



ŮŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

252746

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴
A 61 K 39/23

(22) Prihlášené 31 07 85
(21) (PV 1842-86.D)

(40) Zverejnené 12 03 87

(45) Vydané 15 10 88

[75]

Autor vynálezu

ŽUFFA TOMÁŠ MVDr., SALAJ JURAJ MVDr., ZAJAC JÁN MVDr., NITRA

[54] Živá atenuovaná vakcína proti panleukopénii mačiek a spôsob jej prípravy

1

2

Riešenie sa týka živej atenuovanej vakcíny proti panleukopénii mačiek a spôsobu jej prípravy na bukových kultúrach. Vakcína je určená na ochranné a núdzové očkovanie mačiek proti uvedenému ochoreniu.

Živá atenuovaná vakcína proti panleukopénii mačiek je lyofilizovaná a vyznačuje sa tým, že obsahuje v 1 ml najmenej 10^3 TKID₅₀ častíc parvovírusu mačiek, kmeňa FPVA-BN 110/83 CAPM V-291 adaptovaného na bunkové kultúry. Atenuovaný vírusový kmeň panleukopénie mačiek sa pomnožuje na stabilnej mačacej línii buniek FE v minimálnom esenciálnom médiu podľa Eaglea obohatenom o bovinné sérum pri teplote 37 °C, počas 4 až 8 dní. Po vytvorení výrazných cytopatických zmien sa kultivácia ukončí a vírusový materiál sa zmieša s lyofilizačným médiom tak, aby obsahoval minimálne 10^4 TKID₅₀ . ml⁻¹ častíc vírusu.

Po lyofilizácii je obsah vakcinačného vírusu v 1 ml najmenej 10^5 TKID₅₀.

Vynález sa týka živej atenuovanej vakcíny proti panleukopénii mačiek a spôsobu jej prípravy.

Panleukopénia mačiek predstavuje hroznadné ochorenie zažívacích ústrojov, ktoré sa klinicky prejavuje nechutenstvom, malátnosťou, zvracaním a hnačkou, ktorá môže byť krvavá. Zvieratá majú horúčku a pri hematologickom vyšetrení sa zisťuje znížený počet leukocytov.

Ochorenie spôsobuje významné straty v stavoch mačiek, pričom úhyn predstavuje 20 až 50 % z celkového počtu zvierat. Ochorenie postihuje všetky vekové kategórie zvierat, ale najmä mláďatá, pričom nástup je prudký a priebeh veľmi rýchly (JOHNSON, R. H.: Feline panleucopenia. Vet. Rec., March 29th, 1969, : 338 — 340).

Pôvodcom ochorenia je vírus z čeľade Parvoviridae, ktorého častice sú izomerické, neobalené a obsahujú dezoxyríbonukleovú kyselinu. Vírus sa replikuje v bunkovom jadre, a to iba v určitých fázach bunkového cyklu, preto je jeho pestovanie in vitro pomerne obtiažne (O'REILLY, K. J. — WHITAKER, A. M.: The development of feline cell lines for the growth of feline infectious enteritis /panleucopaenia/ virus. J. Hyg. Camb., 67, 1969, :115; FLAGSTAD, A.: Studies on the growth of feline panleucopaenia virus in cell cultures. Acta. Path. microbiol. scand. Sect., B, 1975, 83: 71 — 78; O'SHEA, J. D. — STUDDERT, M. J.: Growth of an autonomously replicating parvovirus /Feline Panleukopenia/: Kinetics and morphogenesis. Arch. Virol., 57, 1978, :107 — 122; ENDO, M. SHINAGAWA, M. — GOTO, H. — ET AL.: Growth characteristics of feline panleukopenia virus in synchronized kitten kidney cells. Jpn. J. Vet. Sci., 43, 1981, : 65 — 70).

Špecifická profylaxia je založená na pasívnej imunizácii podaním hyperimúnného séra alebo imúnnych sérových globulínov, ale najčastejšie sa využíva aktívna imunizácia. Spočiatku sa používali očkovacie látky, inaktivované a skôr živé pripravené z vírusu panleukopénie mačiek (ERHARDT, W.: Über die Anwendung von Passiv- und Aktiv-Impfstoffen gegen die Panleukopenie der Katzen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 90, 1977, : 337 — 340; CHAPPUIS, G. — PETERMANN, H. G.: Zur Prophylaxe von Viruskrankeiten der Katze. Prakt. Tierarzt. 2, 1979, : 112 — 115; POVEY, R. CH. — KOONSE, H. — HAYS, M. B.: Immunogenicity and safety of an inactivated vaccine for the prevention of rhinotracheitis, caliciviral disease, and panleukopenia in cats. JAVMA, 177, 1981 4: 347 — 350).

Nevýhodou inaktivovaných vakcín je, že ich účinnosť je významne ovplyvňovaná najmä prítomnosťou materských protilátok a obsahom účinného antigénu. Imunita trvá len krátku dobu — niekoľko mesiacov, pričom chráni len proti subklinickej infekcii, ale z hľadiska tlmenia nákazy je významná

skutočnosť, že takéto očkovanie nezabráni intenzívnemu vylučovaniu virulentného vírusu do prostredia. V poslednom období získali prevahu živé vakcíny, ktoré obsahujú vírus oslabený sériovým pasážovaním na bunkových kultúrach. Po ich aplikácii dosahujú hladiny špecifických protilátok úroveň, ako po prirodzenej infekcii virulentným kmeňom. Protilátky sa zisťujú už na 3. deň po inokulácii a perzistujú najmenej 2 roky. Potomstvo od imúnnych matiek je chránené proti infekcii materskými protilátkami, z ktorých 10 % získava transplacentárne a 90 % kolostrom. Na druhej strane tieto protilátky napriaznivo ovplyvňujú imunitnú odpoveď na podanie živých alebo inaktivovaných vakcín (SCOTT, F. W. — CSIZA, C. K. — GILLESPIE, J. H.: Maternally derived immunity to feline panleukopenia. JAVMA, 156, 1970, 4: 439 — 453). Z experimentálnych aj praktických skúseností vyplýva, že podmienkou pre dosiahnutie dlhodobej chránenosti je očkovanie mláďat až vo veku okolo 16 až 18 týždňov.

Spôsob kultivácie parvovírusu v bunkových kultúrach za účelom pomnoženia vírusového materiálu na prípravu pokusných vakcín popísali viacerí autori (GORMAN, J. R. — HARTSOUGH, G. R. — BURGER, D. — ET AL.: The preliminary use of attenuated feline panleukopenia virus to protect cats against panleukopenia and mink against virus enteritis. Cornell Vet., 55, 1965, : 559 — 566; MOCHIZUKI, M. — KONISHI, S. — OGATA, M.: Studies on feline panleukopenia. II. Antigenicities of the virus. Jpn. J. vet. Sci., 40, 1978, 4: 375 — 383; BERGMAN, R. — SUNDQUIST, B. — STRÖMAN, L. Production of a feline parvovirus vaccine using monolayer cell systems in roller flasks and microcarriers. Develop. biol. Standard., 55, 1984, : 77 — 78). Použili najmä primárne kultúry mačacích a psích embryonálnych buniek alebo z nich pripravené stabilné bunkové línie. Infekciu buniek robili obvykle za 4 až 6 hodín po nasadení do kultivačných nádob. Nakoľko množenie vírusu nebolo doprevádzané pravidelným vývojom cytopatických zmien, kontrolovali obsah vírusu v tkanivových tekutinách na základe prítomnosti intranukleárných teliesok, imunofluorescentnou metódou prípadne výšky hemaglutinačného titru. Pri infekcii buniek sa často používal oplach fyziologickým roztokom a výmena kultivačného média. Veľkovýrobná technológia výroby vakcín vyžaduje však minimálne množstvo operácií a podľa možnosti priamu, pohotovú a presvedčivú mikroskopickú kontrolu množenia vírusu na základe špecifických cytopatických zmien.

Táto úloha bola vyriešená nasledovne:

Bola pripravená živá lyofilizovaná vakcína proti panleukopénii mačiek, lyofilizovaná, ktorá obsahuje v 1 ml najmenej 10^3

TKID₅₀ častíc vírusu panleukopénie mačiek, kmeň FPVA-BN 110/83 CAPM V-291.

Uvedený vírusový kmeň bol adaptovaný na kultúry buniek stabilnej mačacej línie FE. Ako rastové médium bolo použité minimálne esenciálne médium podľa Eaglea obohatené o bovínne sérum, v ktorom sa vírus pomnožoval pri teplote 36 až 38 °C po dobu 4 až 8 dní. Po vytvorení zreteľných cytopatických zmien sa vírusový materiál zmiešal s lyofilizačným médiom tak, aby obsahoval minimálne 10⁴ TKID₅₀ častíc vírusu enteritídy mačiek v 1 ml.

Vírusový kmeň panleukopénie mačiek s označením FPVA-BN 110/83 a zbierkovým číslom CAPM V-291 uložený v Československej zbierke mikroorganizmov na Výskumnom ústave veterinárneho lekárstva v Brne, Hudcova 60, sme získali z pôvodne virulentného vírusu izolovaného z infekčných materiálov cestou sériových pasáží na mačacej bunkovej línii označenej FE. Homogenita vírusovej populácie a stabilita imunobiologických vlastností atenuovaného kmeňa sa dosiahla izolovaním línie metódou hraničných riedení so šesťnásobným opakovaním.

Uvedený kmeň FPVA-BN 110/83 CAPM V-291 je charakterizovaný týmito imunobiologickými vlastnosťami:

1. Pri dodržaní definovaných kultivačných podmienok je množenie vírusu na stabilnej bunkovej línii FE doprevádzané vývojom výrazných cytopatických zmien s obsahom 10⁵ až 10⁶ TKID₅₀ . ml⁻¹.

2. Vakcinačný vírus je neškodný pre všetky vekové kategórie zvierat, pričom mláďatá bez materinských protilátok môžu byť úspešne imunizované počnúc vekom 6 týždňov.

3. Vakcinačný vírus sa nevylučuje z organizmu očkovaných zvierat a neprenáša sa na spoluustajnené vnímavé zvieratá.

4. Očkovanie vnímavých zvierat vyvolá chránenosť počnúc 4. dňom po podaní vakcíny.

5. Imunita vyvolaná jednorázovým očkovaním zvierat starších ako 12 týždňov trvá najmenej jeden rok, a je doprevádzaná prítomnosťou špecifických protilátok.

Stabilná bunková línia FE, vykazovala pri jej získaní nedostatočné rastové vlastnosti, charakterizované pomalým množením buniek a neschopnosťou vytvoriť súvislý monolayer. Uvedené vlastnosti bunkovej línie nezodpovedali nárokom na intenzívne množenie uvedeného vírusu so získaním vírusových suspenzií s dostatočnými titrami potrebnými pre výrobu vakcíny. Prejavom nedostatočných rastových vlastností bunkovej línie bolo aj chýbanie vývoja cytopatických zmien po infekcii vakcinačným kmeňom, čo nedovoľovalo sledovať a hodnotiť stupeň pomnoženia vírusu. Sériovým pasážovaním bunkovej línie FE vo vybraných médiách (MEM, BEM,

M199) s obsahom novorodeneckého séra sme po 25 pasážach v médiu MEN derivovali populáciu buniek, ktorá vykazuje nasledovné vlastnosti:

1. Líniu je možné pasážovať v pomere 1 : 3 až 1 : 4 v 72 až 96 hodinových intervaloch pomocou roztoku verzén-trypsín.

2. Najvhodnejšie rastové médium je minimálne esenciálne médium podľa Eaglea s prídavkom 5 až 15 hmot. percent bovinného séra.

3. Bunkovú líniu je možné uchovávať v zmrazenom stave pri teplotách pod -100 °C, s použitím protekčného média, ktoré obsahuje 10 až 20 hmotnostných percent dime-tylsulfoxidu.

4. Množenie vakcinačného vírusu je pravidelne sprevádzané výraznými cytopatickými zmenami na 4. až 8. deň po infekcii v závislosti od dávky vírusu.

Dosiahnuté titry vírusu dovoľujú realizovať efektívnu výrobu očkovacej látky proti panleukopénii mačiek.

Výber kultivačného séra:

Kultivačné sérum s dobrými rastovými vlastnosťami pre uvedenú bunkovú líniu môže obsahovať nešpecifické inhibítory najviac v titry 1 : 32, stanovenom hemaglutinačno-inhibičným testom.

Postup výroby vakcíny:

Spôsob infekcie buniek FE vakcinačným vírusom:

A.

Suspenzia buniek línie FE o hustote 5 až 10 . 10⁶ buniek . ml⁻¹ v rastovom médiu sa zmieša s vakcinačným vírusom pri multiplícite infekcie od 0,0001 do 0,001. Zmes vírusu a buniek sa inkubuje pri 36 až 38 °C počas 30 až 60 minút. Potom sa zmes vírusu a buniek nariedi v rastovom médiu, ktoré predstavuje minimálne esenciálne médium podľa Eaglea s pH 6,8 až 7,3 a prídavkom piatich až desiatich hmotnostných percent bovinného séra s vyznačenou kvalitou.

B.

Do bunkovej suspenzie v rastovom médiu sa pridá inokulum vakcinačného vírusu o multiplícite infekcie 0,0001 až 0,001, ktorá sa ihneď vyleje do kultivačnej nádoby. Takto pripravená suspenzia buniek za účelom prípravy sa kultivuje na skle, plastickej hmote, štacionárnym spôsobom, alebo v otáčaných fľašiach („rolleroch“), prípadne na mikronosičoch, pri 36 až 38 °C počas 4 až 8 dní. Množenie vírusu je sprevádzané výraznými cytopatickými zmenami.

C.

Infekcia prichytených buniek na kultivačnom povrchu — po štvor- až šesťhodinovej inkubácii buniek línie FE pri 36 až 38 °C. Do rastového média sa pridá inokulum vakcínačného vírusu pri multiplicitate infekcie 0,0001 až 0,001. Inkubácia pokračuje pri 36 až 38 °C počas 4 až 8 dní. Množenie vírusu je rovnako ako v bode A a B sprevádzané výraznými cytopatickými zmenami.

Zmes infekčných tekutín sa získava vtedy, keď 80 až 90 percent monolayeru vykazuje špecifické zmeny. Takto pripravená vírusová suspenzia sa kontroluje na prítomnosť nežiadúcich kontaminujúcich mikroorganizmov a stanoví sa obsah vírusu titráciou na bunkách línie FE. Po ukončení kultivácie sa vírusový materiál zmieša s lyofilizačným médiom v pomere 50 až 75 hmotnostných percent vírusu k 50 až 25 hmotnostným percentám lyofilizačného média a uchováva pri -15 až -20 °C až do lyofilizácie. Lyofilizačné médium je možné pri zachovaní rovnakých hmotnostných pomerov pridávať až tesne pred lyofilizáciou. Na prípravu lyofilizovanej vakcíny sa použijú infekčné tekutiny s obsahom minimálne 10^4 TKID₅₀. ml⁻¹ vírusu, bakteriologicky sterilné. Homogenizovaná vírusová suspenzia s lyofilizačným médiom, ktoré obsahuje sacharózu, fosforečnanový pufor, glutamát sodný alebo draselný, boviný albumín alebo iný zdroj bielkovín, dextran alebo želatínu (BOVARNICK, M. R. — MILLER, J. C. — SYNDER, J. C.: The influence of certain salts, aminoacids, sugars, and proteins on the stability of rickettsiae. J. Bacteriol., 59, 1950.: 509 — 522) sa rozplňuje do ampuliek, alebo liekoviek, lyofilizuje, vzduchotesne uzatvára a uchováva pri chladničkej teplote. Vakcína pripravená podľa uvedeného postupu obsahuje najmenej 10^3 TKID₅₀. ml⁻¹ vakcínačného vírusu, čo predstavuje jednu imunizačnú dávku.

Použitie lyofilné médium podľa BOVARNICK, M. R. — MILLER, J. C. — SNYDER, J. C.: The influence of certain salts, aminoacids, and proteins on the stability of rickettsiae. J. Bacteriol 59, 1950.: 509 — 552) je vhodné aj na lyofilizáciu iných druhov vakcínačných vírusov. Preto ak sa pridá do infekčnej suspenzie obsahujúcej iný druh vakcínačného vírusu, napríklad vírus psinky, je možné tieto suspenzie navzájom miešať v ľubovoľnom pomere a lyofilizovať.

Uvedené príklady predmet vynálezu nijak neobmedzujú ani nevyčerpávajú:

1. Spôsob kultivácie:

Suspenzia buniek, pripravená pomocou proteolytických fermentov v rastovom médiu, ktoré obsahuje definované množstvo aminokyselín, a vitamínov s prídavkom 10 hmot. % séra určeného pre tkanivové kul-

túry sa kultivuje na skle, plastickej hmote, štacionárnym spôsobom alebo v otáčaných fľašiach (rolleroch), prípadne v suspenzii na mikronosičoch.

2. Spôsob infekcie bunkových kultúr vakcínačným vírusom:

Bunkové kultúry, pripravené a pestované podľa bodu 1. sa infikujú vakcínačným vírusom pri multiplicitate infekcie najmenej 0,001 nasledovnými spôsobmi:

a)

Suspenzia buniek línie FE o hustote 10^6 buniek . ml⁻¹ v rastovom médiu sa zmieša s vakcínačným vírusom pri multiplicitate infekcie 0,001. Zmes vírusu a buniek sa inkubuje pri 37 °C počas 30 minút. Potom sa zmes vírusu a buniek nariedi v rastovom médiu, ktoré predstavuje minimálne esenciálne médium podľa Eaglea s pH 7,1 a prídavkom 10 hmot. % boviného séra.

b)

Do suspenzie buniek línie FE o hustote $5 \cdot 10^5$. ml⁻¹ v rastovom médiu sa pridá inokulum vakcínačného vírusu o multiplicitate infekcie 0,0001, a infikovaná suspenzia sa ihneď vyleje do kultivačnej nádoby. Takto pripravená suspenzia buniek za účelom prípravy vakcíny sa kultivuje v Rouxových fľašiach pri teplote 37 °C počas 6 dní. Množenie vírusu je sprevádzané výraznými cytopatickými zmenami.

c)

Infekcia prichytených buniek na kultivačnom povrchu po šesťhodinovej kultivácii buniek línie FE pri 37 °C sa do rastového média pridá inokulum vakcínačného vírusu pri multiplicitate infekcie 0,001. Inkubácia pokračuje pri 37 °C počas 6 dní. Množenie vírusu je rovnako ako v bode a) a b) sprevádzané výraznými cytopatickými zmenami.

3. Zber vakcínačného vírusu:

Vakcínačný vírus sa produkuje v rastovom médiu na bunkových kultúrach pestovaných podľa bodu 1 a infikovaných podľa bodu 2. Po vytvorení rozsiahlych cytopatických zmien stanovených mikroskopicky sa kultivácia ukončí a do rastového média s pomnoženým vírusom sa pridá priamo do kultivačných nádob vhodné lyofilizačné médium v pomere 67 hmot. % vírusovej suspenzie a 33 hmot. percent lyofilizačného média. Zmes sa ďalej uchováva v kultivačných nádobách v zmrazenom stave až do lyofilizácie.

Homogenizovaný vírusový materiál s požadovaným obsahom infekčných jednotiek (najmenej 10^4 TKID₅₀ . ml⁻¹), ktorý neobsa-

huje kontaminujúce mikroorganizmy sa rozplňuje do ampuliek, lyofilizuje, vzduchotesne uzatvorí a uchováva pri chladničkovvej

teplote. Vakcína pripravená podľa uvedeného postupu obsahuje najmenej $10^{3.0}$ TKID₅₀ . ml⁻¹ vakcinačného vírusu.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Živá atenuovaná vakcína proti panleukopénii mačiek, vyznačujúca sa tým, že obsahuje v 1 ml najmenej 10^5 TKID₅₀ častíc vírusu panleukopénie mačiek, kmeň FPVA-BN 110/83 CAPM V-291 adaptovaný na bunkové kultúry.

2. Živá atenuovaná vakcína proti panleukopénii mačiek podľa bodu 1, vyznačujúca sa tým, že obsahuje lyofilizačné médium v množstve 25 až 50 hmot. percent, vzťahnuté na hmotnosť celej vakcíny.

3. Spôsob výroby vakcíny podľa bodov 1 a 2, vyznačujúci sa tým, že atenuovaný kmeň panleukopénie mačiek sa pomnožuje na stabilnej mačacej línii buniek FE v minimálnom esenciálnom médiu podľa Eaglea s pH 6,8 až 7,3 obohatenom o bovinné sérum pri teplote od 36 do 38 °C po dobu 4 až 8 dní, až do vytvorenia výrazných cytopatických zmien a potom sa vírusový materiál zmieša s lyofilizačným médiom tak, aby obsahoval minimálne 10^4 TKID₅₀ . ml⁻¹.

4. Spôsob výroby vakcíny podľa bodu 3, vyznačujúci sa tým, že ako prísada do kultivačného média sa použije bovinné sérum s definovaným obsahom nešpecifických inhibítorov proti odpovedajúcemu vírusu.

5. Spôsob výroby vakcíny podľa bodov 3 a 4, vyznačujúci sa tým, že infekcia buniek na produkciu vírusu sa robí buď tak, že bun-

ková suspenzia s obsahom 5 až $10 \cdot 10^6$. ml⁻¹ buniek v rastovom médiu sa infikuje vírusom pri MOI najmenej 0,0001 na bunku, inkubuje pri 36 až 38 °C počas 30 až 60 minút, potom sa 10- až 20krát nariedi v rastovom médiu, vyleje do kultivačnej nádoby a kultivuje pri teplote 36 až 38 °C až do zberu vírusu, alebo bunková suspenzia s obsahom 4 až $8 \cdot 10^5$. ml⁻¹ buniek v rastovom médiu sa infikuje vírusom pri MOI najmenej 0,0001 na bunku a inkubuje pri 36 až 38 °C až do zberu vírusu, alebo do kultivačných nádob sa nasadzuje bunková suspenzia v rastovom médiu s obsahom 4 až $8 \cdot 10^5$. ml⁻¹ buniek, a kultúry sa po 4- až 6hodinovej inkubácii pri 36 až 38 °C infikujú priamo do rastového média vírusom pri MOI najmenej 0,0001 na bunku a inkubujú až do zberu vírusu.

6. Spôsob výroby vakcíny podľa bodov 3 až 5, vyznačujúci sa tým, že sa k vírusovým suspenziám pridáva po ukončení inkubácie lyofilizačné médium, ktoré obsahuje sacharózu, fosforečnanový pufor, glutamát sodný alebo draselný, bovinný albumín alebo iný zdroj bielkovín a želatínu alebo dextrán a zmes sa uchováva až do lyofilizácia v zmrazenom stave pri teplotách vyšších ako -20 stupňov Celsia, alebo sa lyofilizuje okamžite.