



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

267 937

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
A 61 K 39/295

(21) PV 6132-87.E
(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 parvoviróze, psinke, infekčnej laryngotracheitide, infekčnej hepatitide a parainfluenze 2, a spôsob jej prípravy

(57) Riešenie sa týka živej atenuovanej vakcíny proti parvoviróze, psinke, infekčnej laryngotracheitide, infekčnej hepatitide a parainfluenze 2 a spôsobu jej prípravy na bunkových kultúrach. Vakcína je určená na ochranné očkovanie psov a mäsožravých kožušinových zvierat proti uvedeným infekciám. Vakcína je lyofilizovaná a vyznačuje sa tým, že obsahuje v 2 ml najmenej 10^5 TKID₅₀ častíc parvovírusu psov, kmeňa CPVA BN 80/82 CAPM V-290, 10^5 TKID₅₀ častíc vírusu psinky, kmeňa CDV-F-BN 10/83 CAPM V-289, $10^{4,5}$ TKID₅₀ častíc vírusu infekčnej laryngotracheitídy, kmeňa CADV-2 H-5/85 MDCK40 CAPM V-320 a $10^{4,5}$ TKID₅₀ častíc vírusu parainfluenzy 2, kmeňa CPIV-2 BN4/85/32 CAPM V-321 adaptovaných na bunkové kultúry. Kmeň vírusu infekčnej laryngotracheitídy sa pomnožuje na stabilnej línii buniek MDCK v minimálnom esenciálnom médiu podľa Eaglea a kmeň vírusu parainfluenzy 2 na bunkách línii FE a MDCK v minimálnom esenciálnom médiu podľa Eaglea. Po ukončení kultivácie sa vírusové materiály miešajú s lyofilizačným médiom a lyofilizujú.

Vynález sa týka živej, atenuovanej vakcíny proti parvoviróze, psinke, infekčnej laryngotracheitíde, infekčnej hepatitíde a parainfluenze 2, a spôsobu jej prípravy na bunkových kultúrach.

Popri všeobecne známých pôvodcoch vírusových ochorení psov ako sú besnota, psinka a infekčná hepatitída, spoľahlivo kontrolovaných efektívnymi atenuovanými vakcínami existuje celý rad rusov, ktoré sú pôvodcami častých ochorení zažívacích a dýchacích orgánov. K týmto v prvom rade patria: parvovírus psov, pôvodca akútneho črevného ochorenia postihujúceho prevažne mláďatá, vírus infekčnej laryngotracheitídy 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 parvovírusu psov /CPV 2/ a označil ho ako pôvodcu epizootie črevného ochorenia, ktoré sa objavilo prvýkrát v roku 1978 v USA. 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 adenovírus sérotypu 2 /CADV-2/, izolovaný a identifikovaný DITSCHFIELDOM, 1962 je sérologicky, antigénne, svojím tropizmom a klinickým prejavom ochorenia odlišný od vírusu infekčnej hepatitídy psov /ICH/.

Hemaglutinujúci vírus parainfluenzy 2 /CPIV-2/, postihujúci respiračný trakt izoloval BINN v roku 1967. Pre svoju antigénnu podobnosť s opičím vírusom SV5 dostal označenie SV5-like canine parainfluenza virus.

Ochorenia vyvolané týmito vírusmi majú charakter infekčnej laryngotracheitídy, tracheobronchitídy, zápalu nosofaryngu a pľúc s klinickými prejavmi nádchy, spontánneho kašľa zapríčineného zúžením priechodnosti priedušiek a pľúcnej hyperventilácie doprovádzanej zväčšením bronchiálnych lymfatických uzlín. Patologicko-anatomický obraz charakterizuje infiltrácia submukózy lymfocytami, plazmatickými bunkami a neutrofilmi, proliferatívna intersticiálna pneumónia, nekrotizácia bronchov a bronchiolitída. Pri infekcii vírusom CADV-2 sa zisťujú vnútrojadrové inklúzie lokalizované v epitelálnych 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^R7, NOBI^R VAC-SH, ENDURACELL^R7 - HSR, 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 Kombinationimpfstoffes für Hunde, Zygraich, N. - Charlier, P. - Florent, G. - Gill, 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.

Blízku antigénnu príbuznosť vírusov infekčnej laryngotracheitídy /CADV 2/ a infekčnej hepatitídy /CADV 1 Rubarttova choroba/ potvrdil Fairchild, G.A. - Cohen, D., Serologic study of a Canine Adenovirus /Toronto A26/62/ infection in dogs, Am.J.Vet.Res.,

Vol.30 No. 6, 1968 p. 923-928, a Appel, M. - Bistner, S.I. - Menegus, M. - a spol. Pathogenicity of low virulence strains of two canine adenovirus types, Am.J.Res., 34 1973, p.543-550. Preto očkovanie vnímavých zvierat atenuovanými kmeňmi vírusu infekčnej laryngotracheitidy vyvoláva cestou sérových protilátok spoľahlivú ochranu proti prirodzenej alebo experimentálnej infekcii kmeňmi CADV-1. Emmerly, J.B. - House, J.A. - Brown, W.R. - Cross-protective immunity to canine adenovirus type 2 by canine adenovirus type 1 vaccination, Am. J.Vet. Res., Vol.39 No.11 1978 p.1778-1783. Marusyk už v roku 1972 poukázal na skutočnosť, že očkovanie vírusom infekčnej laryngotracheitidy spoľahlivo chráni proti infekcii vírusom infekčnej hepatitidy, ale naopak, očkovanie vírusom infekčnej hepatitidy nechráni zvieratá pred ochorením vyvolaným vírusom infekčnej laryngotracheitidy Marusyk, R.G., Comparison of the immunological properties of two canine adenoviruses, Canadian J.Microbiol., Vol.18 1972 p-817-823.

Vzhľadom na všeobecný výskyt parvovírózy psov a narastajúci počet respiračných ochorení, pri vylúčení účinku vírusov psinkového komplexu, postavili sme si za cieľ získať alebo izolovať odpovedajúce vírusové kmene s perspektívou použiť ich na prípravu očkovacích látok. Jednotlivé izoláty vírusov parainfluenzy 2, infekčnej laryngotracheitidy a parvovírusu sme cestou chemických, sérologických a virologických metód identifikovali, klonovali, potvrdili ich puritu a elektrónopticky znázornili. Po ukončení atenuácie jednotlivých vírusov na rôznych druhoch bunkových kultúr, overení ich neškodnosti na vnímavých zvieratách a na základe literárnych údajov Lynna, R.C., How to control canine infectious trachobronchitis through vaccination, Vet.Med., June 1986 p.544-550, a i. sme pristúpili k vývoju živej atenuovanej vakcíny proti parvovíróze, psinke, infekčnej laryngotracheitide, infekčnej hepatitide a parainfluenze 2.

Na vysoké riziko vzniku postvakačných reakcií charakterizovaných uveitídou, intersticiálnou pneumóniou, prípadne ložiskovou intersticiálnou nefritídou po očkovaní atenuovanými vakcínami s kmeňmi CADV vírusu infekčnej hepatitidy upozornili Appel, M. - Carmichael, L.E. - Rybison, D.S., Canine adenovirus type 2 induced immunity to two canine adenoviruses in pups with maternal antibody, Am.J.Vet.Res., 36 1975 p.1199-1202, a Powell, K.W., Use of canine adenovirus type 2 vaccine to control kennel cough syndrome. Vet.Med.Small Anim. Clin., 74, 1979, p.801-804.

Bola pripravená živá atenuovaná vakcína proti parvovíróze, psinke, infekčnej laryngotracheitide, infekčnej hepatitide a parainfluenze 2, lyofilizovaná, ktorá obsahuje 2 ml najmenej 10^3 TKID₅₀ častíc vírusu psinky, kmeň CDV-F-BN 10/83 CAPM V-289; $10^{2,5}$ TKID₅₀ častíc vírusu infekčnej laryngotracheitidy, kmeň CADV 2 H-5/85 MDCK40 CAMP V-320; a $10^{4,5}$ TKID₅₀ častíc vírusu parainfluenzy 2 psov, kmeň CPIV-2 BN4/85/32 CAMP V-321.

Vírusový kmeň parvovírusu psov s označením CPVA-BN 80/82 a zbierk. č. CAPM V-290 bol adaptovaný na kultúry buniek stabilnej mačacej línie FE. Ako rastové médium bolo použité minimálne esenciálne médium podľa Eaglea obohatené o boviné 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 médium tak, aby obsahoval minimálne 10^4 TKID₅₀.ml⁻¹. Uvedený vírusový kmeň sme získali z pôvodne virulentného vírusu izolovaného z infekčných materiálov cestou sériových pasáží na mačacej línii označenej FE. Homogenita vírusovej populácie a stabilita imunobiologických vlastností sa dosiahla izolovaním línie metódou hraničných riedení so šesťnásobným opakovaním.

Vírusový kmeň psinky s označením CDV-F-BN 10/83 a zbierkovým č. CAPM V-289 bol adaptovaný na primárne, alebo sekundárne kultúry pripravené z kuracích zárodkov a na kultúry stabilnej bunkovej línie opičích ľadvín VERO. Ako rastové médium bolo použité minimálne esenciálne médium podľa Eaglea obohatené o boviné sérum, v ktorom sa vírus

pomnožoval pri teplote 36 až 38 °C po dobu 24 až 48 h, t.j. do vytvorenia monovrstvy na kultivačnom povrchu. Potom sa rastové médium vymenilo za udržiavacie minimálne esenciálne médium podľa Eaglea, v ktorom sa vakcinačný vírus produkoval pri teplote 36 až 38 °C po dobu 5 až 9 dní. Po vytvorení zreteľných cytopatických zmien sa vírusový materiál zmiešal s lyofilizačným médiom tak, aby obsahoval minimálne 10^4 TKID₅₀ . ml⁻¹.

Vakcinačný kmeň vírusu psinky bol vyšľachtený z vírusu psinky, kmeňa Onderstepoort, atenuovaného cestou sériových pasáží na chorioalantoických blanách kuracích zárodokov, jeho adaptovaním na bunkové kultúry pripravené z kuracích embryí a na bunkové kultúry stabilnej línie opičích ľadvín VERO, s následnou selekciou línie vírusu vyznačujúcej sa vysokou imunizačnou účinnosťou veľmi dobrými rastovými vlastnosťami na uvedených druhoch tkaniva s vývojom výrazných cytopatických zmien doprevádzajúcich vírusové množenie.

Vírusový kmeň infekčnej laryngotracheitídy s označením CADV-2 H-5/85-MDCK40 s zbierkovým číslom CAPM V-320 bol adaptovaný na kultúry stabilnej línie psích ľadvinových buniek MDCK. Pri pomnožovaní vírusu infekčnej laryngotracheitídy sa bunkové kultúry línie MDCK zbavené rastového média infikovali uvedeným vakcinačným kmeňom, pri multiplicitate infekcie 0,1 až 0,01 a po adsorpcii vírusu na bunky zaliali minimálnym esenciálnym médiom podľa Eaglea. Infikované kultúry sa infikovali pri 36 až 38 °C počas 3 až 5 dní. Po vytvorení zreteľných cytopatických zmien sa vírusový materiál zmiešal s lyofilizačným médiom tak, aby obsahoval minimálne $10^{2,5}$ TKID₅₀ . ml⁻¹.

Vírus infekčnej laryngotracheitídy 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.

Vírusový kmeň parainfluenzy 2 psov s označením CPIV-2 BN4/85/32 a zbierkovým číslom CAPM V-321 bol adaptovaný na kultúry stabilnej línie psích ľadvinových buniek MDCK a na kultúry stabilnej mačacej línie FE. Ako rastové médium bolo použité minimálne esenciálne médium podľa Eaglea obohatené o boviné sérum, v ktorom sa vírus pomnožoval pri teplote 36 až 38 °C po dobu 4 až 7 dní. Rast vírusu na 1. FE je doprevádzaný zreteľných cytopatických zmien bunkového monolayeru. Získané infekčné tkanivové tekutiny obsahujú 16 až 128 hemaglutinačných jednotiek v 0,05 ml a infekčný titer predstavuje 10^6 až $10^{7,5}$ TKID₅₀ . ml⁻¹. Po ukončení inkubácie sa vírusový materiál zmiešal s lyofilizačným médiom tak, aby obsahoval minimálne $10^{4,5}$ TKID₅₀ . ml⁻¹. Primoizolát pomnožený v amniových dutinách 10 dňových kuracích zárodokov z vajec SPF, sme adaptovali na kultúry embryonálnych buniek s stabilné bunkové línie FE a MDCK. Homogenita vírusovej populácie a stabilita imunobiologických vlastností atenuovaného kmeňa sa dosiahla metódou hraničných riedení v 32. tkaninovej pasáži.

Vírusové kmene parvovírusu psov CPV-BN 80/82 CAPM V-290, psinky CDV-F-BN 10/83 CAPM V-289, infekčnej laryngotracheitídy CADV-2 H-5/85 MDCK40 CAPM V-320 a parainfluenzy 2 CPIV-2 BN4/85/32 CAPM V-321 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 parvovirózy 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 multiplicitate 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 sH 6,8 až 7,3 a prípravkom piatich až deviatich hmotnostných percent bovinného séra s vyznačenou kvalitou.

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

Takto pripravená suspenzia buniek za účelom prípravy vakcíny 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.

Možná je tiež 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 vakcinačného 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.

Spôsob infekcie buniek kuracích embryonálnych fibroblastov KEB a buniek línie VERO vírusom psinky:

Bunkové kultúry KEB alebo VERO sa infikujú vakcinačným kmeňom vírusu psinky pri multiplicitate infekcie najmenej 0,005. Infikujú sa 24 až 48 hodín bunky narastené na kultivačnom 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 hydrouhľočitánu sodného na 0,1 až 0,2 hmotnostných percent.

Alebo sa zmes vírusu a buniek nechá inkubovať počas 60 až 120 minút pri 37 °C, potom sa suspenzia buniek nariedi v rastovom médiu tak, aby obsahovala 4 až 8 $\cdot 10^6$ ml buniek v rastovom médiu.

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 h/ 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 postihnuté vírusšpecifickými zmenami a vírusová suspenzia sa zbiera len jednorázovo.

Spôsob infekcie buniek MDCK vakcinačným vírusom infekčnej laryngotracheitídy:

Bunkové kultúry sa infikujú vakcinačným kmeňom vírusu infekčnej laryngotracheitídy pri multiplicitate infekcie 0,1 až 0,001. Infikujú sa 24 až 48 hodinové bunkové kultúry narastené na kultivačnom 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 vymeniť, 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 postihnuté vírus-spezifickými zmenami.

Spôsob infekcie buniek FE alebo buniek MDCK vakcinačným vírusom parainfluenzy 2 psov:

Suspensia buniek FE alebo buniek MDCK o hustote 5 až $10 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ v rastovom médiu sa zmieša s vakcinačným vírusom pri multiplicitate infekcie od 0,001 do 0,01. Zmes vírusu a buniek sa inkubuje pri 36 až 38 °C počas 30 až 60 minút, potom sa nariedi v rastovom médiu, ktoré pri oboch bunkových liniách predstavuje minimálne médium podľa Eaglea s pH 6,8 až 7,3 a prídavkom piatich až desiatich hmotnostných percent bovinného séra.

Rovnako je možné do bunkovej suspenzie v rastovom médiu pridať inokulum vakcinačného vírusu o multiplicitate infekcie 0,001 až 0,01 a túto ihneď vyliať do kultivačnej nádoby. Inkubácia pokračuje pri 36 až 38 °C počas 4 až 7 dní. Rast vírusu na linii FE je doprevádzaný vývojom zreteľných cytopatických zmien bunkového monolayeru.

Po ukončení kultivácie sa infekčné tekutiny jednotlivých vírusov zmiešajú 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 $10^4 \text{ TKID}_{50} \cdot \text{ml}^{-1}$ častíc vírusu CPVA-BN 80/82 CAMP V-290, 10^4 TKID_{50} častíc vírusu CDV-F-BN 10/83 CAMP V-289, 10^3 TKID_{50} častíc vírusu CADV-2 H-5/85 MDCK40 CAMP V-320 a 10^5 TKID_{50} častíc vírusu CPIV-2 BN4/85/32 CAMP V-321, bakteriologicky sterilné. Takto pripravené vírusové suspenzie zmiešané v pomere 0,5 dielu parvovírusu + 1 diel vírusu psinky + 1 diel vírusu infekčnej laryngotracheitidy + 1 diel vírusu parainfluenzy 2 s lyofilizačným médiom, ktoré obsahuje sacharózu, fosforečnanový pufor, glutamát sodný alebo draselný, bovinný albumín 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 forme homogenizátu rozplňujú do ampuliek alebo liekoviek, lyofilizujú, vzduchotesne uzatvoria a uchovávajú pri chladničkovej teplote. Vakcína pripravená podľa uvedeného postupu obsahuje v jednej aplikáčnej dávke najmenej 10^3 TKID_{50} vírusu psinky, $10^{2,5} \text{ TKID}_{50}$ vírusu infekčnej laryngotracheitidy a $10^{4,5} \text{ TKID}_{50}$ vírusu parainfluenzy 2, čo predstavuje jednu imunizačnú dávku.

Príklad 1

Spôsob kultivácie:

Suspensie buniek FE, MDCK, VERO, pripravené pomocou proteolytických fermentov a suspenzia buniek kuracích embryonálnych 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 šťacionárnym spôsobom a v suspenzii.

Príklad 2

Spôsob infekcie bunkových kultúr vakcinačným vírusom parvovírusu psov:

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

- a/ Suspenzia buniek línie FE o hustote $10 \cdot 10^6$ buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$ v rastovom médiu sa zmieša s vakcinačným 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 hmotnostných percent bovinného séra.
- b/ Do suspenzie buniek línie FE o hustote $5 \cdot 10^5$ $\cdot \text{ml}^{-1}$ v rastovom médiu sa pridá inokulum vakcinačného vírusu o multiplicitate 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 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.

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 stanovených mikroskopicky sa kultivácia ukončí a do kultivačného média s pomnoženým vírusom sa pridá priamo do kultivačných nádob 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 najmenej 0,005 nasledovnými spôsobmi:

a/ Infekcia narastenej jednovrstvy buniek KEB:

Z monovrstvy buniek sa po 24 hodinovom raste odstráni rastové médium a bunková kultúra sa infikuje inokulum pridaným do udržovacieho média, ktorým sa nahradí rastové médium.

b/ Suspenzia buniek v rastovom médiu s hustotou $10^7 \cdot 10^{-1}$ buniek sa zmieša s inokulum vakcinačného vírusu a zmes inkubuje pri 37°C počas 30 minút, po ukončení infekcie sa infikovaná suspenzia buniek nariedi v rastovom médiu tak, aby obsahovala $4 \cdot 10^5$ $\cdot \text{ml}^{-1}$ buniek v 1 ml a kultivuje sa pri 37°C 48 hodín, t.j. až do vytvorenia úplnej jednovrstvy buniek na kultivačnom povrchu. Potom nasleduje výmena rastového média za udržovacie.

c/ Do bunkovej suspenzie KEB v rastovom médiu a hustotou $4 \cdot 10^5$ $\cdot \text{ml}^{-1}$ sa pridá inokulum vakcinačného vírusu. Suspenzia sa ihneď vyleje do kultivačnej nádoby a inkubuje sa pri 37°C počas 24 hod. t.j. až do vytvorenia jednovrstvy buniek. Potom nasleduje výmena rastového média za udržovacie.

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

a/ Udržovacie médium sa ponechá bez výmeny na kultúrach až do vytvorenia rozsiahlych cytopatických zmien stanovených mikroskopicky. Do udržovacieho média s vírusom sa pridá priamo do kultivačných nádob 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 udržovacie médium zleje a do kultivačných nádob naleje rovnaké množstvo udržovacieho média. Postup sa opakuje v 24 hodinových intervaloch až do vytvorenia rozsiahleho cytopatického efektu, kedy sa konečné ošetrenie vykoná podľa bodu a/. Do vírusovej suspenzie získanej pri opakovaných výmenách udržovacieho média sa bezprostredne po zliatí pridá lyofilizačné médium a ďalej sa uchováva v zmrazenom stave.

Príklad 4

Spôsob infekcie bunkových kultúr vakcinačným vírusom infekčnej laryngotracheitidy:

Bunkové kultúry pripravené a pestované podľa bodu 1. sa infikujú vakcinačným vírusom CADV-2 H-5/85 MDCK40 pri multiplicité infekcie najmenej 0,01 nasledovnými spôsobmi:

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

b/ Do bunkovej suspenzie v rastovom médiu s hustotou $4 \cdot 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 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 udržovacie a inkubácia pokračuje pri 37 °C počas 2 dní. Množenie vírusu je v oboch prípadoch sprevádzané výraznými cytopatickými zmenami bunkovej jednovrstvy. Vakcinačný vírus 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 lyofilizačné médium v pomere 2 diely vírusovej suspenzie a jeden diel lyofilizačného média. Zmes sa ďalej uchováva v kultivačných nádobách v zmrazenom stave.

Príklad 5

Spôsob infekcie buniek FE a MDCK vakcinačným vírusom parainfluenzy 2:

Bunkové kultúry pripravené a pestované podľa bodu 1 sa infikujú vakcinačným vírusom CPIV-2 BN4/85/32 pri multiplicité infekcie najmenej 0,001 nasledovnými spôsobmi:

a/ Suspenzia buniek línie FE o hustote $10 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ v rastovom médiu sa zmieša s vakcinačným vírusom pri multiplicité infekcie 0,01. 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 a 5 hmotnostných percent bovinného séra.

b/ Do suspenzie buniek MDCK o hustote $5 \cdot 10^5 \text{ ml}^{-1}$ v rastovom médiu sa pridá inokulum vakcinačného vírusu o multiplicité infekcie 0,01 a infikovaná suspenzia sa ihneď vyleje do kultivačnej nádoby. Takto pripravená suspenzia buniek za účelom prípravy vírusu sa kultivuje pri teplote 37 °C počas 5 dní. Množením vírusu na bunkách FE je sprevádzané zreteľnými cytopatickými zmenami bunkovej jednovrstvy.

Vakoinačný vírus sa produkuje v rastovom médiu na bunkových kultúrach FE a MDCK pestovaných podľa bodu 1. a infikovaných podľa bodu 5. Po ukončení kultivácie sa do kultivačného média s pomnoženým vírusom pridá priamo do kultivačných nádob lyofilizačné médium v pomere 2 diely vírusovej suspenzie a jeden diel lyofilizačného média. Zmes sa ďalej uchováva v kultivačných nádobách v zmrazenom stave.

Príklad 6

Príprava kombinovanej vakcíny:

Na prípravu lyofilizovanej vakcíny sa použijú infekčné tekutiny s obsahom minimálne 10^4 TKID₅₀. ml⁻¹ častíc vírusu CPVA-BN80/82, 10^4 TKID₅₀. ml⁻¹ častíc vírusu CDV-F-BN 10/83, 10^3 TKID₅₀ častíc vírusu CADV-2 H-5/85 MDCK40 a 10^5 TKID₅₀. ml⁻¹ častíc vírusu CPIX-2 BN4/85/32; bakteriologicky sterilné. Takto pripravené vírusové suspenzie sa zmiešajú v pomere 0,5 dielu parvovírusu a 1 diel vírusu psinky a 1 diel vírusu infekčnej laryngotracheitidy a 1 diel vírusu parainfluenzy 2. Homogenizovaný vírusový materiál s požadovaným obsahom infekčných jednotiek sa adjustuje, lyofilizuje, vzduchotesne uzatvorí a uchováva pri chladničковой teplote.

Vakcína pripravená podľa uvedeného postupu obsahuje v jednej aplikačnej dávke najmenej 10^3 TKID₅₀ parvovírusu psov, 10^3 TKID₅₀ vírusu psinky, $10^{2,5}$ TKID vírusu infekčnej laryngotracheitidy a $10^{4,5}$ TKID₅₀ vírusu parainfluenzy 2 v jednej vakcínačnej dávke.

Dôkaz účinnosti kombinovanej vakcíny:

Porovnanie účinnosti živej atenuovanej vakcíny proti parvoviróze, psinke, infekčnej laryngotracheitide, infekčnej hepatitide a parainfluenze 2 s účinnosťou monovalentnej vakcíny proti parvoviróze, bivalentnej vakcíny proti parvoviróze a psinke a bivalentnej vakcíny proti infekčnej laryngotracheitide a parainfluenze 2 ukončené na vnímavých šteniatách vyjadrujú obrázky 1 a 2. Uvedené hodnoty, zobrazené graficky predstavujú priemerné titry hemaglutinačne-inhibičných /HI/ protilátok proti parvovírusu, vírusu infekčnej laryngotracheitidy a vírusu parainfluenzy 2, a vírus-neutralizačných protilátok /VN/ proti vírusu psinky. Z predložených výsledkov je zrejmé, že po očkovaní polyvalentnou vakcínou boli proti očakávaniu zisťované hodnoty špecifických protilátok na rovnakej úrovni, alebo vyššie ako po aplikácii mono. resp. bivalentných vakcín. Navodenie takejto imunitnej odpovede sa nepredpokladalo a nebolo doposiaľ zistené.

Z výsledkov tabuľky 1 vidieť, že vakcinované ani kontrolné zvieratá nereagovali na infekciu terénnym kmeňom parvovírusu psov zaznamenanou poruchou zdravotného stavu. Tieto nálezy sú v súlade s údajmi autorov McAdaragh, J.P. - Eustis, S.L. - Nelson, D.T. - a spol., Experimental infection of conventional dogs with canine parvovirus. A. J. Vet. Res., Vol 43 No.4, 1982 p.693-696; Pollock, R.V.H. - Carmichael, L.E., Dog response to inactivated canine parvovirus and feline panleukopenia virus vaccines. Cornell Vet. 1982, 72, 16-35 a i., že infekcia vnímavých zvierat terénnymi kmeňmi psieho parvovírusu ostane bez preukazného klinického prejavu. Po infekcii virulentným vírusom psinky ostali zdravé všetky vakcinované zvieratá, tým z dvoch kontrolných zvierat jedno uhynulo a druhé vykazovalo charakteristické príznaky psinkového ochorenia. Výsledok čelenie vakcinovaných zvierat vírusom parainfluenzy 2 je charakteristický pre infekciu konvenčných zvierat týmto vírusom, ktorého patogenita je determinovaná účasťou ďalších infekčných činiteľov na vzniku choroby.

Pri úplnej chránenosti vakcinovaných zvierat na infekciu vírusom infekčnej laryngotracheitidy, reagovali obidve kontroly predchodným ale zjavným ochorením dýchacích ciest.

Rovnako ostali klinicky zdravé všetky vakcinované zvieratá infikované vírusom infekčnej hepatitidy, čo je prejavom blízkych antigénnych vzťahov obidvoch vírusov a krížovej chránenosti zvierat očkovaných vírusom infekčnej laryngotracheitidy proti infekcii vi-

rusom infekčnej hepatitidy. Obidve nevakcinované kontroly reagovali na infekciu vývo-
jom klinických príznakov charakteristických pre Rubatthovu chorobu /infekčnú hepatiti-
du psov/.

ZVIERATÁ	INFEKCIA VÍRUSOM	POČET ZVIERAT	VÝSLEDKY		
			bez klin. príznakov	klinicky choré	úhyn
Vakcino- vané	CPV	3	3	0	0
	CDV	3	3	0	0
	CPIV-2	3	3	0	0
	CADV-2	3	3	0	0
	CADV-1	3	3	0	0
Kontroly	CPV	2	2	0	0
	CDV	2	2	1	1
	CPIV-2	2	1	1	0
	CADV-2	2	0	2	0
	CADV-1	2	0	2	0

Tab. č. 1

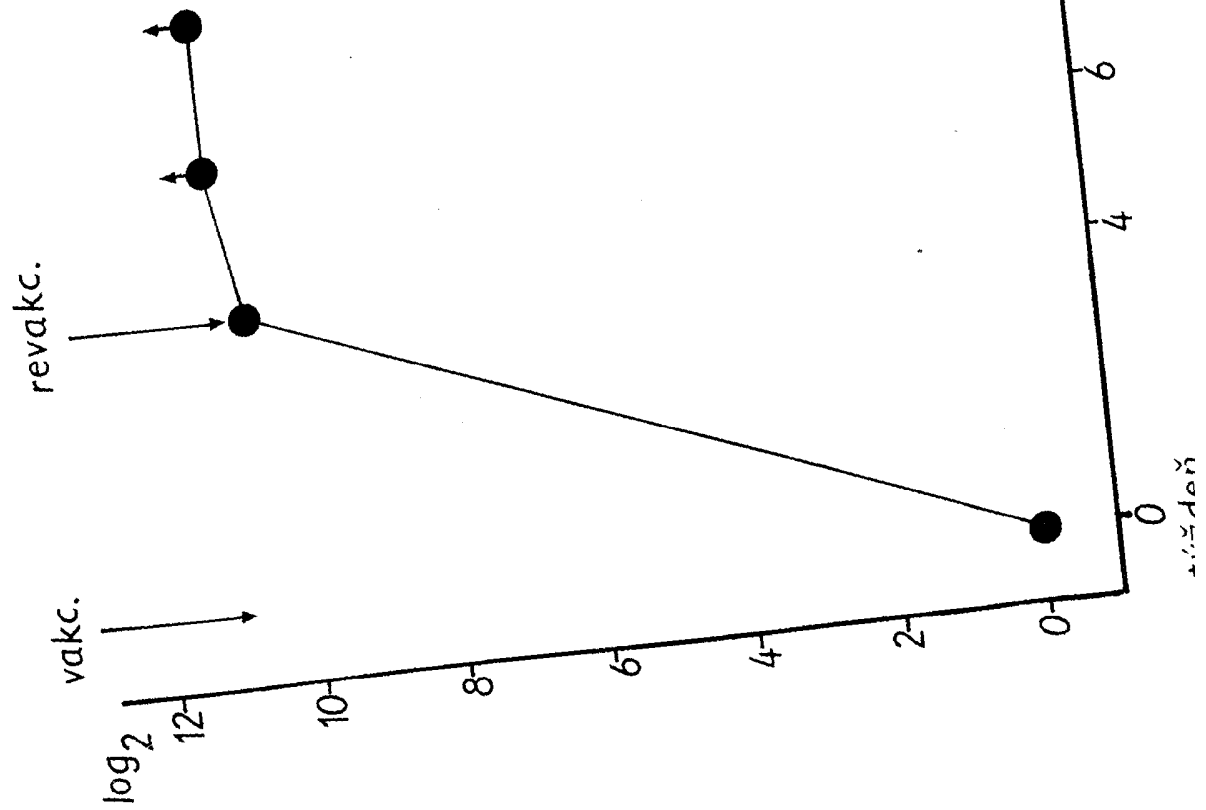
P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Živá atenuovaná vakcína proti parvoviróze s obsahom kmeňa CPVA-BN 80/82 V-290 v množ-
stve 10^3 TKID₅₀, psinky s obsahom kmeňa CDV-F-BN 10/83 CAPM V-289 v množstve 10^3
TKID₅₀, infekčnej laryngotracheitide, infekčnej hepatitide a parainfluenze 2 vyzna-
čujúca sa tým, že obsahuje v 2 ml kmeň parvovirusu 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 množ-
stve najmenej 10^3 TKID₅₀, kmeň vírusu infekčnej laryngotracheitidy CADV-2 H-5/85
MDCK 40 CAPM V-320 v množstve najmenej $10^{2,5}$ TKID₅₀ a kmeň parainfluenzy 2 CPIV-2
BN4/85/32 CAPM V-321 v množstve najmenej $10^{4,5}$ TKID₅₀ častíc vírusu a lyofilizačné
médium.
2. Živá atenuovaná vakcína podľa bodu 1, vyznačujúca sa tým, že obsahuje lyofilizačné
médium v množstve 25 až 50 hmotnostných percent vzťahnuté na hmotnosť celej vakcí-
ny.
3. Živá atenuovaná vakcína podľa bodu 1 a 2 vyznačujúca sa tým, že lyofilizačné médium
obsahuje sacharózu, fosforečnanový pufor, glutamát sodný, alebo draselný, bovinný
albumín alebo iný zdroj bielkovín a želatínu alebo dextrán.
4. Spôsob výroby vakcíny podľa bodu 1 kultiváciou parvovirusu CPVA-BN 80/82 CAPM V-290
a vírusu psinky CDV-F BN 10/83 CAPM V-289 známym spôsobom vyznačujúci sa tým, že sa
kultiváty parvovirusu a vírusu psinky zmiešajú s kultivátom vírusu infekčnej laryn-
gotracheitidy CADV-2 H 5/85 MDCK40 CAPM V-320 získaným pomnožením na stabilnej lí-
nii buniek MDCK po 30 až 60 minútovej infekcii 24 až 48 hodinovej monovrstvy v mi-

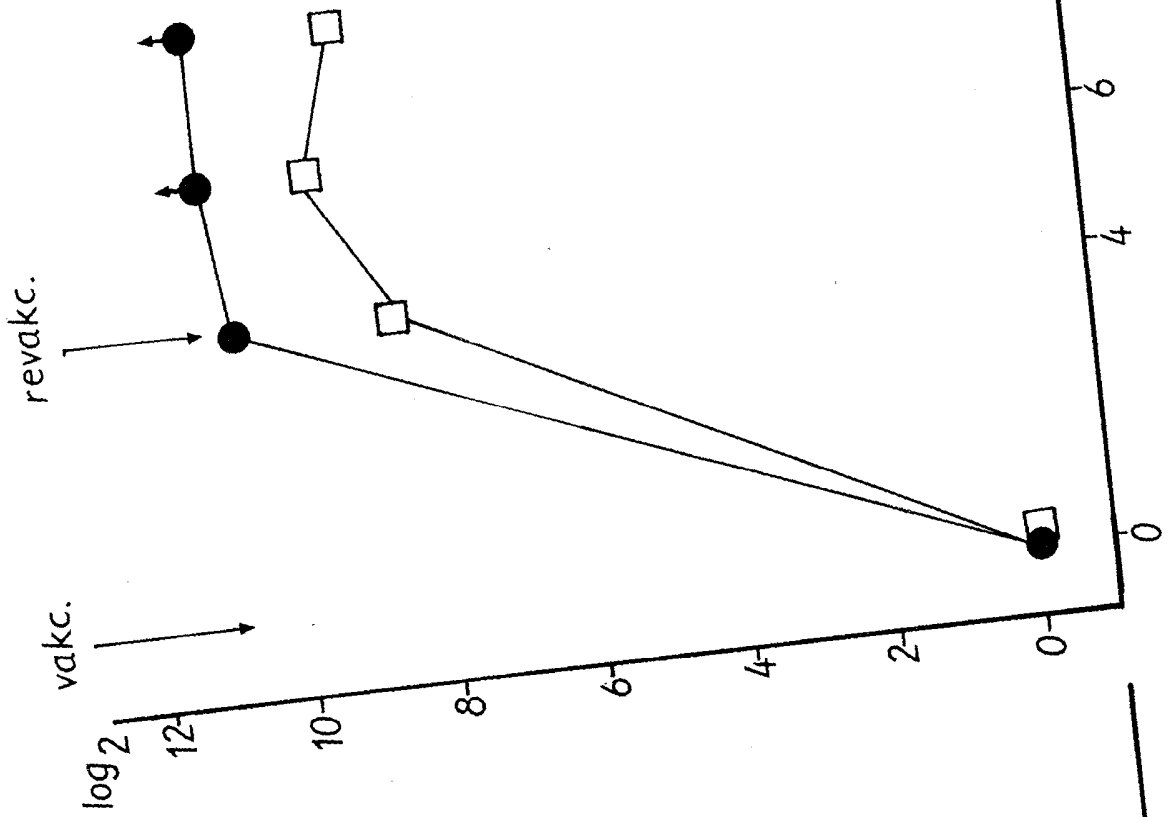
- ... minimálnom esenciálnom médiu podľa Eaglea pri teplote 36 až 38 °C po dobu 3 až 6 dní, až do vytvorenia cytopatických zmien, zmiešaným s lyofilizačným médiom na obsah minimálne 10^3 TKID₅₀. ml⁻¹ a s kultivátom vírusu parainfluenzy 2 psov CPIV-2 BN4/85/32 CAPM V-321 získaným pomnožením na stabilných líniah FE a MDCK v minimálnom esenciálnom médiu podľa Eaglea a pH 6,8 až 7,3 obohatenom o bovinné sérum pri teplote od 36 do 38 °C po dobu 4 až 8 dní doplneným lyofilizačným médiom na minimálne 10^5 TKID₅₀. ml⁻¹ a táto zmes vírusov sa lyofilizuje
5. Spôsob výroby vakcíny podľa bodu 4 vyznačujúci sa tým, že sa lyofilizačné médium pridáva k vírusovým suspenziám bezprostredne po ich získaní a zmes sa uchováva až do lyofilizácie v zmrazenom stave, alebo sa lyofilizuje okamžite.

2 výkresy

A

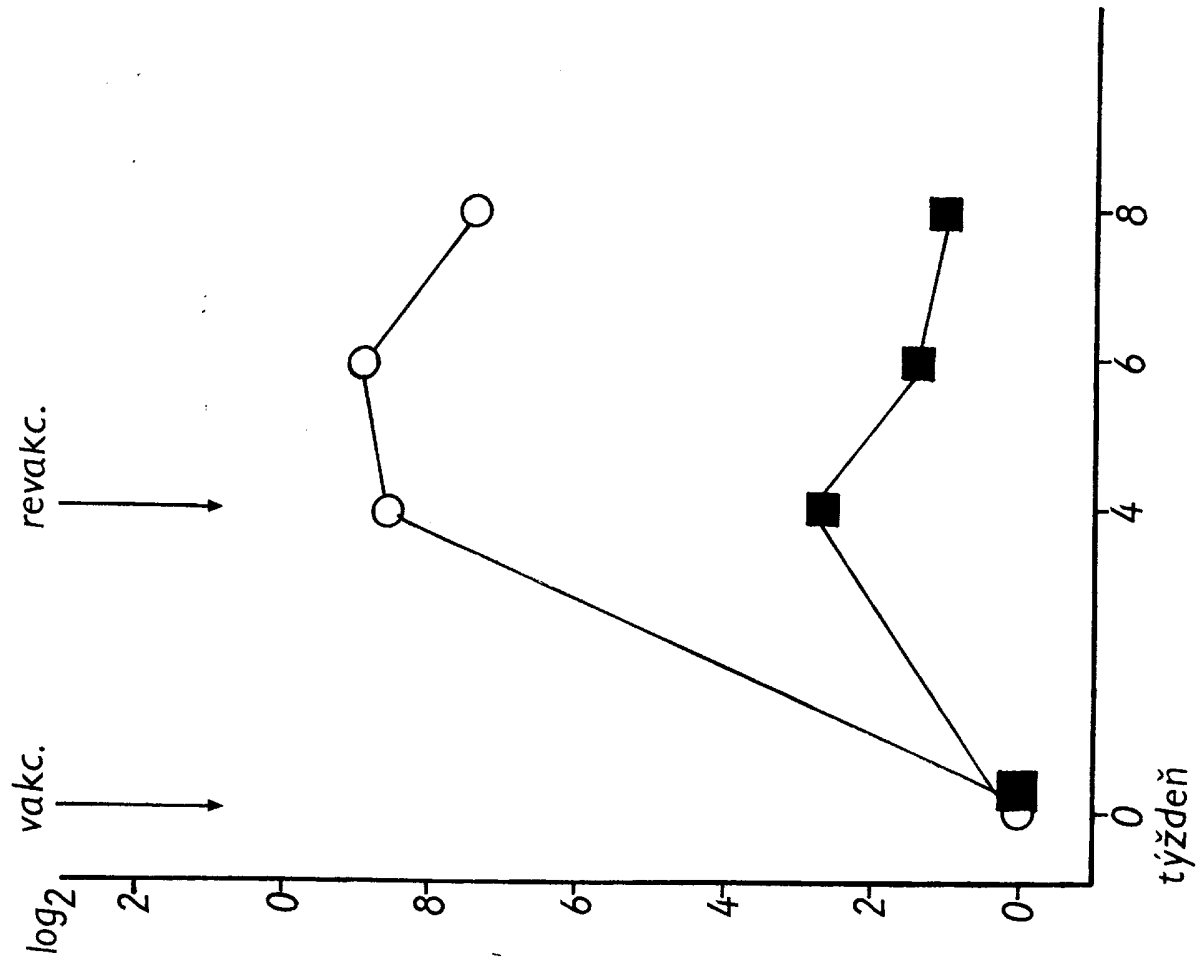


B

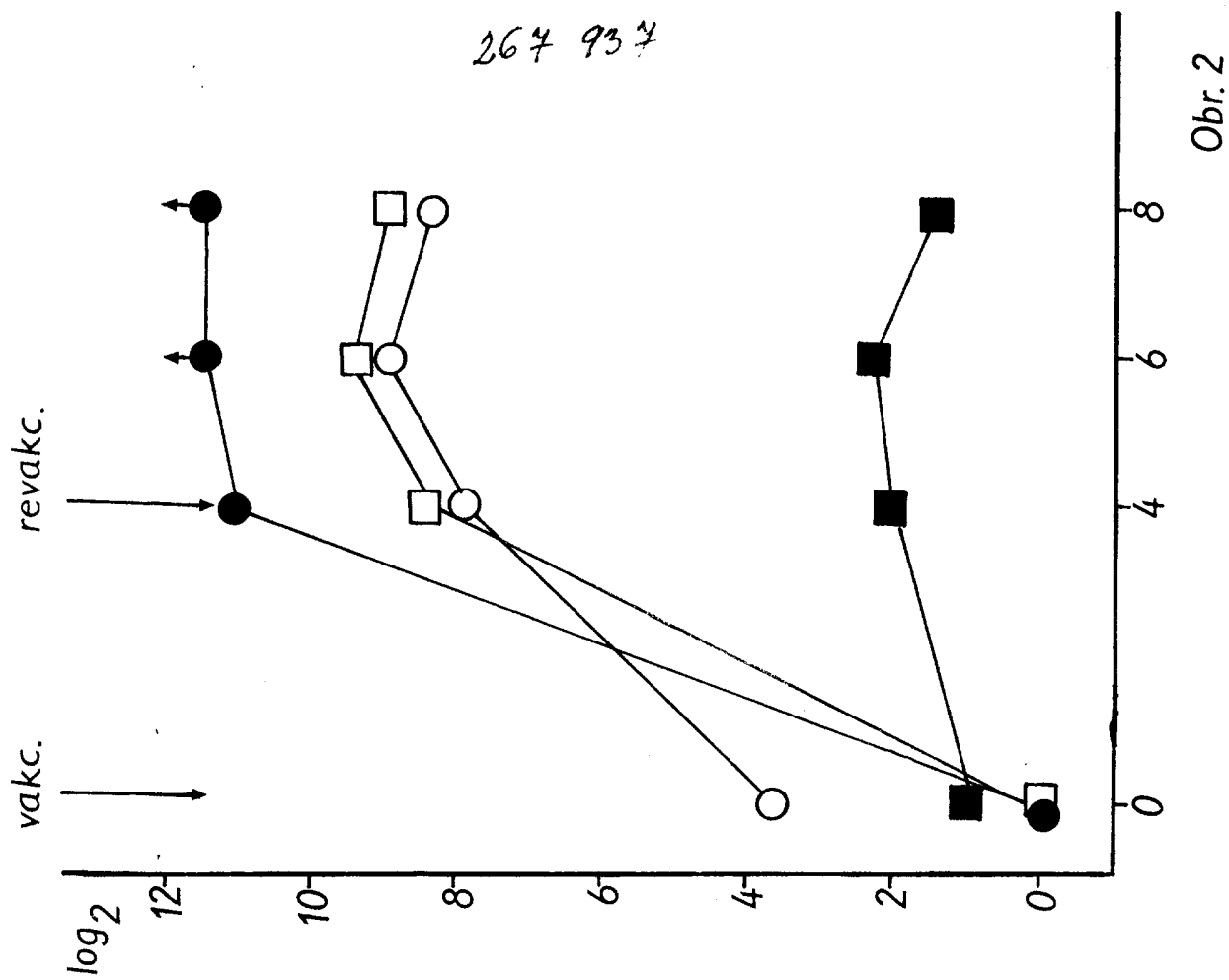


Obr. 1

A



B



264 937