



Patent dodatkowy  
do patentu

Zgłoszono: 25.XI.1963 (P 103 051)

Pierwszeństwo: 27.XI.1962 Stany  
Zjednoczone  
Ameryki

Opublikowano: 11.IX.1967

Kl. 30 h, 6

MKP ~~101 K~~

012 K 5/00

UKD

Współtwórcy wynalazku: Eben Arthur Slater, Carrel John Kucera

Właściciel patentu: N.V. Philips' Gloeilampenfabrieken, Eindhoven (Holandia)

### Sposób wytwarzania szczepionki przeciwko panleukopenii

1 Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania szczepionki przeciwko panleukopenii.

Wielu badaczy próbowało wyhodować w hodowli tkankowej wirusa panleukopenii, nie uzyskano jednak pozytywnego rezultatu. Stosowano hodowlę tkankową posiewów wirusa na tkance nerkowej kota wolnego od wirusa panleukopenii. Z niewyjaśnionych przyczyn wirus nie rozwijał się dalej po przeniesieniu do świeżej hodowli tkankowej.

Z uwagi na duże znaczenie szczepionki przeciw panleukopenii, w dalszym ciągu przeprowadzano liczne próby zmierzające do wytworzenia tej szczepionki. Niepowodzenia mogły być spowodowane tym, że jak się okazało kot nosi w sobie dużą ilość wirusów, które można łatwo uznać za wirusa panleukopenii.

Okazało się również, że posiewy wirusa panleukopenii mogą być zmieszane z innymi rodzajami wirusów, które rozwijały się w hodowli tkankowej, przy czym odnosiło się mylne wrażenie, że w hodowli rzeczywiście jest obecny wirus panleukopenii. Stwierdzono zupełnie niespodziewanie, że rozwój wirusa panleukopenii musi nastąpić najpierw w hodowli tkankowej tkanki zwierzęcia zakażonego wirusem panleukopenii, np. w hodowli tkanek nerkowych kota zakażonego panleukopenią, po czym wirus ten można przenosić do dalszych hodowli tkankowych.

2 Według wynalazku zdrowe zwierzę doświadczalne z rodziny Felidae np. kota, który jest wrażliwy na panleukopenię, szczepi się wirusem panleukopenii. Wirus może się rozwijać, a kiedy u zwierzęcia doświadczalnego pojawiają się symptomy choroby, uśmierca się je. Tkanka zabitego zwierzęcia zainfekowanego wirusem panleukopenii, korzystnie tkanka z nerek, zostaje usunięta i po spreparowaniu przeniesiona do hodowli tkankowej. W celu uzyskania dobrego wyniku ważne jest, aby tkanka zawierająca wirus stanowiła część hodowli tkankowej.

Z obserwacji mikroskopowych hodowli tkankowej z tkanką nerek i z wirusem wynika, że komórki nerkowe grupują się w pojedyncze warstwy komórek w ciągu niezbyt długiego okresu czasu. Około 2 do 10 dni po wytworzeniu hodowli tkankowej zbiera się ciecz hodowlaną i przenosi do hodowli tkankowej z nerek kota, nie zawierających wirusa panleukopenii.

Do każdego dalszego pasażowania zebranego wirusa można stosować, jak to już wcześniej zaznaczono, nową tkankę z nerek zdrowych kotów. Mniej więcej po piątym pasażu okazuje się, że zwierzę doświadczalne zakażone tak osłabionym wirusem wytrzymuje infekcję, jednak objawy chorobowe są dość silne. Z tego względu pożądane jest dalsze osłabienie wirusa, zanim zastosuje się go pod postacią szczepionki do uodpornienia kotów.

Z wirusa można sporządzić szczepionkę w ten sposób, że przeprowadza się co najmniej 6 lub korzystnie 10 pasaży przez hodowlę tkankową na tkankach nerek kota. Ogólną liczbę pasaży można podnieść tak wysoko, że hodowany wirus staje się nieantygeny, a więc nieczynny, co można stwierdzić na podstawie reakcji zwierzęcia zaszczepionego wirusem panleukopenii. Na ogół nie prowadzi się więcej niż 250 pasaży, ze względów zaś ekonomicznych nie przeprowadza się więcej niż 50 pasaży. Korzystną jest liczba 10—30, a zwłaszcza 20—30.

Szczepionkę według wynalazku można skutecznie stosować do uodpornienia każdego zwierzęcia z rodziny Felidae, np. kota domowego, ocelota, tygrysa, leoparda, pantery, jaguara, jak również nerek.

Szczepionka wytworzona sposobem według wynalazku nadaje się oprócz tego do ochrony nerek przeciw schorzeniom jelitowym. Do tego celu osłabiony wirus panleukopenii można przeprowadzać przez pasaż w sposób wyżej opisany. Na ogół stosuje się najmniej około 10, zwykle najmniej około 15 pasaży, ale zdarza się, że konieczne są pasáže w ilości 60. Szczepionkę można wstrzyknąć lub podać norce wrażliwej na schorzenia jelitowe lub młodej norce w wieku około 4 do 8 tygodni, w dawce około 10 do 1000 TCID 50 (TCID oznacza: tissue culture infective dosage), zwykle około 100—300 TCID 50.

Do szczepienia kotów przeciw panleukopenii dawka może wahać się w granicach około 10—1 000 TCID 50 (rzeczywiste granice uzależnione są od względów praktycznych, ekonomicznych i od efektu uodpornienia).

Zwykle dawka wynosi około 100—3 000 TCID 50. Koty można szczepić zawsze począwszy od wieku 6—8 tygodni do każdego wieku starczego, jeżeli są one wrażliwe na chorobę.

W celu otrzymania osłabionego wirusa tkankę, najczęściej tkankę nerkową kota zakażonego wirusem panleukopenii usuwa się w warunkach aseptycznych (w przypadku tkanki nerkowej usuwa się torebkę otaczającą każdą nerkę i zabezpiecza). Zainfekowaną tkankę, w cienkich warstwach podaje się obróbce trypsyną według J. S. Youngera (Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 85, 202, 1954). Otrzymaną zawiesinę komórek odwirowuje się, a ciecz usuwa się. W celu usunięcia resztek trypsyny, komórki roztwarza się na zawiesinę na nowo w su-

rowicy zwierzęcej, np. z cielęcia, po czym ponownie odwirowuje.

Surowicę ściąga się z wierzchu, a komórki zawiesza w pożywce, przy czym do hodowania komórek stosuje się pożywkę Parker'a 199, Karzon'a, Earle'go itd. bez antybiotyku lub z antybiotykiem, jak np. penicylina, streptomycyna itp. Do pożywki wprowadza się również surowicę zwierzęcą. Odpowiednimi zwierzętami do produkcji surowicy są: cielę, koń, jagnię, świnia, koza itp. Surowica stanowi około 7—15%, korzystnie około 10% pożywki. Na 200—400 części przygotowanej pożywki wprowadza się jedną część materiału komórkowego. Wirus hoduje się w temperaturze 30—37°C, zwłaszcza około 36°C. Pożywkę można zmienić po około 24—60 godzinach od momentu, kiedy zbite komórki łączą się z pożywką, a to w celu spowodowania szybszego wzrostu komórek i wirusa.

Przed dodaniem świeżej pożywki można doprowadzić  $p_H$  do wartości 6,5—7,8. Mniej więcej 1 i 1/2 dnia po tym, pożywkę znowu zmienia się, a ilość surowicy zwierzęcej maleje przy tym tak, że jej stężenie ostatecznie wynosi około 3—7%. W ciągu pierwszego pasaży można pożywkę zmieniać co 3—7 dni przy czym całkowity okres pasaży, trwa około 15—25 dni.

Po zakończeniu pierwszego pasaży ciecz ze środowiska hodowlanego przenosi się do środowiska hodowlanego z tkanką kota, nie zainfekowanego panleukopenią, a pobraną przed 20—60 godzinami. Podobnie jak w pierwszym pasaży, wirus znajduje się w pożywce o takim składzie jak poprzednio, w temperaturze hodow' uprzednio wymienionej. Pożywkę zmienia się co 1 1/2 do 5 dni, a przed zakończeniem pasaży co 3 do 7 dni, w ciągu całkowitego okresu pasaży trwającego około 6 do 20 dni. Czas trwania jednego pasaży określa się na podstawie stopnia degeneracji komórek zainfekowanego środowiska hodowlanego, tak że czas trwania każdego pasaży może różnić się od wartości wyżej podanej.

W celu bliższego wyjaśnienia wynalazku podano kilka przykładów postępowania:

#### Przykład.

Dwa koty domowe wrażliwe na panleukopenię (co stwierdzono serologicznie) zaszczepiono wirusem. Koty te liczyły 4 miesiące. Temperaturę w ciągu dnia i całkowitą liczbę białych ciałek krwi podano w poniższej tabeli I.

Tabela I

| Kot A                   |       |       |       |       |       |      |      |      |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|
| Ilość dni po inokulacji | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7    | 8    | 9    |
| Temperatura °C          | 39,5  | 39,2  | 38,3  | 39,8  | 38,3  | 39,3 | 39,5 | 40,6 |
| Białe krwinki           | 16950 | 17750 | 13550 | 14400 | 12400 | 5850 | 1300 | 300  |
| Kot B                   |       |       |       |       |       |      |      |      |
| Ilość dni po inokulacji | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7    | 8    | 9    |
| Temperatura °C          | 38,3  | 38,8  | 39    | 39,9  | 39,2  | 39,9 | 39   | —    |
| Białe krwinki           | 11950 | 9350  | 7400  | 13850 | 1500  | 1700 | 550  | —    |

Po stwierdzeniu klinicznych objawów choroby każdego kota usmiercono przez wstrzyknięcie pięciobarbitasiu sodowego, po czym oddzielnie przeprowadzono hodowlę tkankową na tkankach kota A i B w celu późniejszego testowego stwierdzenia, że właśnie oba koty były zarażone wirusem panleukopenii, a nie szczepem indywidualnym dla każdego kota. Nerki każdego kota usunięto w warunkach aseptycznych. Badanie nerek każdego kota wykazało, że koty cierpiały na panleukopenię. Symptomy kliniczne i pośmiertne odpowiadały tym, jakie opisał Hammon i Endens w J. Expl. Med. 69,327(1939).

Następnie usunięto torebkę z każdej nerki, a tkankę zabezpieczono i podzielono na cienkie warstwy i traktowano po tym trypsyną według Youngera. Zawiesinę komórek wirowano z szybkością 600 obrotów na minutę, a ciecz znajdującą się na wierzchu usunięto. Komórki zawieszono z kolei w 15 ml surowicy z cielęcia w celu zubożenia działania pozostałej trypsyny, po czym znowu wirowano. Surowicę usunięto, a zbite komórki zawieszono w pożywce w stosunku: 1 część zbitych komórek na 250 części pożywki. Pożywka składała się z roztworu soli Earle z dodatkiem 0,5% hydrolizatu albuminy mleka i 10% surowicy z cielęcia.

Zawiesinę komórek w ilości po 1 ml przeniesiono do zwykłych probówek stosowanych w hodowli

tkankowej. Probówki ustawiono pionowo i inkubowano w temperaturze  $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Po 48 godzinach większość komórek przylgnęła do szkła i wykazywała tendencję do reprodukcji. Starą pożywkę usunięto i zastąpiono świeżą o takim samym składzie. Przed dodaniem świeżej pożywki pH doprowadzono do wartości około 7,4. Hodowlę tkankową utrzymywano w tym stanie do 5 dni po uzupełnieniu pożywki. Pod koniec tego okresu pH spadło do wartości około 6,8. Pożywkę zastąpiono świeżą o tym samym składzie z tym, że zawartość surowicy zredukowano z 10% do 5%. W międzyczasie wartość pH spadła do 6,8. Pożywkę zmieniano w odstępach pięciodniowych w ciągu 18 do 20 dni po wprowadzeniu wirusa, a ciekłą fazę hodowli usuwano i zbierano. Zebraną ciecz stosowano do iniekcji wrażliwych kotów, aby stwierdzić ewentualne działanie wirusa.

1 ml zebranej cieczy z każdej z dwóch hodowli tkankowych, pochodzących od kotów A i B, wstrzykiwano wrażliwym kotom w różnych stadiach rozwojowych w celu stwierdzenia jej ewentualnego działania. W tabeli II litery A i B oznaczają to, że wirus otrzymano z kota A lub B, a cyfra po literze oznacza numer zwierzęcia doświadczalnego, któremu wstrzyknięto zebraną ciecz.

T a b e l a I I

|                              |       |       |       |      |      |      |         |
|------------------------------|-------|-------|-------|------|------|------|---------|
| Kot A — 1                    |       |       |       |      |      |      |         |
| Ilość dni po inokulacji      | 2     | 3     | 4     | 5    | 6    | 7    | 8       |
| Temperatura $^\circ\text{C}$ | 39    | 38,7  | 39,2  | 39   | 40,7 | 40,8 | nieżywy |
| Białe ciała krwi             | 13800 | 13100 | 9300  | 3350 | 950  | 850  |         |
| Kot A — 2                    |       |       |       |      |      |      |         |
| Ilość dni po inokulacji      | 2     | 3     | 4     | 5    | 6    | 7    | 8       |
| Temperatura $^\circ\text{C}$ | 39,1  | 38,7  | 38,8  | 39,2 | 40   | 39,2 | 39,5    |
| Białe ciała krwi             | 13450 | 13200 | 6650  | 1640 | 900  | 450  | 1000    |
| Kot B — 1                    |       |       |       |      |      |      |         |
| Ilość dni po inokulacji      | 2     | 3     | 4     | 5    | 6    | 7    | 8       |
| Temperatura $^\circ\text{C}$ | 39,1  | 39    | 38,8  | 38,3 | 39,7 | 39,7 | —       |
| Białe ciała krwi             | 11700 | 18500 | 14400 | 1340 | 9700 | 900  |         |
| Kot B — 2                    |       |       |       |      |      |      |         |
| Ilość dni po inokulacji      | 2     | 3     | 4     | 5    | 6    | 7    | 8       |
| Temperatura $^\circ\text{C}$ | 39,8  | 39    | 38,3  | 39,8 | 40,4 | 40,7 | nieżywy |
| Białe ciała krwi             | 17750 | 16950 | 13850 | 9350 | 2500 | 350  |         |

Cztery koty podane w tabeli II reagowały na wstrzykiwanie zebranej cieczy wyraźną gorączką i silnie zmniejszoną ilością białych ciałek krwi. Dwa koty były nieżywe w ósmym dniu po iniekcji wirusem, a pozostałe dwa były w stanie agonijnym. U wszystkich kotów wystąpiły symptomy panleukopenii. Tym samym udowodniono, że koty A i B cierpiały na panleukopenię.

Ciecz zebraną z pierwszej hodowli tkankowej zastosowano do inokulacji nowego środowiska hodowli tkankowej w drugim pasażu, w którym zastosowano tkankę zdrowego kota. Sposób preparowania nerek zdrowego kota był taki sam jak w

przypadku preparowania nerek kotów A i B zainfekowanych wirusem. Ciecz zebraną z pierwszych hodowli tkankowych dodano do zawiesiny komórek, w ilości 1 ml cieczy na 10 ml zawiesiny komórkowej.

Inkubację prowadzono w temperaturze  $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Po 48 godzinach pożywkę zastąpiono świeżą pożywką o tym samym składzie. Po 5 dniach powstała pełna płyta komórek, po czym pożywkę znowu zastąpiono świeżą pożywką, przy czym jednak stężenie surowicy z cielęcia obniżono do 5%. Następnie pożywkę stale zmieniano w odstępach 4–5 dni. Po wystąpieniu oznak degeneracji ma-

teriału komórkowego po 15 dniach zebrano ciecz i przeniesiono do świeżej hodowli tkankowej następnego pasażu.

W trzecim pasażu nerki zdrowego kota traktowano jak w sposobie opisanym dla drugiego pasażu, a zawieszinę komórek poddano także takiej obróbce jak w drugim stopniu. Zamiast zbierania cieczy

po 15 dniach, zebrano ją po 7 dniach. We wszystkich dalszych pasażach powtórzono ten sam sposób, aż wirus przeszedł przez 16 pasaży. Na końcu każdego pasażu szczepiono niezakażone koty domowe wrażliwe na panleukopenię, w celu stwierdzenia ewentualnego działania na koty osłabionego wirusa. Wyniki te podane są w poniższej tabeli III.

Tabela III (trzeci pasaż wirusa)

|                         |       |      |      |      |      |      |      |      |      |       |
|-------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Kot A—3                 |       |      |      |      |      |      |      |      |      |       |
| Ilość dni po inokulacji | 2     | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11    |
| Temperatura °C          | 39,3  | 39,7 | 39,6 | 39,8 | 38,7 | 40,2 | 41,1 | 39,4 | 38,4 | 38,4  |
| Białe ciała krwi        | 17550 | 8000 | 7500 | 8300 | 3300 | 1800 | 950  | 7600 | 9000 | 11100 |

Kot zaatakowany, temperatura i ilość krwinek pozostały w normalnych granicach.

|                         |       |      |      |      |      |      |      |       |       |       |
|-------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| Kot B—3                 |       |      |      |      |      |      |      |       |       |       |
| Ilość dni po inokulacji | 2     | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9     | 10    | 11    |
| Temperatura °C          | 37,8  | 39,7 | 38,9 | 39,2 | 40,1 | 41,3 | 41,2 | 41,2  | 40    | 39,6  |
| Białe ciała krwi        | 18050 | 6100 | 5250 | 9000 | 2150 | 2200 | 4450 | 21400 | 17100 | 13500 |

|                         |       |      |       |      |      |      |      |      |      |      |       |       |       |       |
|-------------------------|-------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| Kot B—4                 |       |      |       |      |      |      |      |      |      |      |       |       |       |       |
| Ilość dni po inokulacji | 2     | 3    | 4     | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12    | 13    | 14    | 15    |
| Temperatura °C          | 37,9  | 38,9 | 38,8  | 38,6 | 38,6 | 38,6 | 38,9 | 39,4 | 39,1 | 39,1 | 39,6  | 38,1  | 38,6  | 38,6  |
| Białe ciała krwi        | 13050 | 9150 | 10150 | 5500 | 4150 | 5100 | 3050 | 5250 | 8950 | 1550 | 32000 | 25100 | 20150 | 15950 |

Kot zaatakowany, temperatura i ilość krwinek pozostaje normalna.

|                         |       |      |      |      |      |      |      |       |       |       |       |       |       |      |       |
|-------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| Kot B—5                 |       |      |      |      |      |      |      |       |       |       |       |       |       |      |       |
| Ilość dni po inokulacji | 2     | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15   | 16    |
| Temperatura °C          | 38,3  | 38,9 | 39   | 39,1 | 40,2 | 37,2 | 38,2 | 40,2  | 38,1  | 37,9  | 38,4  | 38,3  | 38,8  | 38,6 | 38,8  |
| Białe ciała krwi        | 11950 | 9050 | 7250 | 7100 | 1300 | 6850 | 6850 | 10200 | 10850 | 15900 | 22250 | 33800 | 30900 | 3450 | 20300 |

Kot zaatakowany, temperatura, białe ciała krwi bez zmian.

|                         |                        |      |      |       |      |      |      |      |       |       |
|-------------------------|------------------------|------|------|-------|------|------|------|------|-------|-------|
| Kot B—6                 | (czwarty pasaż wirusa) |      |      |       |      |      |      |      |       |       |
| Ilość dni po inokulacji | 2                      | 3    | 4    | 5     | 6    | 7    | 8    | 9    | 10    | 11    |
| Temperatura °C          | 39,9                   | 39,1 | 38,3 | 37,9  | 39,1 | 40,7 | 40,4 | 37,7 | 40,6  | 39,1  |
| Białe ciała krwi        | 20500                  | 5050 | 9800 | 15800 | 1000 | 1400 | 2800 | 9700 | 24000 | 13450 |

Nie stwierdzono gorączki.

|                         |                      |       |      |      |      |      |      |      |       |       |
|-------------------------|----------------------|-------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| Kot A—4                 | (piąty pasaż wirusa) |       |      |      |      |      |      |      |       |       |
| Ilość dni po inokulacji | 1                    | 2     | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9     | 10    |
| Temperatura °C          | 39,2                 | 39,9  | 39,8 | 39,2 | 38,1 | 39   | 39,9 | 40   | 39,1  | 38,3  |
| Białe ciała krwi        | 23900                | 10500 | 8600 | 6500 | 3450 | 2700 | 2100 | 3500 | 10250 | 14700 |

Kot zaatakowany, temperatura i ilość białych ciałek krwi bez zmian.

|                         |       |      |      |      |      |      |      |       |  |
|-------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|-------|--|
| Kot A—5                 |       |      |      |      |      |      |      |       |  |
| Ilość dni po inokulacji | 1     | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8     |  |
| Temperatura °C          | 38,4  | 39,2 | 39,2 | 38,6 | 38,6 | 38,6 | 38,4 | 38,6  |  |
| Białe ciała krwi        | 12000 | 7900 | 8300 | 6400 | 6050 | 7450 | 8850 | 12000 |  |

Kot zaatakowany, temperatura i ilość białych ciałek krwi pozostają bez zmian.

Z tabeli III wynika, że wirus z trzeciego do piątego pasażu wywołał gwałtowną reakcję u wszystkich kotów domowych zaszczepionych tym wirusem. Po piątym pasażu można było szczepić koty A4 i A5 zjadliwym wirusem panleukopenii, przy czym nie występowały przypadki śmierci. Z obli-

czenia białych ciałek krwi u kotów A4 i A5 wynika, że reakcja kotów była dość gwałtowna.

Dalsze zdrowe koty, które były wrażliwe na panleukopenię zaszczepiono wirusem z dziesiątego pasażu. Wyniki podano w tabeli IV.

Tabela IV (dziesiąty pasaż wirusa kota A)

|                         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Kot 375                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Ilość dni po inokulacji | 0     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
| Temperatura °C          | —     | 38,3  | 37,8  | 38,2  | 38,2  | 38,1  | 38,2  | 37,2  | 38,3  |
| Białe ciałka krwi       | 18700 | 10800 | 8950  | 9800  | 9200  | 21900 | 15950 | 18500 | 18100 |
| Kot 376                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Ilość dni po inokulacji | 0     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
| Temperatura °C          | —     | 39    | 38,3  | 38,8  | 38,8  | 39,3  | 38    | 38,3  | 38,8  |
| Białe ciałka krwi       | 35400 | 18400 | 10950 | 17750 | 24100 | 28550 | 22900 | 24000 | 20600 |
| Kot 377                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Ilość dni po inokulacji | 0     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
| Temperatura °C          | —     | 40,1  | 38,2  | 39    | 39,1  | 38,8  | 37,7  | 37,2  | 39,1  |
| Białe ciałka krwi       | 18000 | 11950 | 20100 | 14600 | 35400 | 36850 | 30400 | 30500 | 27100 |
| Kot 378                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Ilość dni po inokulacji | 0     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
| Temperatura °C          | —     | 39    | 38,7  | 39,3  | 39,1  | 38,3  | 38,8  | 38,2  | 39,3  |
| Białe ciałka krwi       | 32900 | 24100 | 14600 | 10950 | 13400 | 17850 | 19050 | 18500 | 10200 |
| Kot 379                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Ilość dni po inokulacji | 0     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
| Temperatura °C          | —     | 38,1  | 38,1  | 38,2  | 38,8  | 38,6  | 38,3  | 38,1  | 38,8  |
| Białe ciałka krwi       | 13900 | 6250  | 6200  | 5800  | 9300  | 3900  | 8500  | 14100 | 1600  |
| Kot 380                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Ilość dni po inokulacji | 0     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
| Temperatura °C          | —     | —     | —     | 39,2  | 38,9  | 39,2  | 38,4  | 38,8  | 39,2  |
| Białe ciałka krwi       | 14800 | —     | —     | 14600 | 20950 | 36450 | 23950 | 25050 | 1400  |
| Kot 381                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Ilość dni po inokulacji | 0     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
| Temperatura °C          | —     | —     | —     | 39,2  | 39    | 39,1  | 38,6  | 38,4  | 38,9  |
| Białe ciałka krwi       | 19600 | —     | —     | 20100 | 22950 | 23100 | 28150 | 26250 | 2620  |
| Kot 382                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Ilość dni po inokulacji | 0     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
| Temperatura °C          | —     | —     | —     | 38,9  | 38,7  | 39    | 38,3  | 38,3  | 38,9  |
| Białe ciałka krwi       | 12400 | —     | —     | 11950 | 13250 | 18050 | 21900 | 20550 | 19550 |

9

Z powyższej tabeli wynika, że szczepienie kota domowego wirusem z dziesiątego pasażu nie wywołuje żadnej reakcji, albo tylko stosunkowo lekką reakcję. U wszystkich kotów z tabeli IV zaszczepionych osłabionym wirusem panleukopenii nie wystąpiły oznaki choroby.

10

Inne koty tego samego pochodzenia — co koty z tabeli IV zaszczepione tym samym zjadliwym wirusem w celach kontrolnych. Wyniki tych badań podane są w tabeli V.

Tabela V. Koty kontrolne — wirus z zainfekowanej śledziony kotów

|                         |       |       |       |       |        |        |      |      |        |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|------|------|--------|
| Kot 359                 |       |       |       |       |        |        |      |      |        |
| Ilość dni po inokulacji | 0     | 5     | 6     | 7     | 8      | 9      | 10   | 11   | 12     |
| Temperatura °C          | —     | 39,2  | 39    | 39    | 40,2   | martwy |      |      |        |
| Białe ciałka krwi       | 21650 | 5750  | 6450  | 7500  | 450    | —      |      |      |        |
| Kot 360                 |       |       |       |       |        |        |      |      |        |
| Temperatura °C          | —     | 39    | 39    | 40,7  | 39,9   | martwy |      |      |        |
| Białe ciałka krwi       | 2650  | 16600 | 20450 | 17150 | 3850   | —      |      |      |        |
| Kot 361                 |       |       |       |       |        |        |      |      |        |
| Temperatura °C          | —     | 39,2  | 39,3  | 35,6  | martwy |        |      |      |        |
| Białe ciałka krwi       | 14350 | 1200  | 13550 | 200   | —      |        |      |      |        |
| Kot 362                 |       |       |       |       |        |        |      |      |        |
| Temperatura °C          | —     | 38,9  | 38,9  | 38,4  | 39     | 38,4   | 38,6 | 38,6 | 38,4   |
| Białe ciałka krwi       | 10200 | 12750 | 9000  | 6700  | 3750   | 8100   | 4500 | 7350 | 5800   |
| kot przetrwał           |       |       |       |       |        |        |      |      |        |
| Kot 363                 |       |       |       |       |        |        |      |      |        |
| Temperatura °C          | —     | —     | —     | —     | 41,4   | 41,1   | 40,3 | 40,6 | martwy |
| Białe ciałka krwi       | 14050 | —     | —     | —     | 850    | 700    | 2850 | 7250 | —      |

|                  |       |   |   |   |       |       |        |               |       |
|------------------|-------|---|---|---|-------|-------|--------|---------------|-------|
| Kot 364          |       |   |   |   |       |       |        |               |       |
| Temperatura °C   | —     | — | — | — | 39,2  | 39,1  | martwy |               |       |
| Białe ciała krwi | 17150 | — | — | — | 23550 | 1150  | —      |               |       |
| Kot 365          |       |   |   |   |       |       |        |               |       |
| Temperatura °C   | —     | — | — | — | 39,7  | 40,1  | 38,9   | 38,3          | 38,6  |
| Białe ciała krwi | 12500 | — | — | — | 15150 | 18200 | 20550  | 15500         | 2700  |
| Kot 366          |       |   |   |   |       |       |        | kot przetrwał |       |
| Temperatura °C   | —     | — | — | — | 38,9  | 40,6  | 41,1   | 38,3          | 38,6  |
| Białe ciała krwi | 13500 | — | — | — | 3050  | 900   | 3300   | 6300          | 10350 |
|                  |       |   |   |   |       |       |        | kot przetrwał |       |

## 11

Z tabeli V wynika, że padła połowa kotów zaszczipionych zjadliwym wirusem panleukopenii. U wszystkich kotów wystąpiły typowe oznaki panleukopenii.

Jakkolwiek w poprzednich przykładach stosowano tkankę z nerek, takie same wyniki daje stosowanie tkanek z wnętrzości, migdałków, jąder, płuc, wątroby, śledziony, serca i podobnych tkanek niedźwiedzia i szarego lisa.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania szczepionki przeciwko panleukopenii z osłabionego wirusa, **znamienny tym**, że przeprowadza się hodowlę tkankową wirusa na tkance kota zarażonego wirusem panleukopenii umieszczonej w pożywce wzrostowej, po czym zebrany z pierwszego pasaży wirus przeprowadza się w szeregu kolejnych pasaży przez hodowle tkankowe na tkankach kota wolnego od wirusa panleukopenii, otrzymując w ten sposób osłabiony wirus panleukopenii.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wirus przeprowadza się co najmniej 6 razy przez hodowle tkankowe na tkankach kota.

## 12

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wirus przeprowadza się kolejno około 10—30 razy przez hodowle tkankowe na tkance nerkowej kota.
4. Sposób według zastrz. 1—3, **znamienny tym**, że przeprowadza się hodowlę tkankową wirusa na tkance kota zarażonego wirusem panleukopenii, poddanej uprzednio obróbce trypsyną i umieszczonej w pożywce wzrostowej zawierającej surowicę krwi zwierzęcia, która kilkakrotnie wymienia się, po czym zebrany z pierwszego pasaży wirus przeprowadza się w szeregu kolejnych pasaży przez hodowle tkankowe na tkance kota wolnego od wirusa panleukopenii, umieszczonej w pożywce wzrostowej zawierającej surowicę krwi zwierzęcia, przy czym pożywkę kilkakrotnie wymienia się, a wskaźnikiem zakończenia każdego pasaży jest wystąpienie oznak degeneracji materiału komórkowego.
5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że do pożywki wprowadza się surowicę z krwi cielęcia.
6. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że jako pożywkę wzrostową stosuje się pożywkę Parkera 199, Karzon'a lub Earle'go.