

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

244931
(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴
A 61 K 39/255

(22) Přihlášeno 22 04 83

(21) (PV 2888-83)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 22 04 82
(107322) Rumunská lidová republika

(40) Zveřejněno 17 09 85

(45) Vydáno 15 07 88

(72)

Autor vynálezu

PATRASCU IONEL-VICTOR dr., BUCHAREST (RLR)

(73)

Majitel patentu

CENTRUL DE CERCETARI SI BIOPREPARATE PENTRU PASARI
SI ANIMALE MICI — VOLUNTARI, BUCHAREST (RLR)

(54) Způsob přípravy vakcíny proti Markově chorobě

1

2

Způsob přípravy vakcíny proti Markově chorobě jednovrstevnou kultivací zdravých kuřecích embryonálních specificky nepatogenních buněk naočkovaných vakcinálním krocáním herpes virem, po dosažení 80 % cytopatogenního efektu charakteristického pro vakcinální virus, se uvolňuje virus z izolovaných buněk působením ultrazvuku, přičemž se při přípravě použije roztok obsahující sacharózu, fosfáty, glutamát draselný a hovězí albuminovou frakci V, spočívající v tom, že se jako vakcinální virus použije krocání herpes virus kmen FC-126 klon 1 RPCPSA — Voluntari, Bukurešť č. IIIb prostý mykoplasmy, přičemž se tkáňová kultivace viru provádí na rollerech nebo v suspenzi dextranových mikronosičů.

Vynález se týká způsobu přípravy vakcín proti Markově chorobě za použití kmene krocaního herpes viru.

Známa metoda přípravy této vakcíny ze specificky nepatogenních (SPF) embryonálních tkáňových kultur o koncentraci 2×10^6 buněk/ml, nasazených do speciálních skleněných lahví nebo lahví z plastické hmoty, udržovaných ve statickém systému, spočívá v měnění živného média v různých intervalech za účelem vyvolání cytopatogenního efektu nebo v infikování kultur vakcinálním virem. Krocaní herpes virus (HVT) se pak extrahuje z buněčné suspenze do SPGA ochranného roztoku obsahujícího sacharózu, fosfáty, glutamát draselný a hovězí albuminovou frakci V. Virus se pak uvolní působením ultrazvuku při maximálním biologickém limitu po dobu 1 minuty, 5minutové přestávce a 1minutovém chlazení, po kterém se buňky prosté herpes viru rychle zmrazí při teplotě -80°C a udržují se při této teplotě až do stanovení koncentrace viru v ml. Podle tohoto postupu se pak provede rychlé rozmrazení, redistribuce ultrazvukem po dobu 10 sekund, ředění odpovídajícího množství na hodnotu 1 000 dávek/láhev a lyofilizace produktu. Uvedený postup má však následující nevýhody: statický systém tkáňových kultur vyžaduje předávné operace, velké objemy uložené v termostatech, velký počet lahví pro tkáňové kultury, několik změn živných médií ve fázi množení, působením ultrazvuku se uvolňuje nedostatečný počet infekčních vakcinálních částic.

Předkládaný vynález eliminuje výše uvedené nedostatky použitím SPF kuřecích embryonálních primárních buněčných kultur, nasazených na rollery nebo dextranové mikronosiče, které se infikují po vytvoření 80% jednovrstevné tkáňové kultury HVT kmenem FC-126, klon 1, IIb, ze sbírky Center for Research and Bioproducts for Poultry and Small Animals, Voluntary-Bukurešť, pak se shromáždí v SPGA roztoku, který obsahuje sacharózu, fosfáty, glutamát draselný a hovězí albuminovou frakci V, třikrát se zpracuje ultrazvukem po dobu 1 minuty v dvouminutových intervalech a odstředěním se získá určité množství vakcíny. Vzniklý sediment se pak resuspenduje v roztoku SPGA, opět se podrobí působení ultrazvuku výše uvedeným způsobem, odstředěním se získá další podíl vakcíny. Spojené podíly se uchovávají při teplotě -100°C až do stanovení obsahu viru, pak se rychle rozmrazí, ředí roztokem SPGA a provede se lyofilizace.

Následující příklad je příkladem přípravy

vakcíny proti Markově chorobě za použití kmene krocaního herpes viru podle vynálezu.

Příklad provedení

Připraví se SPF kuřecí embryonální primární buněčné kultury na rollerech nebo dextranových mikronosičích. Po 20 až 24 hodinách, kdy se vytvoří asi 80% jednovrstevné tkáňové kultury, se zamění živné médium čerstvým médiem obsahujícím inokulum, tj. vakcinální virové buňky sdruženého typu.

Tkáňové kultury se udržují ve fermentačním tanku nebo v rolleru za průběžné kontroly, bez změny živného média až cytopatogenní efekt charakterizovaný infekcí krocaního herpes viru vykazuje 80 % jednovrstevné tkáňové monokultury.

Infikované buňky se oddělí obvyklou trypsinizační metodou a odstředí se při $+4^\circ\text{C}$ a 1 200 ot/min.

Odstředivé buňky lze resuspendovat v médiu pro vymrazení buněk sdruženého typu a vymrazit na -196°C (při ochlazení 1 až 2°C za minutu), nebo je lze resuspendovat ve speciálním roztoku obsahujícím sacharózu, fosfáty, glutamát draselný, hovězí albuminovou frakci V (SPGA). Virus se pak uvolní z buněk působením ultrazvuku opakovaným třikrát po dobu jedné minuty s dvouminutovými intervaly při teplotě $+4^\circ\text{C}$. Suspenze se pak odstředí při $+4^\circ\text{C}$ a 1 200 ot/min a supernatant představující první podíl vakcíny se oddělí za sterilních podmínek. Sediment se opět suspenduje v SPGA a podrobí stejnému zpracování ultrazvukem. Takto při druhém zpracování ultrazvukem získaná suspenze představuje druhý podíl vakcíny a přidá se k první dávce.

Suspenze virů se zmrazí na -100°C v lahvích stejné velikosti a v nádobách z plastické hmoty. Vzorky oddělené v nádobkách z plastické hmoty se rozmrazí a provedou se bakteriologická, biologická a mykologická stanovení a rovněž kvantitativní stanovení vakcinálního viru.

Po stanovení koncentrace viru v ml se suspenze virů rozmrazí, zředí SPGA a lyofilizuje. Každá láhev musí podle výrobního protokolu obsahovat 250, 500 nebo 1 000 vakcinálních dávek a každá vakcinální dávka 1 200 jednotek tvorby povlaku, dále jen PFU.

Tato lyofilizovaná vakcína se uchovává až do použití při teplotě $+4^\circ\text{C}$.

Srovnání vakcíny vyrobené podle původního postupu a postupu podle vynálezu (varianta I a II):

Vakcína	Celkem ml	PFU/ml	Vakcinální dávka po lyofilizaci
1. vakcína varianta I	100	5×10^6	66,000 *
2. vakcína varianta II			80,000
působení ultrazvuku			
na buněčný sediment			
— supernatant	100	5×10^6	
— buněčný sediment	20	$4,5 \times 10^6$	

*vakcinální dávka obsahuje 1 200 PFU

Médium pro buněčné kultury je médium TC 199 prosté purinu, pyrimidinu a nukleotidu a s přidavkem fosfátu tryptasy, hydrogenuhlíčitanu sodného, antibiotik a fetálního séra.

Vakcinální virus je krocaní herpes virus kmen FC-126 klon 1 prostý mykoplasmy, registrovaný pod číslem IIb klon 1 v rejstříku Center for Research and Bioproducts for Poultry and Small Animals, Voluntari-Bukurešť. Krocaní herpes virus FC-126 je nepatogenní pro kuřata, klon 1 je prostý mykoplasmy a vyvolává v totálních nebo renálních kuřecích embryonálních fibroblastech cha-

rakteristický cytopatogenní efekt. Kuřata vakcinovaná HVT kmenem FE-126 jsou odolná k následné infekci patogenním virem Markovy choroby a nevznikají tumory.

Předkládaný vynález má následující výhody:

— příprava vakcíny nevyžaduje zvláštní metodiku, výroba je kontinuální, poloautomatizovaná,

— suspenze virových částic je po zpracování ultrazvukem homogenní,

— lze připravit jak lyofilizované, tak zmrazené formy vakcín.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy vakcíny proti Markově chorobě jednovrstevnou kultivací zdravých kuřecích embryonálních specificky nepatogenních buněk naočkovaných vakcinálním krocaním herpes virem, po dosažení 80 % cytopatogenního efektu charakteristického pro vakcinální virus, se uvolňuje virus z izolovaných buněk působením ultrazvuku, přičemž se při přípravě použije roztok obsa-

hující sacharózu, fosfáty, glutamát draselný a hovězí albuminovou frakci V, vyznačující se tím, že se jako vakcinální virus použije krocaní herpes virus kmen FC-126 klon 1 RPCPSA — Voluntari, Bukurešť č. IIb prostý mykoplasmy, přičemž se tkáňová kultivace viru provádí na rollerech v suspenzi dextranových mikronosičů.