigenity vírusu lipoidné adjuvans. Dvojnásobné podanie vakcíny vyvolalo u laboratórnych zvierat a ošipáných tvorbu protilátok v titroch 1:16 až 1:128 a chránenosť proti infekcii definovaným množstvom letálnych dávok. Účinnú inaktivovanú vakcínu proti Aujeszkyho chorobe pripravil Genov a spol. tak, že vírus inaktivoval 1,3-propiolaktónom a následne ho viazal na adjuvans predstavujúci gél hydroxidu hlinitého /Genov, I., Rezačka, A., Genova, A., 1967: Polučavane inaktivirana s betapropiolakton vakcina srešču bolestta na Aueski s štam Ruse/. Nedostatkom tejto vakcíny je použitý inaktivačný prostriedok, ktorý bol vyradený zo zoznamu látok, použiteľných pre prípravu biopreparátov, nakoľko sa dokázala jeho mutagenita /Paerish, B.J., Searle, C.D., 1966: Carcinogenicity of beta-propiolactone and 4-nitro quinoline N-oxide for the skin of guinea pig., Brit. J. Cancer 20, 200-205/.

Nevýhodou doposiaľ navrhovaných inaktivovaných vakcín proti Aujeszkyho chorobe je, že sú pripravené alebo z vírusu napestovaného na kultúrach stabilných bunkových línii, čo ovplyvňuje neškodnosť vakcín pre potenciálnu onkogenitu takýchto tkanív, alebo na primárnych kulturach pripravovaných z obličiek 1 až 3 mesačných ošipáných, čo zvyšuje výrobné

náklady. Okrem toho, pri doposiaľ pripravených inaktivovaných vakcínach proti Aujeszkyho chorobe nebol dostatočne deklarovaný imunizačný účinok pre všetky druhy vnímavých a ekonomicky zaujímavých zvierat, pri aplikácii rozdielnych dávok vakcíny.

Uvedené nedostatky sú riešené inaktivovanou adjuvantnou vakcínou proti Aujeszkyho chorobe vnímavých druhov hospodárskych zvierat, obsahujúcou v 1 ml $10^{6,0}$ až $10^{7,5}$ TKID₅₀/ml inaktivovaného vírusu Aujeszkyho choroby, kmeňa Rača-TK-5, uvedeného v Československej zbierke mikroorganizmov na Výskumnom ústave veterinárneho lekárstva v Brne Medlánkach, Hudcova ul. 60 pod označením CCM V-95 a $10^{7,5}$ až $10^{8,5}$ TKID₅₀/ml inaktivovaného vírusu Aujeszkyho choroby kmeňa Buk-TK-200 uloženého v predtým citovanej zbierke pod označením CCM V-93, emulgovaného v lipoidno-saponínovom adjuvans a spôsobom jej prípravy, pozostávajúcej z výberu a vhodného pomeru imunogenných vírusových kmeňov so schopnosťou rásť na heterológnom tkanive vzhľadom k očkovancovi, účinnej inaktivácie etanolom a saponínom, pri zachovaní antigenity a pomeru inaktivačných látok k zmesnému antigénu vybraných vírusových kmeňov.

Vírus Aujeszkyho choroby a to kmene BUK-TK-200 a Rača TK-5, sa osobitne pomnožujú známym spôsobom na primárnych kultúrach, alebo subkultúrach kuracích, alebo kačacích embryonálnych buniek, narastených na skle, alebo v suspenzii. Na kultiváciu bunkových kultúr použitých pre pomnoženie uvedených kmeňov Aujeszkyho vírusu sa použijú vhodné živné médiá, najmä tie, ktoré obsahujú fragmenty bovinného mliečneho albumínu a potrebné množstvo cicavčích, alebo vtáčích sér /Portefield, J.S., 1967: Animal tissue culture, v zborníku pod edičným vedením Maramorosha, K. a Koprowského, H., Acad. Press New York/. Nevylučuje sa použitie definovaných médií obsahujúcich látky ovplyvňujúce metabolickú a mitotickú aktivitu buniek vo vrstvových, alebo suspenzných kultúrach. Bunkové kultúry sa infikujú jednak kmeňom BUK-TK-200 a jednak kmeňom Rača TK-5, pri multiplicitate od 0,1 do $1,0$ TKID₅₀ na jednu bunku. Po 24 až 48 hodinovej inkubácii infikovaných kultúr pri 37°C sa získa pomnožený vírus v objeme udržiavacieho média s infekčnými titrami pri kmeni Rača TK-5 od $10^{6,0}$ až $10^{8,0}$ a pri kmeni BUK-TK-200 od $10^{7,0}$ do $10^{8,5}$ TKID₅₀ v 1 ml suspenzie. Pripravené vírusové suspenzie obidvoch kmeňov Aujeszkyho vírusu sa zbavia bunečného detritu sedimentáciou, odstredením, alebo filtráciou. Vírusové suspenzie kmeňov Rača TK 5 a BUK-TK-200 s uvedenými hodnotami infekčných titrov sa spolu zmiešajú v ľubovoľnom pomere, s výhodou v pomere 1:2 a následne inaktivujú posobením etanolu vo výslednej koncentrácii od 15 do 25 hmotových percent pri teplote 25 až 35°C počas 18 až 72 hodín, účinkom saponínu, ktorý je súčasne adjuvansom, vo výslednej koncentrácii od 0,05 do 0,4 hmotových percent pri teplote 20 až 35°C po dobu 18 až 72 hodín, kombinovaným účinkom etanolu a saponínu v jednom roztoku, alebo následným pridávaním jednotlivých látok bezprostredne po sebe, alebo do uplynutia 72 hodín v uvedených koncentráciách počas 14 až 72 hodín v rozsahu uvedených teplôt. Po kontrole inaktivácie vírusu, ktorá sa uskutoční intramuskulárnou aplikáciou králikom v dávkach 2 až 10 ml, sa antigény emulgujú so známymi adjuvantnými olejmi v definovanom pomere vodnej fáze k olejom. Lipoidno-saponínová emulzia vakcíny sa stabilizuje uložením počas 12 až 24 hodín pri teplote 20 až 25°C a následne

sa ochladí na 2 až 10 °C. Obsah adjuvantných olejov, ktoré obsahujú minerálne oleje o kine-
matickej viskozite $20 \cdot 10^6$ až $120 \cdot 10^6 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, estery vyšších mastných kyselín, akými sú
lanolín, arlacel, cereol a emulgátory typu tweenov v takom pomere, aby vytvárali emulziu
voda v oleji, alebo voda v oleji a vo vode, ktorých zastúpenie vo vakcíne predstavuje 12
až 60 hmotových %, s výhodou 16 hmotových %.

Príklad prevedenia

Uvedený príklad predmet vynálezu nijak neobmedzuje, ani nevyčerpáva. Primárne kultúry z
kuracích, alebo kačacích embryí, alebo ich subkultúry, vytvárajúce na povrchu skla kulti-
vačných nádob súvislú jednovrstvu, sa zbavia rastového média pozostávajúceho z Earlovho
roztoku obohateného o 7 hmotových percent telacieho séra a 0,4 hmotových percent laktalbu-
mínhydrolyzátu, prepláchnu 2 až 3 krát ústojným fyziologickým roztokom a jednotlivo infi-
kujú kmeňmi BUK-TK-200 a Rača-TK-5, uvedenými v popisej časti, pri multiplicité infekcie
0,1 až 1,0 TKID₅₀ na bunku. Infikované bunkové kultúry sa zalejú Earlovým roztokom oboha-
teným o 0,3 hmotových percent laktalbumínhydrolyzátu a inkubujú počas 24 až 48 hodín pri
37 °C. Po vírusšpecifickej degenerácii tkaniva, určenej mikroskopicky, sa inkubácia preru-
ší a získa infekčná kvapalina, ktorá sa zbaví bunečného detritu odstredením, alebo filtra-
ciou cez gázu. Dva objemové diely vírusovej suspenzie kmeňa Buk-TK-200 s infekčným titrom
najmenej $10^{7,5}$ TKID₅₀/ml a jeden objemový diel suspenzie kmeňa Rača-TK-5 s infekčným tit-
rom najmenej $10^{6,0}$ TKID₅₀/ml sa spolu zmiešajú a k zmesnej vírusovej suspenzii sa pridá
etanol do výslednej koncentrácie 20 hmotových percent a roztok saponínu o koncentrácii 10
hmotových percent vo vode do výslednej koncentrácie 0,1 hmotových percent vo vírusovej
suspenzii. Inaktivačné prostriedky sa pridávajú v spoločnom roztoku, alebo v následnosti
bezprostredne po sebe. Inaktivácia prebieha počas 72 hodín pri teplote 30 °C.

Štyri objemové diely zmesnej inaktivovanej vírusovej suspenzie sa zmiešajú s 0,85
objemovými dielmi ľahkých minerálnych olejov /napríklad Marcol/, 0,15 objemovými dielmi
esterov vyšších mastných kyselín /napríklad Arlacel/ a s 0,02 objemovými dielmi emulgá-
tora /napríklad Tween 80/ a zmes sa emulguje miešaním v zariadení pri vysokých obrátkach,
alebo pod účinkom tlaku /napríklad Turmix, alebo Ultrathurax/ pri laboratórnej teplote po-
čas 60 sekúnd. Lipoidno-saponínová emulzia vakcíny sa stabilizuje stáťím počas 16 hodín
pri laboratórnej teplote a následne sa skladuje pri 2 až 10 °C.

Účinnosť inaktivovanej adjuvantnej vakcíny proti Aujeszkyho chorobe, podľa vynálezu,
potvrdzujú výsledky v nasledujúcej tabuľke, v ktorej sa uvádzajú titre vírus neutralizu-
júcich protilátok v krvnom sére roznych druhov zvierat vnímavých na infekciu Aujeszkyho
vírusom v závislosti na množstve i.m. aplikovanej vakcíny a chránenosť proti vyvolávajú-
cej infekcii definovaným množstvom smrteľných dávok.

Tabuľka 1

Druh zvierat	Titre VN-protilátok v krvnom sére po dvojrázovej aplikácii ml vakcíny				Ochránenost' proti vyvolávajúcej infekcii ..LD ₅₀ u zvierat očkovaných .. ml vakcíny		
	1	2	5	10	1	2	5
Norky	2-4	4-16	4-32	N	10 ²	10 ³	N
Ošipané	4-16	8-32	8-64	N	10 ³	10 ⁴	10 ⁴
Hovädzí dobytok	2-16	8-64	8-128	32-256	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Inaktivovaná adjuvantná vakcína proti Aujeszkyho chorobe vnímavých druhov hospodárskych a úžitkových zvierat vyznačujúca sa tým, že v 1 ml obsahuje 10^{6,0} až 10^{7,5} TKID₅₀/ml inaktivovaného vírusu Aujeszkyho choroby kmeňa Rača-TK-5 CCM V-95 a 10^{7,5} až 10^{8,5} TKID₅₀/ml inaktivovaného vírusu Aujeszkyho choroby kmeňa Buk-TK-200 CCM V-93, emulgované v lipoidnom alebo lipoidno-saponínovom adjuvans.
2. Spôsob prípravy vakcíny podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa vírusové kmene Aujeszkyho choroby pomnožujú na vrstvených alebo suspenzných primokultúrach alebo subkultúrach kuracích alebo kačacích embryonálnych buniek a potom sa inaktivujú účinkom etanolu vo výslednej koncentrácii v médiu od 10 do 25 hmotových % pri teplote 25 °C až 35 °C počas 20 až 72 hodín, alebo účinkom saponínu vo výslednej koncentrácii v médiu od 0,1 do 0,33 hmotových % pri teplote 25 °C až 35 °C počas 12 až 72 hod., alebo kombinovaným účinkom etanolu a saponínu v ľubovoľnom poradí, alebo v spoločnom roztoku v uvedených koncentračných pomeroch pri teplote 12 °C až 37 °C počas 12 až 72 hod. a následne sa emulguje 80 až 420 ml vírusovej suspenzie v zmesi adjuvantných olejov obsahujúcich 60 až 85 ml ľahkých minerálnych olejov a 3 až 13 ml esterov mastných kyselín.
3. Spôsob prípravy vakcíny podľa bodu 2. vyznačujúci sa tým, že vytvorená emulzia sa stabilizuje státím pri 12 až 25 °C počas 10 až 28 hodín a následne sa ochladí na 2 až 10 °C.