



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

267 936

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
A 61 K 39/295

(21) PV 6127-87.L
(22) Prihlášené 20 08 87

(40) Zverejnené 12 07 89
(45) Vydané 02 07 90

(75)

Autor vynálezu

ŽUFFA TOMÁŠ, MVDr., NITRA

(54)

Živá atenuovaná vakcína proti parvoví-
róze, psinke, infekčnej laryngotrachei-
tíde a infekčnej hepatitíde vhodná pre-
dovšetkým na profylaxiu kožuštinových
zvierat a spôsob jej prípravy

(57)

Riešenie sa týka živej atenuovanej
vakcíny proti parvoviróze, psinke, in-
fekčnej laryngotracheitíde a infekčnej he-
patitíde vhodnej predovšetkým na profy-
laxiu kožuštinových zvierat a spôsobu jej
prípravy na bunkových kultúrach. Vakcína
je určená na ochranné a núdzové očkovanie
vnímavých zvierat proti uvedeným ochore-
niám. Vakcína je lyofilizovaná a vyznaču-
je sa tým, že obsahuje v 1 ml najmenej
 10^5 TKID₅₀ častíc parvovirusu psov, kme-
na CPVA-BN 80/82 CAPM V-290, 10^5 TKID₅₀
častíc vírusu infekčnej laryngotracheiti-
dy, kmeňa CADV-2 H-5/85 MD CK40 CAPM V -
320, adaptovaných na bunkové kultúry
a lyofilizačné médium. Vírus infekčnej
laryngotracheitídy sa pomnožuje na sta-
bilnej línii MDCK v minimálnom esenciál-
nom médiu podľa Eaglea. Po ukončení kul-
tivácie sa vírusové materiály zmiešajú
s lyofilizačným médiom a lyofilizujú.

Vynález sa týka živej atenuovanej vakcíny proti parvoviróze, psinke, infekčnej laryngotracheitide a infekčnej hepatitide, a spôsobu jej prípravy na bunkových kultúrach.

Popri všeobecne známých pôvodcoch vírusových ochorení psov ako sú besnota, psinka a infekčná hepatitida, spoľahlivo kontrolovaných efektívnymi atenuovanými vakcínami existuje celý rad vírusov, ktoré sú pôvodcami častých ochorení zažívacích a dýchacích orgánov. K týmto v prvom rade patria: paravirus psov, pôvodca akútneho črevného ochorenia postihujúceho predovšetkým mláďatá, vírus infekčnej laryngotracheitidy a vírus parainfluenzy 2 psov, ktoré samostatne, alebo v súčinnosti s bakteriálnym zárodkom *Bordetella bronchiseptica* vyvolávajú hromadné ochorenia dýchacích orgánov /Kennel cough syndrome/. Appel v roku 1978 definoval patogenitu parvovirusu psov /CPV 2/ a označil ho ako pôvodcu epizootie črevného ochorenia ktoré sa objavilo prvýkrát v roku 1978 v Spojených štátoch.

Ochorenie vyvolané týmto vírusom sa klinicky prejavuje nechutenstvom, malátnosťou, zvracaním a hnačkou, ktorá môže byť krvavá. Zvieratá majú horúčku a pri hematologickom vyšetrení sa spravidla zisťuje znížený počet leukocytov. Srdcová forma ochorenia postihuje výhradne šteňatá a je charakterizovaná rýchlym a veľmi krátkym priebehom a následne úhynom. Ochorenie spôsobuje výrazné straty v chovoch psov, pričom úhyn predstavuje 20 až 40 % z celkového počtu zvierat. Ochorenie postihuje všetky vekové kategórie zvierat, ale najmä šteňatá, pričom nástup je prudký a priebeh veľmi rýchly.

Psi adenovirus serotypu 2 /CADV-2/, izolovaný a identifikovaný DITSCHFIELDOM, 1962 je serologicky, antigénne, svojim trpizmom a klinickým prejavom ochorenia odlišný od vírusu infekčnej hepatitidy psov /ICH/.

Ochorenie vyvolané týmito vírusom má charakter infekčnej laryngotracheitidy, tracheobronchitidy, zápalu nosofaryngu a pľúc, s klinickými prejavmi nádchy, spontánneho kašľa zapríčineného zúžením priechodnosti priedušiek, a pľúcnej hyperventilácie doprevádzanej zväčšením bronchiálnych lymfatických uzlín. Patologicko-anatomický obraz charakterizuje infiltrácia submukózy lymfocytami, plazmatickými bunkami a neutrofilmi, proliferatívne intersticiálna pneumónia, nekrotizácia bronchov a bronchiolitis. Pri infekcii vírusom CADV-2 sa zisťujú vnútrojadrové inklúzie lokalizované v epitelialných bunkách nosovej a faryngeálnej sliznice.

Špecifická profylaxia uvedených vírusových ochorení, ktoré predstavujú v chovoch psov vážny zdravotný problém je založená na pasívnej imunizácii podaním hyperimúnných sér alebo imúnných sérových globulínov, ale najčastejšie sa využíva aktívna imunizácia. Vo svete boli vyvinuté inaktivované a živé monovalentné a kombinované vakcíny /CANDUR^R-P, MULTIMUN^R 7, NOBI^R VAC-SH, ENDURACELL^R 7 - NSR, GALAXY^R-VI - USA/ First Live canine parvovirus vaccine, Vet.Rec. 17, 1984, 114 No.11 p.255; Stettner, W. - Schutzimpfungen beim Hund, Wiener. Tierärztliche Monatsschrift, 72, 1985, Heft 5 S.178-182., Langzeituntersuchung zur Immunogenität eines Kombinationipfstoffes für Hunde, Zygraich, N., - Charlier, P. - Florent, G., - Gill, M.M.A., - a spol. Kleintierpraxis 30, 1985, 45-49.

Aj keď v zastúpení jednotlivých vírusových kmeňov vo vakcínach je značná rôznorodosť, všeobecne sa požaduje aby jedna vakcinačná dávka obsahovala minimálne $10^{2,5}$ až $10^{3,0}$ TKID₅₀ z každého vírusu.

Vzhľadom na všeobecný výskyt parvovirózy psov a narastajúci počet respiračných ochorení, pri vylúčení účinku vírusov psinkového komplexu u mäsožravých kožušinových zvierat, postavili sme si za cieľ získať, alebo izolovať odpovedajúci vírusový kmeň, s perspektívou použiť ho na prípravu očkovacích látok. Jednotlivé izoláty vírusov infekčnej laryngotracheitidy a parvovirusu sme cestou chemických, serologických a virologických metód identifikovali, klónovali, potvrdili ich puritu a elektrónopticky znázorni-

li. Po ukončení atenuácie jednotlivých vírusov na rôznych druhoch bunkových kultúr a overení ich neškodnosti na vnímavých zvieratách sme vyvinuli živú kombinovanú vakcínu proti uvedeným infekciám.

Predmetom vynálezu je teda živá atenuovaná vakcína proti parvovíróze s obsahom kmeňa CPVA-BN 80/82 CAPM V-290 v množstve 10^3 TKID₅₀, psínke s obsahom kmeňa CDV-F-BN 10/83 CAPM V-289 v množstve 10^3 TKID₅₀, infekčnej laryngotracheitide a infekčnej hepatitide, ktorá sa vyznačuje tým, že obsahuje v 2 ml kmeň parvovírusu psov, CPVA-BN 80/82 CAPM V-290, v množstve najmenej 10^3 TKID₅₀, kmeň vírusu psinky CDV-F-BN 10/83 CAPM V-289 v množstve najmenej 10^3 TKID₅₀ a kmeň vírusu infekčnej laryngotracheitidy CADV-2 H-5/85 MDCK40 CAPM V-320 v množstve $10^{2,5}$ TKID₅₀ častíc vírusu. Vakcína obsahuje lyofilizačné médium množstva 25 až 50 hmotnostných percent, ktoré sa skladá zo sacharózy, fosforečnanového pufra, glutamátu sodného alebo draselného, bovinného albumínu alebo iného zdroja bielkovín a želatíny, alebo dextránu. Výroba vakcíny sa vyznačuje tým, že kultiváty parvovírusu psov a vírusu psinky pripravené známym spôsobom sa zmiešajú s kultivátom vírusu infekčnej laryngotracheitidy CADV-2 H-5/85 MDCK40 získaným pomnožením na stabilnej línii MDCK. Vírus infekčnej laryngotracheitidy sa na uvedenej stabilnej línii množí pri teplote 37 °C po dobu 3 až 6 dní, kedy sa vytvorí výrazné cytopatické zmeny a potom sa vírusový materiál zmieša s lyofilizačným médium a lyofilizuje.

Vírus infekčnej laryngotracheitidy predstavuje virulentný kmeň zahraničnej proveniencie získaný vo forme lyofilizátu infekčných tkaninových tekutín v 5. pasáži na bunkových kultúrach. Atenuácia vírusu, homogenita vírusovej populácie a stabilita imunobiologických vlastností sa dosiahla v 35. pasáži na b.l. MDCK. K príprave vakcíny bol použitý vírus v 40. pasáži na uvedenom druhu tkaniva atenuovaný a definovaný na našom pracovisku.

Vírusové kmene parvovírusu psov CPVA-BN 80/82 CAPM V-290, psinky CDV-F-BN 10/83 CAPM V-289 a infekčnej laryngotracheitidy CADV-2 H-5/85 MDCK 40 CAPM V-320, sú uložené v Československej zbierke mikroorganizmov na Výskumnom ústave veterinárneho lekárstva v Brne, Hudcova 60.

Postup výroby vakcíny:

Spôsob výroby vakcíny je založený na tom, že uvedené vakcinačné kmene, neškodné pre všetky vekové kategórie psov a mäsožravých kožušinových zvierat pri ľubovoľnej aplikácii, sa pomnožujú na definovaných bunkových substrátoch narastených na skle, plastickej hmote, kultivovaných stacionárnym spôsobom alebo v otáčaných fľašiach /rolleroch/, prípadne na mikronosičoch.

Spôsob infekcie buniek FE vakcinačným vírusom parvovírózy psov:

Suspenzia buniek o hustote 5 až $10 \cdot 10^6$ buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$ 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 Eagla s pH 6,8 až 7,3 s prídavkom piatich až desiatich hmotnostných percent bovinného séra s vyznačenou kvalitou.

Rovnako je možné do bunkovej suspenzie v rastovom médiu pridať inokulum vakcinačného vírusu o multiplícite infekcie 0,0001 až 0,001 a zmes vírusu a buniek vyliať do kultivačnej nádoby.

Takto pripravená suspenzia buniek za účelom prípravy vakcíny sa kultivuje na skle, plastickej hmote, stacionárnym spôsobom, alebo v otáčaných fľašiach /rolleroch/, pri-

padne na mikronosičoch, pri 36 až 38 °C počas 4 až 8 dní.

Možná je tiež infekcia prichytených buniek na kultivačom povrchu - po štvor až šesťhodinovej inkubácii buniek linie FE pri 36 až 38 °C. Do rastového média sa pridá inkulum vakcinačného vírusu pri multiplícite 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.

Spôsob infekcie buniek kuracích embryonálnych fibroblastov KEB a buniek linie VERO vírusom psinky.

Bunkové kultúry KEB alebo VERO sa infikujú vakcinačným kmeňom vírusu psinky pri multiplícite infekcie najmenej 0,005. Infikujú sa 24 až 48 hod. bunky narastené na kultivačom povrchu tak, že sa vymení rastové médium za udržiavacie, do ktorého je pridané infekčné inokulum. Udržiavacie médium je pre jednotlivý druh buniek rovnakého zloženia ako rastové, ale neobsahuje sérum a má upravený obsah hydrouhličitanu sodného na 0,1 až 0,2 hmotnostných percent.

Alebo sa zmes vírusu a buniek nechá inkubovať počas 60 až 120 min. pri 37 °C, potom sa suspenzia buniek nariedi v rastovom médiu tak, aby obsahovalo 4-8.10⁶ buniek . ml⁻¹ . buniek.

Rovnako je možné infekčné inokulum pridať do suspenzie buniek v rastovom médiu a bez predchádzajúcej inkubácie naliať do kultivačnej nádoby. Za 24. až 48 hodín sa rastové médium vymení, bez oplachu jednovrstvy buniek, za udržiavacie a inkubácia pokračuje za rovnakých podmienok. Po zistení prvých cytopatických zmien /obvykle za 72 až 96 hod./ sa médium vymieňa v 24 hodinových intervaloch, pridá doň lyofilizačné médium a uchováva v zmrazenom stave až do prípravy kombinovanej vakcíny pred lyofilizáciou, alebo sa kultivácia nechá prebiehať tak dlho, dokiaľ viac ako 50 percent jednovrstvy buniek je postihnutá vírusšpecifickými zmenami a vírusová suspenzia sa zbiera len jednorázovo.

Spôsob infekcie buniek MDCK vakcinačným vírusom infekčnej laryngotracheitidy.

Bunkové kultúry sa infikujú vakcinačným kmeňom vírusu infekčnej laryngotracheitidy pri multiplícite infekcie 0,1 až 0,001. Infikujú sa 24 až 48 hodinové kultúry narastené na kultivačom povrchu tak, že sa odstráni rastové médium a po 30 až 60 minútovej adsorpcii vírusu na bunky pri 36 až 38 °C sa pridá udržiavacie médium. Udržiavacie médium je rovnakého zloženia ako rastové, ale neobsahuje sérum. Inkubácia pokračuje pri 36 až 38 °C počas 3 až 5 dní.

Rovnako je možné infekčné inokulum pridať do suspenzie buniek v rastovom médiu a bez predchádzajúcej inkubácie naliať do kultivačnej nádoby. Za 24 až 48 hodín sa rastové médium vymení, bez oplachu jednovrstvy buniek, za udržiavacie a inkubácia pokračuje za rovnakých podmienok počas 3 až 5 dní. Kultivácia sa v oboch prípadoch nechá prebiehať tak dlho, dokiaľ viac ako 80 percent jednovrstvy buniek je postihnutá vírusšpecifickými zmenami.

Po ukončení kultivácie sa infekčné tekutiny jednotlivých vírusov zamiešajú s lyofilizačným médiom v pomere 50 až 75 hmotnostných percent vírusu k 50 až 25 hmotnostných percent lyofilizačného média a uchovávajú pri -15 až -20 °C až do lyofilizácie, lyofilizačné médium je možné pri zachovaní rovnakých hmotnostných pomerov pridávať až tesne pred kompletizáciou a lyofilizáciou vakcíny. Na prípravu lyofilizovanej vakcíny sa použijú infekčné tekutiny s obsahom minimálne 10⁴ TKID₅₀. ml⁻¹ častíc vírusu CPVA-BN 80/82 CAMP V-290, 10⁴ TKID₅₀ častíc vírusu CDV-F-BN 10/83 CAMP V-289 a 10³ TKID₅₀ častíc vírusu CADV-2 H-5/85 MDCK 40 CAMP V-320, bakteriologicky sterilné. Takto pripravené vírusové suspenzie zmiešané v pomere 0,5 dielu parvovírusu a 1 dielu vírusu psinky a 1

dielu vírusu infekčnej laryngotracheitidy s lyofilizačným médiom, ktoré obsahuje sacharózu, fosforečnanový pufo, glutamát sodný, alebo draselný, boviný albumin alebo iný zdroj bielkovín, dextrán alebo želatínu /BOVARNICK, M.R. - MILLER, J.C. - SNYDER, J.C., The influence of certain salts, aminoacids, sugars, and proteins on the stability of rickettsiae. J. Bacteriol., 59, 1950: 509-522/ sa vo forme homogenizátu rozplňujú do ampuliek alebo liekoviek, lyofilizujú, vzduchotesne uzatvoria a uchovávajú pri chladničkovej teplote. Vakcína pripravená podľa uvedeného postupu obsahuje najmenej 10^3 TKID₅₀.ml⁻¹ parvovirusu, 10^3 TKID₅₀.ml⁻¹ vírusu psinky a $10^{2,5}$ TKID₅₀.ml⁻¹ vírusu infekčnej laryngotracheitidy, čo predstavuje jednu imunitizačnú dávku.

Živá atenuovaná vakcína proti parvoviróze, infekčnej laryngotracheitide a infekčnej hepatitide sa môže s výhodou používať na profylaxiu chorôb lišok a pŕscov, s klinickými prejavmi nádchy, výtoku z očí, laryngotracheitidy, tracheobronchitidy a paralýzy zadných končatín doprevádzaných 30 až 50 percentným úhynom z celkového počtu zvierat, ako tomu bolo v rokoch 1985 až 1987. Živá atenuovaná vakcína, pripravená podľa prihlášky vynálezu zaisťuje požadovanú ochranu proti všetkým aktuálnym vírusovým infekciám pri uvedených kožušinových zvieratách.

Za súčasného stavu poznatkov nemá ďalšie rozširovanie spektra účinnosti očkovacej látky opodstatnenie, pričom prídanie ďalších antigénnych komponent by výrazne zvýšilo predpokladanú cenu výrobku /vakcíny/, a negatívne ovplyvnilo ekonomickú vo veľkochovoch kožušinových zvierat.

Uvedené príklady predmetu vynálezu nijak neobmedzujú ani nevyčerpávajú:

Príklad 1

Suspensia buniek FE, MDCK, VERO, pripravená pomocou proteolytických fermentov a suspenzia kuracích ambryonálnych buniek /KEB/, pripravená pomocou proteolytických fermentov z 11 dňových kuracích zárodokov v rastových médiách, ktoré obsahujú definované množstvo aminokyselín a vitamínov s prídavkom 5 hmotnostných percent séra pri kultúrach KEB a VERO a 10 hmotnostných percent séra určeného pre tkaninové kultúry pri kultúrach FE a MDCK sa kultivujú na skle, štacionárnym spôsobom a v suspenzii.

Príklad 2

Spôsob infekcie bunkových kultúr vakcinačným vírusom parvovirusu psov:

Bunkové kultúry pripravené a pestované podľa bodu 1. sa infikujú vakcinačným vírusom CPVA-BN 80/82 pri multiplícite infekcie najmenej 0,001 nasledovnými spôsobmi:

a. Suspensia buniek línie FE o hustote $10 \cdot 10^6$ buniek . ml⁻¹ v rastovom médiu sa zmieša s vakcinačným vírusom pri multiplícite 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 7,2 a prídavkom 10 hmotnostných percent bovinneho séra.

b. Do suspenzie buniek línie FE o hustote $5 \cdot 10^5$. ml⁻¹ v rastovom médiu sa pridá inokulum vakcinačného vírusu o multiplícite infekcie 0,001, a infikovaná suspenzia sa ihneď vyleje do kultivačnej nádoby. Takto pripravená suspenzia buniek za účelom prípravy vírusu do vakcíny sa kultivuje v Rouxových fľašiach pri teplote 37 °C počas 6 dní.

c. Infekcia prichytených buniek na kultivačnom povrchu po šesťhodinovej kultivácii buniek FE pri 37 °C sa do rastového média pridá inokulum vakcinačného vírusu pri multiplícite 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.

Vakcinačný vírus sa produkuje v rastovom médiu na bunkových kultúrach FE pestovaných podľa bodu 1 a infikovaných podľa bodu 2. Po vytvorení rozsiahlych cytopatických

zmien atenovných mikroskopicky sa kultivácia ukončí a do kultivačného média s pomnoženým vírusom sa pridá priamo do kultivačných nádob vhodné lyofilizačné médium v pomere 50 hmotnostných percent vírusovej suspenzie a 50 hmotnostných percent lyofilizačného média. Zmes sa uchováva v kultivačných nádobách v zmrazenom stave.

Příklad 3

Spôsob infekcie bunkových kultúr vakcinačným vírusom psinky:

Inokulum vakcinačného vírusu, v ktorom je vírus stabilizovaný prídavkom 10 hmotnostných percent dimetylsulfoxidu sa uchováva v zmrazenom stave pri -70°C . Bunkové kultúry pripravené a pestované podľa bodu 1. sa infikujú vakcinačným vírusom CDV-F-BN 10/83 pri multiplicitate infekcie najmenej 0,005 nasledovnými spôsobmi:

a. Infekcia narastenej jednovrstvy buniek KEB: z monovrstvy buniek sa po 24 hodinom raste odstráni rastové médium a bunková kultúra sa infikuje inokulom pridaným do udržiavacieho média, ktorým sa nahradí rastové médium.

b. Suspenzia buniek VERO v rastovom médiu s hustotou asi 10^7 . ml⁻¹ buniek sa zmieša s inokulom vakcinačného vírusu, a zmes inkubuje pri 37°C počas 30 min. Po ukončení sa infikovaná suspenzia buniek nariedi v rastovom médiu tak, aby obsahovala $4 \cdot 10^5$. ml⁻¹ buniek v 1 ml a kultivuje sa pri 37°C 48 hod. t.j. až do vytvorenia úplnej jednovrstvy buniek na kultivačnom povrchu. Potom nasleduje výmena rastového média za udržiavacie.

c. Do bunkovej suspenzie KEB v rastovom médiu s hustotou $4 \cdot 10^5$. ml⁻¹ sa pridá inokulum vakcinačného vírusu. Suspenzia sa ihneď vleje do kultivačnej nádoby a inkubuje sa pri 37°C počas 24 hodín t.j. až do vytvorenia jednovrstvy buniek. Potom nasleduje výmena rastového média za udržiavacie.

Vakcinačný vírus sa produkuje v udržiavacom médiu, ktoré je svojim základným zložením rovnaké ako rastové médium s tým rozdielom, že neobsahuje sérum a koncentrácia hyrouhličitanu sodného sa pohybuje do 0,30 hmotnostných percent. Vírus z bunkových kultúr pestovaných podľa bodu 1. sa infikovaných podľa bodu 3 sa získava nasledovnými spôsobmi:

a. Udržiavacie médium sa ponechá bez výmeny na kultúrach až do vytvorenia rozsiahlych cytopatických zmien stanovených mikroskopicky. Do udržiavacieho média s vírusom sa pridá priamo do kultivačných nádob vhodné lyofilizačné médium v pomere 2 diely vírusovej suspenzie a jeden diel lyofilizačného média. Zmes sa ďalej uchováva v kultivačných nádobách v zmrazenom stave.

b. Po objavení sa prvých príznakov špecifických cytopatických zmien sa udržiavacie médium zleje a do kultivačných nádob naleje rovnaké množstvo udržiavacieho média. Postup sa opakuje v 24. hod. intervaloch až do vytvorenia rozsiahleho cytopatického efektu, kedy sa konečné ošetrovanie vykoná podľa bodu a. Do vírusovej suspenzie získanej pri opakovaných výmenách udržiavacieho média sa bezprostredne po zliatí pridá lyofilizačné médium a ďalej sa uchováva v zmrazenom stave.

Příklad 4

Spôsob infekcie bunkových kultúr vakcinačným vírusom infekčnej laryngotracheitídy:

Bunkové kultúry pripravené a pestované podľa bodu 1. sa infikujú vakcinačným vírusom CADV-2 H-5/85 MD CK40 pri multiplicitate infekcie najmenej 0,01 nasledovnými spôsobmi:

a. Infekcia narastenej jednovrstvy buniek MDCK: Z monovrstvy buniek sa po 48 hodinom raste pri 37°C odstráni rastové médium, ktoré predstavuje minimálne esenciálne médium podľa Eaglea a bunková kultúra sa infikuje adsorpciou vírusu na bunky po dobu 60 minút pri 37°C . Potom sa pridá udržiavacie médium, ktoré je rovnakého zloženia ako

rastové, ale neobsahuje sérum.

b. Do bunkovej suspenzie v rastovom médiu s hustotou $4 \cdot 10^5$. ml⁻¹ sa pridá inokulum vakcinačného vírusu. Suspenzia sa ihneď vleje do kultivačnej nádoby a inkubuje sa pri 37 °C počas 48 hodín t.j. až do vytvorenia jednovrstvy buniek. Potom nasleduje výmena rastového média za udržiavacie, a inkubácia pokračuje pri 37 °C počas 2 dní. Množenie vírusu je v oboch prípadoch sprevádzané výraznými cytopatickými zmenami bunkovej jednovrstvy.

Vakcinační virus sa produkuje v rastovom médiu na bunkových kultúrach MDCK pestovaných podľa bodu 1. a infikovaných podľa bodu 4. Po vytvorení rozsiahlych cytopatických zmien sa kultivácia ukončí a do kultivačného média s pomnoženým vírusom sa pridá priamo do kultivačných nádob vhodné lyofilizačné médium v pomere 2 diely vírusovej suspenzie a jeden diel lyofilizačného média. Zmes sa ďalej uchováva v kultivačných nádobách v zmrazeno stave.

Príklad 5

Príprava kombinovanej vakcíny:

Na prípravu lyofilizovanej vakcíny sa použijú infekčné tekutiny s obsahom minimálne 10^4 TKID₅₀ . ml⁻¹ častíc vírusu CPVA-BN 80/82, 10^4 TKID₅₀ . ml⁻¹ častíc vírusu CDV-F-BN 10/83 a 10^3 TKID₅₀ častíc vírusu CADV-2 H-5/85 MDCK40 bakteriologicky sterilné. Takto pripravené vírusové suspenzie sa zmiešajú v pomere 0,5 dielu parvovírusu a 1 diel vírusu psinky a 1 diel vírusu infekčnej laryngotracheitídy. Homogenizovaný vírusový materiál s požadovaným obsahom infekčných jednotiek sa adjustuje, lyofilizuje, vzduchotesne uzatvori a uchováva pri chladničkovj teplote.

Vakcína pripravená podľa uvedeného postupu obsahuje v jednej aplikačnej dávke najmenej 10^3 TKID₅₀ parvovírusu psov, 10^3 TKID₅₀ vírusu psinky a $10^{2,5}$ TKID₅₀ vírusu infekčnej laryngotracheitídy.

Porovnanie účinností živej atenuovanej vakcíny proti parvovíróze, psinke, infekčnej laryngotracheitíde a infekčnej hepatitíde vhodnej predovšetkým na profylaxiu kožušínových zvierat s účinnosťou monovalentnej vakcíny proti infekčnej laryngotracheitíde a bivalentnej vakcíny proti parvovíróze a psinke odskúšané na liškách zobrazuje obraz 1. Uvedené hodnoty zobrazené graficky vyjadrujú priemerné titre hemaglutinačne-inhibičných protilátok proti parvovírusu a vírusu infekčnej laryngotracheitídy a vírus neutralizačných protilátok /VN/ proti vírusu psinky. Z predložených výsledkov je zrejmé, že po očkovaní polyvalentnou vakcínou boli proti očakávaniu zisťované hodnoty protilátok na rovnakej úrovni ako po aplikácii mono- resp. bivalentnej vakcíny. Navodenie takejto imunitnej odpovede sa nepredpokladalo a nebolo doposiaľ u mäsosožravých kožušínových zvierat zisťované.

Z výsledkov uvedených v tabuľke 1 vidieť, že vakcinované ani kontrolné zvieratá nereagovali na infekciu terénnym kmeňom psieho parvovírusu zaznamenanou poruchou celkového zdravotného stavu. Tieto nálezy podporujú aj údaje zistené McAdaraghom a kol. *Experimental infection of conventional dogs with canine parvovirus. Am.J.Vet.Res., Vol. 43, No.4, 1982, p. 693-696.*

Po infekcii virulentným vírusom psinky ostali zdravé všetky vakcinované zvieratá, kým obojve kontrolné lišky uhynuli za charakteristických príznakov psinkového ochorenia. Pri úplnej chránenosti vakcinovaných zvierat na infekciu vírusom infekčnej laryngotracheitídy, reagovali dve z piatich kontrol prechodným, ale zjavným ochorením horných dýchacích ciest. Rovnako ostali zdravé všetky vakcinované zvieratá infikované vírusom infekčnej hepatitídy, ktorý je pôvodca encefalitídy lišok, čo je prejavom krížovej chrá-

neností zvierat očkovaných vírusom infekčnej laryngotracheitidy proti infekcii vírusom infekčnej hepatitidy /u lišok encefalitidy/. Obidve nevakcinované kontroly reagovali na infekciu vývojom klinických príznakov charakteristických pre vírusovú encefalitidu lišok.

ZVIERATÁ	INFEKCIA VÍRUSOM	POČET ZVIERAT	VÝSLEDKY		
			Klin. zdravé	Klin. choré	Úhyn
Vakcinova- né	CPV	5	5	0	0
	CDV	5	5	0	0
	CADV-2	5	5	0	0
	CADV-1	5	5	0	0
Kontroly	CPV	5	5	0	0
	CDV	2	0	0	2
	CADV-2	5	3	2	0
	CADV-1	2	0	2	0

Tab. č. 1

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

- Živá atenuovaná vakcína proti parvovírusu s obsahom kmeňa CPVA-BN 80/82 CAPM V-290 v množstve 10^3 TKID₅₀, psinke s obsahom kmeňa CDV-F-BN 10/83 10/83 CAPM V-289 v množstve 10^3 TKID₅₀, infekčnej laryngotracheitide a infekčnej hepatitide vyznačujúca sa tým, že obsahuje v 2 ml kmeň parvovírusu psov CPVA-BN 80/82 CAPM V-290, v množstve najmenej 10^3 TKID₅₀, kmeň vírusu psinky CDV-F-BN 10/83 CAPM V-289 v množstve najmenej 10^3 TKID₅₀ a kmeň vírusu infekčnej laryngotracheitidy CADV-2 H-5/85 MDCK40 CAPM V-320 v množstve $10^{2,5}$ TKID₅₀ častíc vírusu, a lyofilizačné médium.
- Živá atenuovaná vakcína podľa bodu 1, vyznačujúca sa tým, že obsahuje lyofilizačné médium v množstve 25 až 50 hmotnostných percent vztiahnuté na hmotnosť celej vakcíny.
- Živá atenuovaná vakcína podľa bodu 1 až 3 vyznačujúca sa tým, že lyofilizačné médium obsahuje sachrózu, fosforečnanový pufor, glutamát sodný alebo draselný, bovinný albumín alebo iný zdroj bielkovín a želatínu alebo dextrán.
- Spôsob výroby vakcíny podľa bodu 1 kultiváciou parvovírusu CPVA-BN 80/82 CAPM V-290 a vírusu psinky č. CDV-F-BN 10/83 CAPM V-289 známym spôsobom a vyznačujúci sa tým, že sa kultiváty parvovírusu a vírusu psinky zmiešajú s kultivátom vírusu infekčnej laryngotracheitidy CADV-2 H-5/85 MDCK40 CAPM V-320 získaným pomnožením na stabilnej línii buniek MDCK po 30 až 60 minútovej infekcii 24 až 48 hodinovej monovrstvy v minimálnom esenciálnom médiu podľa Eaglea pri teplote 36 až 38 °C po dobu 3 až 6 dní, až do vytvorenia cytopatických zmien a potom sa vírusový materiál zmieša s lyofilizačným médiom na obsah minimálne $10^{2,5}$ TKID₅₀ . ml⁻¹, a táto zmes sa lyofilizuje.

5. Spôsob výroby vakcíny podľa bodu 4 vyznačujúci sa tým, že sa lyofilizačné médium pridáva k vírusovej suspenziám bezprostredne po ich získaní a zmes sa uchováva až do lyofilizácie v zmrazenom stave, alebo sa lyofilizuje okamžite.

1 výkres

A

B

C

