



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

209379

(11)

(B1)

(22) Prihlášené 24 01 80
(21) (PV 496-80)

(40) Zverejnené 27 02 81

(45) Vydané 01 07 83

(51) Int. Cl.³
A 61 K 39/12

(75)
Autor vynálezu

ČASNOCHA EUGEN MVDr. CSc., ZVOLEN a ČERNÍK KAREL MVDr.
CSc., NITRA

(54) Vakcína proti infekčnej burzitíde z atenuovaného kmeňa a spôsob jej prípravy

Vynález sa týka vakcíny proti infekčnej burzitíde kurčiat (chorobe Gumboro) a spôsobu jej prípravy z kmeňa vírusu, izolovaného na Slovensku a atenuovaného sériovými pasážami, v bunkových kultúrach.

Infekčná burzitis (choroba Gumboro) je vírusové ochorenie kurčiat, popísané prvý raz v roku 1957, ktoré prebieha veľmi často subklinicky, ale vyvoláva pokles prírastkov hmotnosti a spomalenie rastu, čo aj pri nízkej mortalite je príčinou hospodársky významných strát.

Pôvodcom infekčnej burzitídy je vírus, ktorý je mimoriadne rezistentný vo vonkajšom prostredí proti pôsobeniu fyzikálnych a chemických prostriedkov. Pretrváva v kontaminovaných priestoroch a to je príčinou rekurentnej infekcie nasledujúcich zástavov hydiny. Vírusová partikula, ktorej chýba obal, má priemer 60 nm. Obsahuje jednovláknitú ribonukleínovú kyselinu, zloženú z dvoch segmentov. Molekulová hmotnosť genomu vírusu je $1,75 \text{ až } 1,8 \times 10^6$.

Infekcia vnímavých kurčiat do veku 14 týždňov vyvoláva degeneráciu a nekrózu nezrelých lymfocytov B vo Fabriciovej burze, čo má za následok selektívne zníženie produkcie imunoglobulínu G a tým irreverzibilné oslabenie imunitných mechanizmov. Nekrotické zmeny v týmuse a slezine majú nepriaznivý vplyv aj na vývoj bunkovej

imunitnej odpovede. Zvýšená vnímavosť sa prejavuje osobitne voči vírusom pseudomoru hydiny, infekčnej bronchitídy, E. coli, salmonelám, voči vírusu Markovej choroby a voči infekčnej bronchitíde a adenovírusovej infekcii počas obdobia znášky.

Vírus je možno izolovať iba niekoľko dní po infekcii v kuracích zárodkoch bez špecifikovaných patogénnych zárodkov (SPF) a pasážovať ho v kurčatách SPF alebo v bunkových kultúrach, pripravených z vajec SPF.

V roku 1978 bolo v západnej Európe zamorených 60 až 100 % reprodukčných chovov hydiny. V ČSSR sa podľa predbežných výsledkov sérologických prieskumov a izolácie vírusu zistil vysoký stupeň zamorenosti chovov mäsových i nosivých plemien vírusom infekčnej burzitídy.

Profylaxia nákazy vychádza z týchto princípov:

– vírus je veľmi rozšírený v populácii, je mimoriadne rezistentný a dlhodobe prežíva v prostredí;

– nákaza sa prenáša horizontálne a infikovať sa môžu aj čerstvo vyliahnuté kurčatá;

– kurčatá môžu disponovať materskými protilátkami, ktoré poskytujú dočasnú ochranu, ale súčasne brzdia vývoj aktívnej imunity.

Nešpecifická profylaxia je založená na obecných

zásadách zoohygieny: súčasné osadzovanie a vyprázdňovanie hál, obmedzenie presunov materiálu a prechádzania osôb a účinná dezinfekcia formalínovými parami.

Špecifická profylaxia je založená na pasívnej ochrane kurčiat materskými protilátkami, ktorá trvá 2 až 3 týždne a na aktívnej imunizácii kurčiat a reprodukčných nosníc. K očkovaniu sa používajú živé vakcíny z vírusu o rozličnom stupni virulencie, pomnoženom v násadových vakciách z chovov bez špecifikovaných patogénnych zárodkov (SPF). (Becht, H., Rapp. OIE, 1977, č. 201, s. 9; BENNEJEAN, G., Rapp. OIE, 1977, č. 216, s. 8; Cessi, D. – Gualandi, G. L., Rapp. OIE, 1977, č. 211, s. 10; Cullen, G. A. – Wyeth, P. J., Vet. Rec., 99, 1976, č. 21, s. 418; Thornton, D. H., Rapp. OIE, 1977, č. 200, s. 16; Yadin, H. – Hoekstra, J., Rapp. OIE, 1977, č. 212, s. 7; Zanella, A. – a i., Avian Pathol., 6, 1977, č. 1, s. 8).

Pokusne bola pripravená a preskúšaná aj vakcína z vírusu adaptovaného na kultúry buniek embryonálnej burzy, embryonálnych obličiek a fibroblastov a pomnoženého v kultúrach kuracích fibroblastov z vajec SPF (Skeeles, J. K. – a i., Avian Dis., 23, 1979, č. 2, s. 456).

Vírusový kmeň infekčnej burzitídy Z-2037 bol izolovaný na bunkových kultúrach kuracích embryonálnych fibroblastov v roku 1977 z lymfatického aparátu infikovaných kurčiat línie Shaver v lokalite Turčianské Teplice. Pomocou 5-jodo-2-deoxyuridínu bolo potvrdené, že izolát patrí do skupiny ribovírusov. Vírus nie je obalený, lebo chloroformové skúšky na prítomnosť esenciálnych lipidov sú negatívne. Je termostabilný, odoláva teplote 56 °C po dobu 30 minút bez zníženia infekčného titra pre kuracie fibroblasty. Je cytopatogénny, replikuje sa a pomnožuje na kuracích embryonálnych bunkách (KEB) a kuracích embryonálnych obličkových bunkách (KEOB) za tvorby drobnoguličkovitého cytopatického efektu, charakteristického pre vírusy infekčnej burzitídy. Izolovaný vírusový kmeň bol porovnávaný s referenčným kmeňom Stuttgart (prof. Woernle). V jadrách infikovaných buniek nevytvára inklúzne telieska. Krížové neutralizačné testy a precipitačné testy v agarovom geli s antisérmi proti referenčnému kmeňu Stuttgart a proti izolátu Z-2037 sú pozitívne, čo svedčí pre ich antigénnu zhodnosť.

Infekčný titer izolátu v tretej pasáži na KEB bol relatívne nízky: 10^3 TKID₅₀ . ml⁻¹. Kuracie embryá bez materských protilátok, infikované prvými 2 až 3 pasážami vírusu nevykazovali makroskopické zmeny a ich mortalita neprevýšila 20 %. Kurčatá bez materských protilátok, infikované vírusom infekčnej burzitídy (v dávke 0,1 ml vírusu adjustovaného na 1000 TKID₅₀) cestou intrakonjunktiálnou a perorálnou vo veku 5 dní, klinicky neochoreli. Morfológicky mali zväčšené Fabriciove burzy so špecifickými histologickými zmenami, svedčiacimi pre burzitídu s hyperplaziou retikulytov v časti burzálnych folikulov. Rovnako v pečeni infikovaných kurčiat bola pozorovateľná lymfo-

cytárna infiltrácia perivaskulárnych priestorov a sporadické ložiská s vakuolárnou degeneráciou hepatocytov resp. hemoragie.

Izolát prekonal 10 slepých pasáží v štvordňových intervaloch na kuracích zárodkoch bez materských protilátok proti infekčnej burzitíde (lína ROSS) obvyklým virologickým spôsobom. Prítomnosť vírusu infekčnej burzitídy v pasážovaných suspenziách sa sledovala na bunkových kultúrach. Titer vírusu v zmesných suspenziách orgánov kuracích zárodkov dosahoval 10^2 až 10^3 TKID₅₀ . ml⁻¹.

Ďalej sa kmeň vírusu Z-2037 sériovo pasážoval na primárnych kultúrach kuracích embryonálnych buniek, spôsobom podľa virologických metód. Prítomnosť vírusu sa dokazovala vznikom cytopatických zmien. Obsah vírusu sa stanovil akumulárnym výpočtom podľa Reeda a Muencha. Po 25 až 27 pasážach na KEB dosahoval vírus titer najmenej 5×10^6 TKID₅₀ . ml⁻¹.

Postup atenuácie virulencie vírusu infekčnej burzitídy sa kontroloval intrakonjunktiálnou a perorálnou aplikáciou vírusu v dávke ca 5×10^4 TKID₅₀ päťdňových kurčiat bez protilátok proti vírusu infekčnej burzitídy. Infikované zvieratá sa sledovali klinicky, patohistologicky najmä vyšetrením Fabriciovej burzy a pečene a pokusnou vakcináciou takto inokulovaných kurčiat proti pseudomoru hydiny 7 dní po aplikácii vírusu infekčnej burzitídy. Pri serologickom vyšetrení kurčiat na protilátky proti pseudomoru nesmel byť významný rozdiel medzi pokusnou a kontrolnou skupinou. Atenuovaný vírus Z-2037 bol po 10 pasážach v kuracích embryách a 27 pasážach v kultúrach kuracích embryonálnych buniek preskúšaný na patogenitu pre rôzne vekové kategórie hydiny bez protilátok proti infekčnej burzitíde, menovite pre kuracie embryá, jednoduché kurčatá, 5 a 10-dňové kurčatá, 28-dňové brojler a 25 týždňové nosnice. Klinické či patomorfologické zmeny sa nezistili v žiadnej pokusnej skupine, preto sa považoval atenuovaný kmeň za neškodný pre všetky vekové skupiny kurčiat. Pokusné skupiny za 7 až 14 dní po aplikácii vírusu Z-2037 odpovedali tvorbu špecifických protilátok, ktorých špecifickosť sa overovala referenčným vírusom infekčnej burzitídy, kmeňom Stuttgart.

Vírus Z-2037, atenuovaný a adaptovaný na kultúry kuracích embryonálnych buniek popísaným spôsobom, je uložený v Čs. sbírke mikroorganizmů, Sbíрка zoopatogenních mikroorganizmů, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, pod číslom CAPM V-260.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že vakcína proti infekčnej burzitíde sa pripravuje z kmeňa Z-2037 (CAPM V-260), izolovaného na Slovensku a atenuovaného a adaptovaného sériovými pasážami na kultúry kuracích embryonálnych buniek. Vakcinačný vírus sa množí a titruje na primárnych alebo sekundárnych kultúrach kuracích embryonálnych buniek, pripravených z konvenčných vajec. Atenuovaný a adaptovaný vakcinačný vírus infekčnej burzitídy Z-2037 dosahuje

titer 10^7 TKID₅₀ . ml⁻¹ a je neškodný pre všetky vekové kategórie kurčiat.

Príklad 1

Udržiavanie výrobného kmeňa

Výrobný kmeň Z-2037 sa udržiava v lyofilizovanom stave v ampulkách zatavených pod vákuom pri +2 až +8 °C. Pasáž na bunkových kultúrach sa robí jeden raz do roka: Dve ampulky vírusu s obsahom po 0,3 ml lyofilizovaného materiálu sa otvorí a ich obsah sa rozpustí v 4 ml kultivačného média (Hanksov roztok s laktalbumínhydrolyzátom podľa PNL 01-63-74). Takto zriedeným vírusom sa infikujú kultúry kuracích embryonálnych buniek v 2 až 4 Roux fľašiach s objemom 1200 ml. Naočkované Roux fľaše sa inkubujú pri 37 °C. Po zistení špecifickej degenerácie buniek, za 24 až 96 hodín, sa kultúra zmrazí pri -20 °C, rozmrazí, prefiltruje cez sterilnú gázu a titruje v skúmavkových kultúrach. Po kontrole bakteriálnej sterility a po stanovení obsahu vírusu je zásobný kmeňový materiál pripravený k lyofilizácii s prídavkom 40% protekčného média (95% inaktivovaného konského séra a 5% glukózy) alebo sa uchováva v zmrazenom stave pri -20 °C a používa sa k inokulácii bunkových kultúr pri výrobe vakcíny.

Príklad 2

Príprava vakcíny na primárnych bunkových kultúrach.

Pri výrobe vakcíny sa zásobným kmeňovým materiálom inokulujú kultúry kuracích embryonálnych buniek v Roux fľašiach v množstve 1 ml vírusovej suspenzie na jednu Roux fľašu s objemom 1200 ml a obsahu 100 ml kultivačného média. Naočkované Roux fľaše sa inkubujú pri 37 °C. Po zistení špecifickej degenerácie buniek, za 24 až 96 hodín, sa kultúry zmrazia pri -20 °C, rozmrazia, prefiltrujú cez sterilnú gázu a titrujú v skúmavkových bunkových kultúrach. Po kontrole bakteriálnej sterility a po stanovení obsahu vírusu sa vírusová suspenzia naplní do liekoviek ako tekutá vakcína, alebo sa s prídavkom 20% protekčného lyofilného média (3 diely 20% roztoku Laktína a 1 diel 40% glukózy) naplní do ampúl a lyofilizuje sa. Tekutá vakcína sa uchováva v zmrazenom stave, lyofilizovaná pri +2 až +8 °C.

Príklad 3

Príprava vakcíny na sekundárnych bunkových kultúrach

Dobre narastené kultúry kuracích embryonálnych buniek v Roux fľašiach o objeme 1200 ml sa uvoľnia roztokom verzéntrypsínu predohriateho na 37 °C. Suspenzia uvoľnených buniek sa preniesie do kultivačného média a zakladá sa do Roux fliaš ako primárna bunková kultúra. Sekundárne kultúry sa inokulujú a inkubujú ako primárne kultúry a vírusová suspenzia sa spracováva rovnako ako je popísané v príklade 2.

Príklad 4

Kontrola vakcíny titráciou

Kultúry kuracích embryonálnych buniek na titráciu vírusu sa zakladajú do skúmaviek rozmerov 14/15 × 90 mm v množstve 1,0 ml kultivačného média. Kultúry buniek sa infikujú po 0,1 ml vakcinačného vírusu, riedeného postupne desaťnásobne od 10^{-3} do 10^{-8} , každé riedenie najmenej do 4 skúmaviek. Inokulované skúmavkové kultúry sa inkubujú 96 až 120 hodín pri 37 °C a titer vírusu sa odčíta mikroskopicky podľa cytopatického účinku vírusu na bunky. TKID₅₀ vírusu sa stanoví akumulárnym výpočtom podľa Reeda a Muencha. Titer vírusu vo vakcíne musí byť najmenej 10^5 TKID₅₀ . ml⁻¹.

Príklad 5

Stanovenie neutralizačných protilátok

Skúmavkové kultúry kuracích embryonálnych buniek sa pripravujú ako v príklade 4. Vírusová suspenzia s obsahom 100 až 1000 TKID₅₀ vírusu v 0,1 ml sa zmieša s rovnakým objemom výšetrovateľného materiálu (sérum), riedeného postupne desaťnásobne od 10^{-1} do 10^{-5} , a nechá sa stáť 60 minút pri laboratórnej teplote. Skúmavkové kultúry sa inokulujú dávkou 0,2 ml zmesi vírusovej suspenzie so sérom, každé riedenie séra najmenej do 4 skúmaviek. Skúmavkové kultúry sa inkubujú 96 až 120 hodín pri 37 °C. Titer neutralizačných protilátok sa odčíta mikroskopicky podľa chýbania cytopatického účinku vírusu na bunky. 50% neutralizačná dávka (ND₅₀) sa stanoví akumulárnym výpočtom podľa Reeda a Muencha.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Vakcína proti infekčnej burzitíde kurčiat, v tekutom alebo lyofilizovanom stave, vyznačujúca sa tým, že obsahuje v 1 ml 10^5 až 10^7 TKID₅₀ vírusu infekčnej burzitídy CAPM V-260.

2. Spôsob prípravy vakcíny podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa atenuovaný kmeň vírusu infekčnej burzitídy CAPM V-260 pomnožuje v primárnych kultúrach kuracích embryonálnych

buniek, pripravených z konvenčných vajec, pri teplote 36 až 39 °C po dobu 24 až 96 hodín.

3. Spôsob prípravy vakcíny podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa atenuovaný kmeň vírusu infekčnej burzitídy CAPM V-260 pomnožuje v subkultúrach embryonálnych buniek, pripravených z konvenčných vajec, pri teplote 36 až 39 °C po dobu 24 až 96 hodín.