



SUOMI—FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 65166

C (45) Patentti myönnetty 10 04 1984
Patent meddelat

(51) Kv.Ik.³/Int.Cl.³ A 61 K 39/02, C 12 N 1/20

(21) Patentihakemus — Patentansöknin	783946
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	21.12.78
(23) Alkuperäisyys — Giftighetsdag	21.12.78
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	24.06.79
(44) Nähtävölkäspäivä ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.12.83
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	23.12.77

Sveitsi-Schweiz(CH) 16012/77

(71) Solco Basel AG, Gellertstrasse 18, CH-4052 Basel, Sveitsi-Schweiz(CH)

(72) Ljubinko Stojkovic, Riehen, Sveitsi-Schweiz(CH)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä sekarokotteen valmistamiseksi Trichomonas-syndroomaa vastaan -
Förfarande för framställning av heterovaccin mot Trichomonas-syndrom

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä Trichomonas-syndrooman
terapeuttiseen käsittelyyn käytettävän sekarokotteen valmistamiseksi.

Laji Trichomonas vaginalis kuuluu alkueläimiin ja ihmislääke-
tieteessä käytössä olevan alkueläinten systemaattisen luokittelun
mukaan luokkaan Mastigophora tai siimaeläimet. Se on pääasiallisesti
patogeeninen loinen, jota esiintyy naisten ja miesten virtsa- ja
sukuelimissä. Tartunta tapahtuu pääasiallisesti sukupuoliyhdynnän
kautta, mutta tartuntaa on todettu myös esineiden välityksellä.

Vaikka miehet joutuvat tartunnalle alttiiksi yhtä usein kuin
naiset, ilmenee heillä kliinisiä oireita huomattavasti harvemmin;
suurimmalla osalla Trichomonaksen kantajista ei ole vaivoja tai he
eivät ollenkaan huomaa lievää heikkoa eritystä - virtsaputkentuleh-
duksen oiretta.

Käytännössä Trichomonas-infektio ilmenee naisilla normaalia
avioelämää häiritsevä, merkivä emätintulehduksena. Infektio ei
kuitenkaan yleensä rajoitu emättimeen, vaan leviää useimmiten

Trichomonas-infektioon liittyvänä bakteeri-infektiona ylempiin sukupuolielimiin aiheuttaen kohdun sivuelintulehduksia (Adnexitis), jotka lisäävät munanjohdinraskauden tai munanjohtimien sulkeutuman (hedelmättömyyden) vaaraa. Sekä krooninen infektio että toistuvat tartunnan uusiutumiset aiheuttavat huomattavan kohdunnapukan ja kohdunkaulan tulehduksen; tästä aiheutuu paikallisia kudosuutoksia, joiden vakavuus ulottuu aina palautumiskykyisestä kasvuhäiriöstä kohdunkaulan syövän alkuasteisiin. Näitä kliinisiä oireita nimitetään yhteisnimellä Trichomonas-syndrooma.

Vaikkakin valmiste metronidatsoli [1-(2-hydroksietyyli)-2-metyyli-5-nitroimidatsoli] soveltuu täysin Trichomonas vaginaliksen tuhoamiseen ja on tästä syystä otettu hoitokäyttöön, ei sairastumisten määrä kuitenkaan osoita vähenemistä, vaan sillä on pikemminkin taipumus suurentua; maasta riippuen 3,5-88 % väestöstä on saanut tartunnan, niin että voidaan jo puhua kansansairaudesta.

Infektion leviämistä ja aina uusiutuvaa infektiota edistää suuresti vapaan sukupuolielämän lisääntyminen. Lisäksi infektio on sangen itsepintainen ja yhä lisääntyvä ovulaatiota estävien steroidien jatkuva käyttö näyttää vaikeuttavan hoitoa, sillä munasarjojen alentunut hormonieritys estää tunnetusti epiteelin uudiskasvun emättimessä.

Nyt havaittiin, että useat luonnossa esiintyvistä Lactobacterium acidophilum-kannoista, (nykyään tunnetaan noin 4000 erilaista kantaa), joita kutsutaan myös nimellä Lactobacillus acidophilus, maitohappobakteerit, laktobakteerit, Döderlein-sauvat tai Döderlein-bakteerit, ovat sellaisia, joista voidaan valmistaa Trichomonas-syndrooman hoitoon käytettävää arvokasta sekarokotetta.

Yksittäiset kannat on eristetty v. 1976 sairaalassa tätä syndroomaa potevien naisten emättimestä. Kannat on talletettu 17. lokakuuta 1977 lyofilisoituina Baarnissa (Hollannissa) olevaan laitokseen "Centraalbureau voor Schimmelcultures" varustettuna nimikkeillä CBS 465,77 - CBS 472,77 (kahdeksan yksittäistä kantaa).

Morfologisesti eri kannat eroavat muodostamiensa kasvupesäkkeiden suuruuden suhteen: useat kasvupesäkkeet ovat hyvin pieniä, läpinäkyviä ja ympyränmuotoisia, toiset kasvupesäkkeet ovat suurempia ja ruusukkeemuotoisia, pinnaltaan uurteisia. Mikroskoopin avulla suoritetun tarkastelun perusteella kaikki kahdeksan bakteerikantaa kuuluvat grampositiivisiin monimuotoisiin basilleihin, jotka esiintyvät ketjuina tai palisadeina.

Näiden kantojen biokemiallisia ominaisuuksia voidaan luonnehtia sen mukaan, miten ne kasvavat erilaisilla hiilenlähteillä seuraavasti:

Kannoilla CBS 466 77, 467 77 ja 469 77 ilmenevät samat biokemialliset tai käymisominaisuudet.

Keksinnön mukaisesti valmistettu sekarokote muodostuu siis yllä mainituista *Lactobacterium acidophilum*-kannoista peräisin olevista inaktivoiduista mikro-organismeista fysiologisesti sopivassa liuoksessa.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle *Trichomonas*-syndrooman hoidossa käytettävän rokotteen valmistamiseksi on tunnusomaista, että seuraavista Baarnissa (Hollannissa) olevaan laitokseen "Centralbureau voor Schimmelcultures" nimikkeillä CBS 465,77, CBS 466,77, CBS 467,77, CBS 468,77, CBS 469,77, CBS 470,77, CBS 471,77 ja CBS 472,77 talletetuista *Lactobacterium acidophilum*-kannoista viljellään vähintään kolmea kantaa erikseen sopivassa nestemäisessä ravintoliuoksessa aerobisissa olosuhteissa, muodostunut bakteerimassa erotetaan viljelyn päätyttyä ja inaktivoidaan tunnetuilla menetelmillä, ja eri kantoihin kuuluvia inaktivoituja mikro-organismeja sekoitetaan fysiologisesti hyväksyttävään liuokseen yhtä suuret määrät, tai erillisiä inaktivoituja viljelmiä sekoitetaan tilavuusmäärinä, jotka ovat kulloinkin kääntäen verrannollisia viljelyn lopettamisen tai inaktivoinnin jälkeen määritettyyn viljelmän tiheyteen (mikro-organismien lukumäärään millilitrassa viljelynestettä).

Esimerkiksi käytettäessä kolmea kantaa, A, B ja C, joiden viljelmien mikro-organismitiheydet ovat vastaavasti 1000, 100 ja 10 mikro-organismia/ml, rokote koostuu näistä viljelmistä tilavuussuhteessa A:B:C = 0,01:0,1:1.

Mainitut kannat on valittu siten, että jos menetelmä suoritetaan käyttäen kaikkia kahdeksaa kantaa, saadaan yleisesti tehoava rokote. Tällä tarkoitetaan rokotetta, joka tehoaa käytännöllisesti katsoen jokaisen potilaan *Trichomonas*-syndroomaan, riippumatta siitä, mistä tartunta on peräisin. Siten rokote, joka sisältää inaktivoituja mikro-organismeja kaikista kahdeksasta mainitusta kannasta, on keksinnön parhaana pidetty muoto, ja rokotteen valmistus käyttäen kahdeksaa mainittua kantaa on menetelmän suositeltavin suoritustapa.

Esimerkki

Kantojen viljelyssä voidaan käyttää erilaisia, mikrobiologiasa tavanomaisia nestemäisiä ravintoliuoksia. Erityisen sopivaksi tähän tarkoitukseen on osoittautunut seuraavan koostumuksen omaava ravintoliuos:

tryptoosi-peptonia	5 g
kaseiinihydrolysaattia	8 g
lihauutetta	10 g
hiivadialyysaattia	100 ml
K_2HPO_4	2 g
triammoniumsitraattia	2 g
natriumasetaattia	5 g
suolaseosta	5 ml
sorbitaani-oleaatin polyoksi- etyleenijohdannaisia (Tween 80 ^R)	1 ml
glukoosia	10 g
laktoosia	10 g
tislattua vettä, kunnes saadaan tilavuus	1000 ml

Yllä mainitun suolaseoksen koostumus on seuraava:

$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	11,5 g
$MnSO_4 \cdot 2 H_2O$	2,4 g
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,68 g
tislattua vettä, kunnes saadaan tilavuus	100 ml

Nestemäisen elatusaineen pH säädetään arvoon 6,1-6,8 mieluiten 6,5, ja sitä steriloidaan autoklaavissa 20 minuutin ajan lämpötilassa 115°C.

Elatusaine jaetaan steriileihin astioihin, esim. erlenmeyer-pulloihin, ja kunkin astian liuokseen siirrostetaan näyte, joka on peräisin yhdestä ainoasta kannasta. Kasvatus on tarkoituksenmukaista suorittaa lämpötilassa 32-45°C, mieluummin noin 37°C:ssa, esim. 48 tunnin aikana. Tämän ajanjakson jälkeen tai kun on muodostunut aiottuun rokotteen tuotantoon riittävä määrä biologista materiaalia, tämä materiaali kootaan steriileissä olosuhteissa ja erotetaan elatusaineesta sentrifugoimalla; voidaan esim. sentrifugoida 1 tunti nopeudella 3000 kierrosta/min.

Erotettu biologinen materiaali suspendoidaan, edullisesti fysiologiseen keittosuolaliuokseen, ja inaktivoidaan tämän jälkeen tunnetulla menetelmällä. Inaktivointiin soveltuu erityisen hyvin käsittely formaldehydillä ja fenolilla; edullisiksi ovat osoittautuneet suspension formaldehydipitoisuus 0,3 % ja fenolipitoisuus 0,5 % ja käsittelyaika 3-5 päivää. Inaktivoinnin jälkeen suspensio sentrifugoidaan jälleen, esim. 1 tunti nopeudella 3000 kierrosta/min ylimääräisen inaktivointiaineen poistamiseksi.

Kustakin yksittäisestä kannasta saadusta materiaalista tehdään jälleen suspensio, mieluummin fysiologiseen suolaliuokseen, ja käyttäen seuraavassa kuvattavia menetelmiä tutkitaan materiaalin steriilisyyttä sekä, sisältääkö materiaali vielä elinkykyisiä maitohappobakteereita. Jos tulos on kielteinen, so. materiaali soveltuu rokotteen valmistukseen, määritetään kunkin kannan viljelmän tiheys eli mikro-organismien lukumäärä millilitrassa elatusnestettä.

Mikäli ei jostain syystä ole mahdollista sekoittaa näitä eri biologisia materiaaleja keskenään välittömästi inaktivoinnin jälkeen, on vastaavat suspensiot säilytettävä väliaikana lämpötilassa 4°C . Inaktivoitua kannat voidaan myös lyofilisoida. Lyofilisoituja kantoja voidaan säilyttää 4°C :ssa vähintään kolmen vuoden ajan muuttumattomina. Lyofilisointiin soveltuu suojakolloidiksi erityisen hyvin väliaine, jossa on 5,6 % gelatiinia, 37,5 % sakkaroosia ja 0,5 % kalsiumlaktobionaattia; on tarkoituksenmukaista lyofilisoida 24 tuntia.

Rokote valmistetaan sekoittamalla vähintään kolmesta kannasta saatua inaktivoitua materiaalia siten, että kunkin kannan mikro-organismeja on suurinpiirtein yhtä suuri lukumäärä millilitraa kohti. Saatua rokotetta on edullista laimentaa fysiologisen keittosuolaliuoksen avulla kunnes siinä on millilitraa kohti noin 14×10^9 mikro-organismia.

Rokotteen kokonaistyyppipitoisuus on 3,68 mg-% kuiva-aineen määrästä (määritys Kjeldahlin menetelmällä). On osoittautunut taroituksenmukaiseksi lisätä säilöntäainetta, esimerkiksi formaldehydiä tai fenolia (formaldehydin tai fenolin konsentraatio esim. 0,25 %) tai natriummetyylimerkuri-salisylaattia (Thiomersal) ja antaa rokotteen seistä noin 30 päivän ajan lämpötilassa 4°C , ennen kuin se täytetään ampulleihin. Ampulli sisältää mieluummin 0,5 ml rokotetta. Luonnollisesti myöskin nämä viimeiset toimenpiteet on suoritettava steriileissä olosuhteissa ja käyttäen pyrogeenivapaata lasimateriaalia.

Ampullin sisältö voidaan myös lyofilisoida ja säilyttää käyttöajankohtaan asti kuiva-ampullina, mieluummin noin 4°C :n lämpötilassa. Rokotteen säilyvyys on, niin tavanomaisena kuin lyofilisoitunakin vähintään kolme vuotta valmistuksesta lähtien, jos se säilytetään lämpötilassa $2-8^{\circ}\text{C}$ (normaalissa jääkaappilämpötilassa); säilytettäessä noin 20°C :ssa säilyy rokotetta noin 6 kuukautta. Mainittakoon vielä, että kolme vuotta on pisin Maailman Terveysjärjestön sallima inaktivoitua rokotteen (elottoman rokotteen) käyttöaika.

Valmisteelle tulee suorittaa seuraavat kokeet, ennen sen terapeuttiseen käyttöön ottamista:

1. Steriilisyystutkimus
2. Myrkyllisyystutkimus
3. Antigeenisen tehokkuuden tutkimus
4. Tutkimus vielä elinkykyisten maitohappobakteerien mahdollisen läsnäolon selvittämiseksi (2. steriilisyyskoe).

Tällöin menetellään mieluummin noudattaen Maailman Terveysjärjestön (Biologisia aineita koskevia vaatimuksia, Erfordernisse für biologische Substanzen, Technische Berichte der WGO Nr. 323, 1966) ja Euroopan Farmakopean II, 1971, ohjesääntöjä.

Steriilisyyskoetta varten lisättiin 1 ml inaktivoitua mikro-organismisuspensiota (joko jokaista kantaa erikseen tai kantojen lopullista rokotetta vastaavana seoksena) koeputkiin, joissa oli tioglykolaatti-elatusainetta ja sellaisiin, joissa oli Sabouraud-lihaliientä, minkä jälkeen koeputkia inkuboitiin 10 päivän ajan lämpötilassa 37°C ja vastaavaa sarjaa samoin käsiteltyjä koeputkia inkuboitiin sama aika lämpötilassa 25°C. Osoittautui, että kaikki koeputket olivat kummassakin sarjassa pysyneet steriileinä.

Myrkyllisyyskoe kaikkia 8 kantaa sisältävällä valmisteella suoritettiin marsun ja valkean hiiren avulla. Viidelle marsulle, joiden keskimääräinen kehon paino oli 300 g, annettiin kullekin 5 ml inaktivoitua mikro-organismisuspensiota (so. 10 kertaa enemmän kuin ihmiselle tarkoitettu kerta-annos) lihaksensisäisesti - 2,5 ml kumpaankin takajalkaan - 14 päivän tarkkailuajan jälkeen näiden viiden eläimen terveydentila oli ennallaan eikä myöskään käsitellyissä jaloissa havaittu mitään reaktiota. Toisaalta annettiin kymmenelle valkealle hiirelle, joiden keskimääräinen kehonpaino oli 20 g, kullekin 0,5 ml rokotetta takajalkaan lihaksensisäisesti; 14 päivän tarkkailuajan jälkeen oli näiden kymmenen hiiren terveydentila ennallaan.

Antigeeninen tehokkuustutkimus suoritettiin ensin in vivo marsujen avulla. Kolmelle eläimelle annettiin 14 päivää edellä mainitun myrkyllisyystutkimuksen jälkeen kullekin 1 ml rokotetta intrakardiaalisesti; huolimatta suhteellisen korkeasta annoksesta ei havaittu minkäänlaista anafylaktista reaktiota. Sitten rokotetta keuhkoihin myös in vitro, käyttäen Ouchterlony'n immunodiffuusiomenetelmää, normaalista ihmisen seerumista saatuja näytteitä vastaan; ei havaittu positiivista reaktiota.

Kokeessa, jossa pyrittiin toteamaan vielä elinkykyisten maitohappobakteerien läsnäolo, siirrostettiin rokotenäytteitä näiden

mikro-organismien eristämiseen ja identifiointiin soveltuvalle kiinteälle kasvualustalle. Tähän tarkoitukseen soveltuu seuraavan koostumuksen omaava elatusaine:

vettä	800 ml
tripkaseiinia ^{x)}	16 g
liuosta 1	50 ml
liuosta 2	10 ml
liuosta 3	10 ml
liuosta 4	10 ml
tuoretta hiivaa	100 g
Witte-peptonia ^{xx)}	10 g
liukenevaa tärkkelystä, 0,5 % (liuotettuna)	5 g
vettä, ad	1000 ml

^{x)} kaseiinihydrolysaatti (valm. Institute of Immunology and Virology Torlak, Belgrad, Jugoslavia)

^{xx)} proteiinihydrolysaatti (valm. Difco Laboratories, Detroit, Mich. USA).

Yllä mainittujen liuosten, jotka ovat kaikki vesiliuoksia, koostumus on seuraavanlainen:

liuos 1:	10 % NaCl-liuos
liuos 2:	2 % KCl- ja 5 % Na ₂ CO ₃ -liuos
liuos 3:	2 % CaCl ₂ - ja 1 % MgCl ₂ -liuos
liuos 4:	2,5 % K ₂ HPO ₄ -liuos

Saatuun lopulliseen liuokseen lisätään 25 g agar-agar, pH säädetään arvoon 5,5-6,7, mieluummin noin arvoon 6,0, ja elatusainetta steriloidaan 20 minuutin ajan autoklaavissa lämpötilassa 115°C. Tämän jälkeen lisätään liuos, jossa on 3 g maltoosia, 10 g glukoosia ja 10 g laktoosia 100 ml:ssa vettä, ja sen jälkeen 30 ml 1 % kysteiinihydrokloridiliuosta; jokainen näistä liuoksista steriloidaan etukäteen steriilisuodattamalla. Lopuksi tähän elatusaineeseen lisätään vielä 10 % ihmisen verta, josta on poistettu fibriini. Näin saadulle veriagarkasvatusalustalle siirrostetaan rokotinäytteitä ja inkuboidaan lämpötilassa 37°C. Vertailun vuoksi siirrostetaan ja kasvatetaan *Lactobacterium acidophilum*-näytteitä samoissa olosuhteissa.

Tutkitussa rokotteessa ei osoittautunut olevan eläviä mikroorganismeja, mikä todistaa täydellisen inaktivoitumisen tapahtuneen formaldehydin ja fenolin vaikutuksesta. Keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettu rokote on siis niin kutsuttu inaktivoitu rokote.

Koska sen vaikutus toisaalta kohdistuu sellaiseen infektiin ja tämän seurausilmiöihin, jotka on saanut aikaan toista lajia oleva mikro-organismi - *Trichomonas vaginalis* -, se kuuluu sekarokotteisiin.

Rokote saa aikaan mm. spesifisten vasta-aineiden muodostuksen *Lactobacterium acidophilum*ia vastaan, erityisesti sen epänormaaleja ja monimuotoisia muotoja vastaan, jotka osaltaan aiheuttavat *Trichomonas*-syndroomaan kuuluvan sairaalloisen emättimen pH-arvon muutoksen. Tämä immunoiva vaikutus voidaan osoittaa sekä eläinkokeilla että myös kliinisillä kokeilla seuraavasti.

Eläinkokeissa käytettiin kahta kaniinia, joiden kehon painot olivat 2950 ja 3200 g, ja näille annettiin laskimonsisäisesti kaksi kertaa, kahden viikon väliajalla, kulloinkin 0,5 ml rokotetta, joka oli valmistettu sekoittamalla kaikkia kahdeksaa inaktivoitua mikro-organismikantaa. Yhden kuukauden kuluttua toisesta käsittelystä eläimiltä otettiin verta ja siitä erotettiin seerumi. Jos vasta-aineita on muodostunut, on seerumin aiheutettava vähintään laimennoksena 1:50 spesifisesti niiden kantojen maitohappobakteerien agglutinoituminen, joista rokote on valmistettu; seerumilla on tällöin tutkittuna laimennoksena positiivinen tiitteri agglutiniinien suhteen. Ensimmäisellä ja toisella kaniinilla oli agglutiniinititteri ennen rokotusta negatiivinen seerumilaimennoksen ollessa kulloinkin 1:10; yhden kuukauden kuluttua toisesta käsittelystä oli tiitteri positiivinen laimennoksen ollessa 1:160 tai 1:80.

Lisäksi määritettiin rokotteiden immuuniutta aikaansaava vaikutus kahdella eri 10 uroskaniinia (paino 2500-2950 g) käsitteväällä ryhmällä (a) kaikista 8 kannasta valmistetulla ja (b) 4 kannasta (CBS 465 77, 467 77, 470 77 ja 472 77) valmistetulla rokotteella. Molemmat rokotteet sisälsivät 14×10^9 inaktivoitua *Lactobacterium acidophilum* bakteeria/ml. Jokaiselle kaniinille annettiin kaikkiaan 5 kertaa joka toinen päivä 0,2 ml rokotetta (a) tai (b). Ennen rokottamista ja 5 vrk rokottamisen päätyttyä otettiin verinäytteitä, niistä erotettiin veriseerumit, joista tehtiin fysiologisen keittosuolaliuoksen kanssa laimennussarja (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 ja 1:640). Antigeeninä käytettiin mainitun 8 *Lactobacterium acidophilum*-kannan suspensiota, jota lisättiin kuhunkin 0,5 ml:n seeruminäytteeseen 0,5 ml, minkä

jälkeen heti suoritettiin agglutinaatiokoe; näin määritettiin tiitteri ennen rokotusta ja sen jälkeen. Saatiin seuraavat tiitterin geometriset keskiarvot: rokotteella (a) rokotetulla ryhmällä ennen rokotusta 1:13,19 ja rokotuksen jälkeen 1:211,12 ja rokotteella (b) rokotetulla ryhmällä ennen rokotusta 1:12,31 ja rokotuksen jälkeen 1:196,98.

Näistä vartailukokeista ilmenee, että 4:stä *Lactobacterium acidophilum*-kannasta valmistetullarokotteella on sama immuuniutta aiheuttava vaikutus kuin 8:sta kannasta valmistetulla rokotteella.

Uuden rokotteen avulla on mahdollista parantaa ja ehkäistä *Trichomonas*-syndrooma ja äkillinen, krooninen ja oireeton trikomonaasi. Olipa kysymys parantamisesta tai ennalta ehkäisystä, suositellaan seuraavaa annostusta: yhden 0,5 ml:n suuruisen annoksen (so. noin 7×10^9 mikro-organismia) antamista ruiskeena lihaksensisäisesti kolme kertaa kahden viikon väliajoin, ja tämän jälkeen saman suuruisen (0,5 ml) tehosteruiskeen antamista vuoden kuluttua hoidon alkamisesta.

On tehty kliinisiä tutkimuksia noudattaen esitettyä annostusta ja tällöin tehty serologisia tutkimuksia 97 naispotilaasta. Potilailta otettiin tietyin aikaväleihin verta, josta tutkittiin veriseerumissa olevat maitohappobakteeri-vasta-aineet. Tätä tarkoitusta varten seerumia käsiteltiin geometrisesti suurenevana laimennussarjana (1:10-1:1280) rokotetta vastaavalla antigeenillä tai agglutinogeenillä ja tarkkailtiin mahdollisesti tapahtuvaa agglutinoitumista. Agglutinogeeninä käytettiin vasta valmistettua, so. vähemmän kuin kolme kuukautta vanhaa, suspensiota, jossa oli inaktivoituja *Lactobacterium acidophilum*-mikro-organismeja samoista kannoista, samassa määräsuhteessa ja samana konsentraationa (14×10^9 mikro-organismia millilitraa kohti) kuin itse rokottees-
sa; inaktivointiin käytetyn fenolin konsentraatio oli 0,25 %. Agglutiniinien muodostuminen seerumissa rokotuksen seurauksena ilmenee selvästi seuraavassa taulukossa esitetyistä tiitteriarvoista.

Taulukko 2

Agglutiniinitiitterien jakaantuminen ennen rokotusta ja sen jälkeen

Tiitteri	Ennen rokotusta	2 viikkoa 3 kuukautta 6 kuukautta 3.rokotuksen jälkeen			12 kuukautta rokottamisen aloittamisen jälkeen
<1:10	16	1	1	1	1
1:10	0	0	0	0	1
1:20	8	2	3	3	3
1:40	13	0	1	3	8
1:80	29	3	5	6	17
1:160	18	13	11	16	16
1:320	13	49	48	40	15
1:640	0	25	24	20	3
1:1280	0	4	3	3	0
Summa ^x	97	97	96	92	64
Tiitterin geometrisen keskiarvo	1:56,4	1:356	1:293	1:257	1:120

^xSumman pieneneminen 3:n, 6:n ja 12:n kuukauden jälkeen johtuu potilaista, jotka eivät enää tulleet tarkastukseen.

Yllä olevasta tiitterin geometrisesta keskiarvosta voidaan laskea esim., että 2 viikkoa rokotuksen päättymisen jälkeen tiitteri kohoaa kertoimella (keskimäärin) 6,3. Vuoden kuluttua rokotuksen alkamisesta, so. tehosterokotuksen ajankohtana, on agglutiniinitiitteri vielä 2,1 kertaa korkeampi kuin alkuperäinen, mikä osittain selittää rokotuksen pitkäaikaisen vaikutuksen.

Jos kiinnitetään huomio tiitterin kohoamiseen rokotusta välittömästi seuraavana ajanjaksona, so. ensimmäisen ja toisen näytteenoton välisenä aikana, havaitaan sen jakautuvan potilailla seuraavasti:

Taulukko 3

Agglutiniinitititterin kohoaminen

Kohoamis- kerroin	2x	4x	8x	16x	32x	64x ja enemmän
Potilaiden lukumäärä	13	13	21	10	6	7
Potilaiden osuus kokonais- määrästä	13,4 %	13,4 %	21,6 %	10,3 %	6,2 %	7,2 %

Seuraava yhteenveto kuvaa käsittelyn vaikutusta. 200 naista, joiden ikä oli 15-59 vuotta, ja jotka kärsivät Trichomonas-syndroomasta, rokotettiin keksinnön mukaisesti mainitusta kahdeksasta kannasta valmistetulla rokotteella; tarkistuksia tehtiin joillakin potilailla jopa yli 2 vuoden ajan (2 potilasta ei enää ilmestynyt tarkastuksiin). 138 potilasta, so. 69 % kokonaismäärästä, oli aikaisemmin useita kertoja hoidettu oraalisilla tai intravaginaalisilla valmisteilla, varsinkin metronidatsolilla, mutta infektion uusiutumisesta päätellen ilman pitempiaikaista vaikutusta. Ennen hoidon aloittamista suoritettiin veren ja virtsan tutkimisen ohella gynekologinen tutkimus, mukaan luettuna emättimen tähystys ja Papa-kokeen; näiden lisäksi otettiin sivelynäytteet hävystä, emättimestä, kohdunkaulasta ja virtsaputkesta ja niistä valmistettiin värjäämätön natiivipreparaatti, sekä myös gram- ja giemsa-värjätyt (ks. Dorlands Illustrated Medical Dictionary, 25. painos, s. 1464, julk. W.B. Saunders Co., USA) preparaatit sekä viljelmä Trichomonas vaginaliksen osoittamiseksi. Kaikki nämä tutkimukset toistettiin 6 viikon, 4 kuukauden ja 12 kuukauden kuluttua käsittelyn aloittamisesta.

Ennen hoidon aloittamista voitiin 145:lla 200 potilaasta (72,5 %:lla) todeta selvät Trichomonas-syndrooman tuntomerkit, nimittäin emätintulehdus, kutina, runsas vihreänkellertävä, pahalta haiseva vuoto, sukupuolinautinnon häiriö, virtsaamisvaivat, jne.; emättimen tähystyksessä ilmeni emätin- ja kohdunnapukkaepiteelin turvotusta ja punoitusta. Lisäksi havaittiin 61 potilaalla kohdunnapukan limakalvon punatäpläisyyttä, 13 muulla krooninen kohdunkaulan tulehdus. Lopuilla 55 potilaalla (27,5 %:lla) vaihtelivat oireet tuskin havaittavasta lievästä emätintulehdukseen.

Hoidossa noudatettiin yllä esitettyä lääkitystä. Tapauksissa,

joissa oli kysymyksessä lievä emätintulehdus, ei käytetty muuta hoitoa; akuuttien oireiden lievittämiseksi käytettiin paikallisesti antibiootteja ja vaikeissa tapauksissa lisäksi paikallisesti valmista, joka sisälsi *Lactobacterium acidophilum*in sammalsienitautia vastaan vaikuttavien kantojen mikro-organismeja. Metronidatsolia tai vastaavia nitroimidatsolijohdannaisia ei kuitenkaan annettu yhdessäkään tapauksessa.

Jos emätinerite luokitellaan Jivorecin mukaan

[W. Ritzerfeld, Der Gynäkologe 2 (1), sivut 2-6 (1969)] seuraaviin luokkiin, voidaan hoidon vaikutus lukea selvästi taulukosta 4:

Luokka I: terveen naisen kuva

Luokka II: bakteerien aiheuttama ei märkäinen vuoto

Luokka III: bakteerien aiheuttama märkäinen vuoto

(Luokka IV: tippuri - yhtään tapausta ei esiintynyt tutkittujen joukossa)

Luokka V: siimaeliötauti (*Trichomoniasis*) (positiivinen (natiivipreparaatti))

Luokka VI: sienitauti emättimessä (*Candida albicans*)

Taulukko 4

Tutkimuksen ajankohta	Lukumäärä	Luokka II	Luokka III	Luokka V	Luokka VI
Ennen rokottamisen aloittamista	200	-	-	194 97 %	6 3 %
2 viikkoa 3. rokotuksen jälkeen	200	139 69,5 %	47 23,5 %	14 7 %	-
3 kuukautta 3. rokotuksen jälkeen	198	164 82 %	27 13,5 %	9 4,5 %	-
12 kuukautta rokotuksen aloittamisen jälkeen	198	157 79,3 %	32 16,2 %	9 4,5 %	-

Niihin 8 potilaaseen, joissa toisessa tarkastuksessa, kolmen kuukauden kuluttua rokottamisen lopettamisesta, voitiin vielä mikroskoopin avulla osoittaa olevan *Trichomonas vaginalis*ta, ei hoito edelleenkään vaikuttanut; hoito suun kautta annettavalla *Trichomonas*-lääkkeellä ei myöskään muuttanut tilannetta. Lisäksi oli kohdunkaulassa vielä 12 kuukauden kuluttua jäljellä muutoksia, jotka ilmenivät kroonisena kohdunkaulan tulehduksena tai huomattavana limakalvon

punatäpläisyytenä. Nämä huonot tulokset johtuvat luultavasti siitä, ettei näillä naisilla rokotuksesta huolimatta muodostunut riittävästi vasta-aineita.

198 hoidetusta potilaasta oli 12 kuukauden kuluttua 189:llä (95,5 %:lla) luokkaan II ja III kuuluva emätinerite, so. he olivat parantuneet siimaeliötaudistaan. 55 potilasta, joilla oli lievä emätintulehdus, saavutti tämän parantumisasteen ilman mitään lisähoitoa. Potilaiden tarkkailua jatkettiin osittain 2 vuoden ajan; tänä aikana ei esiintynyt taudin uusintoja eikä uudelleen tartuntoja; mikä on tällä lääketieteen alueella uutta ja osoittanee pysyvää trikomonaksen vastaista tulosta. Lopuksi näyttää, että rokotteella on myös positiivinen vaikutus kohdunkaulan muutoksiin ja kohdunnapukan vaurioihin. Kokonaistulos näyttää vielä merkittävämmältä, kun otetaan huomioon, että suurinta osaa tapauksista oli jo hoidettu paikallisesti ja systeemisesti erilaisilla kemiallisilla yhdisteillä, joiden vaikutus ei kuitenkaan ollut pysyvä.

Lukuunottamatta satunnaista punerrusta tai lievää turvotusta infektiokohdassa ei yhdelläkään potilaista esiintynyt hoidon aikana eikä välittömästi sen jälkeen ei-toivottuja sivuvaikutuksia. Ei todettu myöskään allergisia eikä myrkytykseen viittavia vastavaikutuksia.

Partnerin samanaikainen hoitaminen on rokotteella hoidettavien naisten kohdalla tosin toivottavaa, mutta potilaan kannalta katsottuna se ei ole välttämätöntä, koska rokotus tekee hänet immuuniksi.

Etuna keksinnön mukaisesti valmistetulla rokotteella on lisäksi se, että potilaan tultua immuuniksi ei tartunnan uusiutumisen vuoksi hänen partneriaan tarvitse välttämättä hoitaa.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä *Trichomonas*-syndrooman terapeuttiseen käsitte-
lyyn käytettävän sekarokotteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä,
että seuraavista Baarnissa (Hollannissa) olevaan laitokseen "Central-
bureau voor Schimmelcultures" nimikkeillä CBS 465,77, CBS 466,77,
CBS 467,77, CBS 468,77, CBS 469,77, CBS 470,77, CBS 471,77 ja CBS
472,77 talletetuista *Lactobacterium acidophilum*-kannoista viljellään
vähintään kolmea kantaa erikseen sopivassa nestemäisessä ravinto-
liuoksessa aerobisissa olosuhteissa, viljelyn päätyttyä muodostunut
bakteerimassa erotetaan ja inaktivoidaan tunnetuilla menetelmillä,
ja eri kantoihin kuuluvia inaktivoituja mikro-organismeja sekoitetaan
fysiologisesti hyväksyttävään liuokseen yhtä suuret määrät, tai eril-
lisiä inaktivoituja viljelmiä sekoitetaan tilavuusmäärinä, jotka ovat
kulloinkin kääntäen verrannollisia viljelyn lopettamisen tai inakti-
voinnin jälkeen määritettyyn viljelmän tiheyteen (mikro-organismien
lukumäärään millilitrassa viljelynestettä).

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
siitä, että käytetään kaikkia kahdeksaa mainittua kantaa.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että viljely suoritetaan pH:ssa noin 6,5 ja lämpö-
tilassa noin 37°C.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että muodostuneen bakteerimassan inaktivointi suo-
ritetaan käsittelemällä sitä formaldehydillä ja fenolilla, mielui-
min liuoksessa, jonka formaldehydipitoisuus on 0,3 % ja fenolipitoi-
suus 0,5 %.

5. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että inaktivoituja mikro-organismeja lisätään fy-
siologisesti hyväksyttävään liuokseen sellainen määrä, tai saatua
rokotetta laimennetaan fysiologisesti hyväksyttävällä liuoksella
siten, että mikro-organismeja on millilitrassa noin 14×10^9 .

6. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että saatuun rokotteeseen lisätään säilöntäainetta,
esimerkiksi formaldehydiä, fenolia tai natriumetyyli-merkuri-
silylaattia.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av heterovaccin för terapeutisk behandling av Trichomonas-syndrom, k ä n n e t e c k n a t därav, att man odlar skilt minst tre stammar av följande i Baarn (Holland) i anstalten "Centralbureau voor Schimmelcultures" under beteckningarna CBS 465 77, CBS 466 77, CBS 467 77, CBS 468 77, CBS 469 77, CBS 470 77, CBS 471 77 och CBS 472 77 deponerade stammar av Lactobacterium acidophilum i ett lämpligt flytande näringsmedium under aerobiska förhållanden, avskiljer efter odlingen den formade bakteriemassan och inaktiverar den på i och för sig kända sätt, och blandar lika stora mängder inaktiverade till olika stam tillhörande mikroorganismer med en fysiologiskt godtagbar lösning eller blandar skilda inaktiverade odlingar i volymmängder, som i varje fall är omvänt proportionella till tätheten (antalet mikroorganismer per milliliter odlingsvätska) bestämd efter slutet av odlingen eller av inaktiveringen.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man använder alla nämnda åtta stammar.

3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att man utför odlingen vid en pH av circa 6,5 och en temperatur av circa 37°C.

4. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att man utför inaktiveringen av den formade bakteriemassan med formaldehyd och fenol, företrädesvis i en lösning med en formaldehydkoncentration av 0,3 % och en fenolkoncentration av 0,5 %.

5. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att man sätter inaktiverade mikroorganismer till en fysiologiskt godtagbar lösning i en sådan mängd eller att man utspäder den erhållna vaccinen med en sådan mängd av en fysiologiskt godtagbar lösning, att man får cirka 14×10^9 mikroorganismer per milliliter.

6. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att man sätter till den erhållna vaccinen konserveringsmedel, exempelvis formaldehyd, fenol eller natriummetylmerkuri-salicylat.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer