



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

208 289

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlášené 04 07 79
(21) PV 4699-79

(51) Int. Cl.³ A 61 K 39/265
C 12 N 7/00

(40) Zverejnené 31 12 80
(45) Vydané 01 11 81

(75)

Autor vynálezu ŽUFFA ALOJZ doc. MVDr. CSc., NITRA

(54) Avirulentný kmeň vírusu infekčnej bovínnej rhinotracheitídy a pustulárnej vulvovaginitídy a spôsob jeho vyšľachtenia

Vyšľachtenie avirulentného kmeňa vírusu IBR-IPV vhodného pre prípravu živej vakcíny určenej k očkovaní hovädzieho dobytku. Spôsob vyšľachtenia vakcinačného kmeňa spočíva v dlhodobom sériovom pasážovaní vybraného kmeňa vírusu IBR-IPV na primárnych kultúrach z telacích obličiek, jeho adaptovaní na rast na kultúry z jahňacích obličiek a následnom adaptovaní, postupným znižovaním kultivačnej teploty, na rast pri nízkych teplotách, s výhodou pri 30 °C; z takto získaného vírusu sa metódou hraničných riešení so šestnásobným opakovaním izoluje vírusový klón, ktorý sa cestou alternatívnych pasáží adaptuje na rast na králičie obličkové kultúry. Vyšľachtený kmeň poskytuje možnosť prípravy živej vakcíny pestovaním vírusu na dvoch druhoch tkanív, heterológnych vo vzťahu k recipientovi.

Vynález sa týka avirulentného kmeňa vírusu infekčnej bovinnej rhinotracheitídy a pustulárnej vulvovaginitídy /ďalej IBR-IPV/ schopného priemyselnej multiplikácie na viacerých druhoch homologných a heterologných tkanív pre prípravu živej očkovacej látky a spôsobu jeho izolácie.

Účasť vírusu IBR-IPV na vývoji ochorení dýchacích a reprodukčných orgánov hovädzieho dobytku /HD/ je dnes všeobecne známa. Infekcia týmto vírusom postihuje 5 až 20 % celosvetového stavu HD a zapríčiňuje, menovite v podmienkach vysokej koncentrácie zvierat, veľké hospodárske straty. Preto sa trvale vynakladá veľké úsilie na zdokonaľovanie metód špecifickej profylaxie nákazy zapríčinenej týmto vírusom. Doposiaľ boli proti IBR-IPV vyvinuté a používajú sa živé aj inaktivované vakcíny s rozdielnou technológiou ich výroby. Pre prípravu živých vakcín sa používajú kmene, ktorých virulencia bola oslabená dlhodobým pasážovaním na bunkových kultúrach pripravených z homologných /Schwarz A.J.F., York Ch.J., Zirbel L.W., Estela L.A. Modification of Infectious Bovine Rhinotracheitis /IBR/ Virus in Tissue Culture and Development of a Vaccine, Proc. Soc. exp. Biol. Med., 96, 453-458, 1957; Straub O.C., Möglichkeiten zur Bekämpfung der Infektiosen Bovinen Rhinotracheitis /IBR/ Deutsch. Tierärztl. Wschr., 83, 270-273, 1976/, alebo heterologných tkanív /Todd J.D., Volenec F.J., Patton I.M. Intranasal Vaccination Against Infectious Bovine Rhinotracheitis: Studies on Early onset of Protection and Use of the Vaccine in Pregnant Cows, J.Am.Vet.Med. Assoc., 159, 1370-1374, 1971/ alebo pôsobením mutagenov /Zygraich N., Lobmann M., Vascoboinic E., Berge E., Huygelen C. In Vivo and in Vitro Properties of a Temperature Sensitive Mutant of infectious Bovine Rhinotracheitis Virus, Res. vet. Sci., 16, 329-335, 1974/.

Spôsob výroby živých vakcín sa zakladá na pomnožení avirulentného imunogénneho kmeňa na tkanivových kultúrach pripravených z obličiek alebo semeníkov hovädzích plodov alebo narodených teliat, na diploidných bunkových líniiach derivovaných z boviných orgánov /životnosť 30-40 pasáží/, prípadne na bunkových kultúrach pripravených z iných druhov zvierat. Ak sa majú k pomnožovaniu vírusu slúžiaceho pre prípravu živej vakcíny použiť stabilné bunkové línie, musia byť kontrolované na onkogenitu /Perkins P.T., Safety of Vaccines., Brit. Med. Bull. 25, 208-212, 1969., Smith H. The Search for Protective Antigens, Brit. Med. Bull., 25, 126-130, 1969/. Použitie primárnych kultúr pripravených z orgánov boviných plodov alebo narodených teliat pre výrobu živých vakcín je spojené s nebezpečím prenosu infekčných zárodkov menovite vírusovej povahy, ktoré môžu latentne infikovať tieto tkanivá /Miller R.B., Quinn P. J., Observations on Abortions in Cattle: A Comparison of Pathological, Microbiological and Immunological Findings in Aborted Foetuses and Foetuses Collected at Abattoirs, Can. J. Comp. Med., 39, 270-290, 1974., Hubbert W.T., Bryner J.H., Fernelius A.L., Frank G.H., Estes P.C., Viral Infection of the Bovine Fetus and Its Environment, Arch. ges. Virusforsch., 41, 86-98, 1973., Massip A., Wellemaas G., Leunen J., Charleire G., Anticorps Antiviraux dans le serum sanguin de veaux nouveau-nés, Ann.Rech. vété., 5, 397-406, 1974/. Pre vylúčenie prenosu uvedených ako aj ďalších nomenovaných infekcií je treba robiť dokonalú kontrolu očkovacích látok,

ktorá popri tom, že je technicky, odborne a časovo veľmi náročná, nezaručuje istotu odkrytia všetkých latentných vírusových kontaminácií. Je preto veľmi žiaduce použiť pre pomnožovanie atenuovaných kmeňov vírusu IBR-IPV slúžiacich pre prípravu živých vakcín také druhy tkanív, ktoré pri produkcii vírusu do vysokých titrov sú prosté vírusov patogénnych pre HD alebo aspoň nebezpečie prenosu infekcií živou očkovacou látkou významne znižujú. Toto nebezpečie nevylučujú ani línie diploidných buniek, ktoré popri obmedzenej životnosti sú veľmi náročné na kvalitu živných médií a kultivačného skla. Priemyselná produkcia väčších objemov vakcíny z vírusu pomnožovaného na kultúrach z králičích obličiek /Todd J.D., Volenec F.J., Paton I.M., Intranasal Vaccination Against Infectious Bovine Rhinotracheitis: Studies on Early Onset of protection and Use of the Vaccine in Pregnant Cows. J. Am. Vet. Med. Assoc., 159, 1370-1374, 1971/ naráža na obtiaže súvisiace s malou výťažnosťou suspenzie buniek z uvedených orgánov. Spoločnou vlastnosťou jednotlivých kmeňov slúžiacich pre prípravu živých vakcín je, že sa k výrobe používa len jeden definovaný druh tkaniva.

Uvedené nedostatky sú riešené podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v avirulentnom kmeni vírusu IBR-IPV, vykazujúcom výhodné rastové schopnosti na bunkových kultúrach pripravených známym spôsobom z orgánov boviných plodov alebo narodených teliat, jahniat a králikov s obsahom 10^7 až $10^{8,5}$ TKID₅₀ vírusu/ml v infekčných tekutinách z uvedených druhov tkanív, s veľmi dobrými imunologickými vlastnosťami a spôsobe jeho izolácie.

Kmeň BNZ/K 4C uložený v zbierke mikroorganizmov na Výskumnom ústave veterinárneho lekárstva v Brne Medláňkach, Hudcova 60 pod číslom CAPM V-257 bol izolovaný spôsobom podľa vynálezu z virulentného kmeňa IBR - IPV zo zbierky Inst. Nat. Rech. Vet. Brussel Greosselenberg 99 Brussel 18, kde sa nachádza pod označením INRV N 3760 tak, že sa tento najprv prepasážoval 250 krát na primárnych kultúrach z telacích obličiek. Následne bol tento kmeň adaptovaný na bunkové kultúry z jahňacích obličiek, pričom po päťdesiatnásobnom prepasážovaní na uvedenom druhu tkaniva vykazoval rovnaké rastové vlastnosti na kultúrach z jahňacích obličiek ako na boviných obličkových kultúrach. Tento vírus bol, postupným znižovaním kultivačnej teploty a tým selekciou vírusových častíc s dobrými multiplikačnými vlastnosťami pri nízkych teplotách, adaptovaný na rast pri teplotách 28 až 32 °C, s výhodou pri 30 °C. V tejto fáze selekčného procesu sa metódou hraničných riedení so šesťnásobným opakovaním na jahňacích obličkových bunkách izoloval vírusový klón predstavujúci homológnu vírusovú populáciu. Homogenita vírusovej populácie bola dokázaná zachovaním si nezmenených vlastností po desaťnásobnom prepasážovaní vírusu na telacích obličkových bunkách pri 37 °C a nezmenenou virulenciou po piatich sériových i.nas. pasážach na vnímavých teľatách. Takto získaný vírusový klón bol adaptovaný, metódou alternatívnych pasáží na bunkových kultúrach z jahňacích a králičích obličiek, na rast na kultúrach z králičích obličiek, s rastom vírusu pri 30 °C. Kontrolnými testami na teľatách sa dokázalo, že vírus pomnožovaný na všetkých uvedených druhoch tkanív vykazuje rovnaké rastové a imunobiologické vlastnosti ako vírus pomnožovaný na kultúrach z boviných orgánov.

Uvedeným postupom sa získal kmeň, s označením BNZ/K 4C, ktorý má vlastnosti vírusu vhodného pre prípravu živej vakcíny proti IBR-IPV, nakoľko sa vyznačuje stratou virulencie pre hovädzí dobytok rozličného veku pri zachovaní veľmi dobrých imunizačných schopností, pričom z hľadiska priemyselnej produkcie je vhodný najmä v tom, že ho možno pre výrobné účely pomnožovať na kultúrach z boviných obličiek a semeníkov, kultúrach z jahňacích obličiek a semeníkov, kultúrach z králičích obličiek ako aj na líniiach diploidných buniek derivovaných z boviných a ovinných orgánov, čo dovoľuje kedykoľvek produkovať požadované množstvo vírusu deťinovaných imunobiologických vlastností.

Novovyšľachtený kmeň podľa vynálezu BNZ/K 4C CAPM V-257 je rozlišiteľný od východiskového virulentného kmeňa IBR-IPV INRV Brussel N 3760 podľa rastových vlastností zisťovaných na bunkových kultúrach a zvieratách a imunologických vlastností zisťovaných na zvieratách.

Podľa rastových vlastností na bunkových kultúrach sa novovyšľachtený kmeň odlišuje od východiskového virulentného kmeňa schopnosťou množiť sa na kultúrach boviných, jahňacích a králičích obličkových buniek s 10 až 100 násobne vyšším výťažkom vírusu pri inkubácii infikovaných kultúr pri 37 °C. Intranazálna aplikácia východiskového virulentného kmeňa vnímavým teľatám vyvolá množenie vírusu na slizniciach horných dýchadiel s obsahom až 10^7 TKID₅₀/ml nosného sekrétu a pretrváváním infekčnosti sekrétov do 10. až 14. dňa, doprevádzané zápalom až nekrotizáciou nosnej sliznice a poruchou celkového zdravotného stavu charakterizovanou horúčkou, nežravosťou, apatiou a stratou na váhe; množenie vírusu po intranazálnej aplikácii vyselektovaného kmeňa je časovo limitované do 7. až 9. dňa, nevyvolá žiadne alebo len mierne lokálne zmeny charakterizované začervenaním nosnej sliznice a miernym zmnožením nosného výtoku, pričom celkový zdravotný stav zvierat ostane neporušený.

Zvieratá infikované virulentným východiskovým kmeňom vytvoria v krvnom sére neutralizačné protilátky v titroch 1:16 až 1:128, kým zvieratá ošetrované vyselektovaným avirulentným kmeňom len v titroch 1:2 až 1:32.

P r í k l a d p r e v e d e n i a

Virulentný kmeň vírusu IBR-IPV INRV 3760 sa sériovo pasážuje na primárnych kultúrach z boviných obličiek, s použitím bežne zaužívaných laboratórnych metód. Prítomnosť vírusu v tkanivových tekutinách sa na rozličných úrovniach pasážovania kontroluje vývojom vírusšpecifických cytopatických zmien; postup atenuovania virulencie sa kontroluje i.nas. aplikáciou 2-4 ml neriedeného vírusu jedno až štvormesačným teľatám, so zisťovaním obsahu vírusu v nosných sekrétoch, lokálnych zmien, termických a celkových klinických reakcií. Po zistení významného poklesu virulencie vírusu, k čomu dochádza na úrovni 150. až 200. tkanivovej pasáže, sa vírus adaptuje na kultúry z jahňacích obličiek nasledovným spôsobom: jahňacie obličkové bunky narastené v skúmavkách v Earlovom médiu s 2 % boviného fetálneho séra sa infikujú dávkou 0,1 ml vírusu napestovaného na boviných obličkových kultúrach a inkubujú pri 37 °C do 24 h, kým aspoň 50 % buniek monolayera nevykazuje charakteristické vírusšpecifické zmeny.

208 289

Získané infekčné tkanivové tekutiny sa použijú k očkovaniu ďalších skúmkavkových kultúr jahňacích obličiek a v sériovom pasážovaní vírusu na uvedenom druhu tkaniva sa rovnakým spôsobom pokračuje. Tkanivové tekutiny z každej 10. pasáže na jahňacích obličkových kultúrach sa kontrolujú na obsah vírusu titráciami bežným spôsobom na skúmkavkových kultúrach z teľacích obličiek a obsahom vírusu v tekutinách stanoví akumulárnym výpočtom podľa formuly Reeda a Muencha. Pribeh atenuovania virulencie vírusu počas sériového pasážovania sa kontroluje na jedno- až štvormesačných teľatách, ktorým sa i.nas. aplikuje po 4 ml neriedených tkanivových tekutín s obsahom najmenej 10^7 TKID₅₀ vírusu na ml, obsah vírusu v nosných sekrétoch zisťuje titračne 1., 3., 5., 7., 9. a 12. deň, a zvieratá kontrolujú termometricky a klinicky. Po dosiahnutí takého stupňa oslabenia virulencie pasážovaného kmeňa, pri ktorom vyvolá u očkovaných zvierat len mierne zmnoženie nosných sekrétov ktoré si zachovávajú serózný charakter, s pretrváváním infekčnosti sekrétov najdlhšie do 9. dňa, ale nevyvolá poškodenie nosnej sliznice a narušenie celkového zdravotného stavu, s maximálnym zvýšením telesnej teploty o 0,8 °C v období do 14 dní od aplikácie, sa vírus adaptuje na rast pri subnormálnych teplotách. Postupuje sa pritom tak, že infekčné kultúry sa inkubujú najskôr pri 35 °C a v pasážovaní vírusu na skúmkavkových kultúrach sa pokračuje dotiaľ, kým nástup a vývoj cytopatického účinku vírusu až do úplného rozpadu tkaniva neprebehne najneskôr do 72 hod. od infekcie. Potom sa znižuje teplota pri ktorej sa inkubujú infikované skúmkavkové kultúry vždy o 1 °C a rast vírusu posudzuje podľa rovnakých kritérií ako bolo uvedené vyššie. Následne sa uskutoční 10-20 sériových pasáží vírusu pri 30 °C a reziduálna virulencia vírusu testuje na teľatách. Ak vnímavé jedno- až štvormesačné teľatá nereagujú na podanie veľkej dávky vírusu / 10^7 až 10^8 TKID₅₀/ termicky ani klinicky, vírus vykazuje dobré multiplikačné vlastnosti na slizniciach dýchadiel, pričom nosné sekréty sú infekčné najviac do 9. dňa a v krvných sérach sa za dva týždne po aplikácii zistí merateľné množstvo neutralizačných protilátok, izoluje sa z kmeňa čistá línia plakovou technikou alebo metódou hraničných riedení, s aspoň šesťnásobným opakovaním.

Tento vírus sa adaptuje na bunkové kultúry z králičích obličiek a na diploidné bunkové línie derivované z boviných, ovčích alebo králičích orgánov, spôsobom ako bolo uvedené pri adaptovaní vírusu z boviného na ovčie tkanivo. Vírus s dobrými rastovými vlastnosťami na ovčích a králičích kultúrach sa rýchlo adaptuje a do vysokých titrov pomnožuje na uvedených druhoch tkanív. Po prekonaní aspoň piatich priamych pasáží na uvedených druhoch bunkových kultúr, s dosiahnutím titrov najmenej $10^{7,0}$ TKID₅₀/ml infekčného média, sa potvrdí identita vírusu: a/ neutralizáciou infekčnosti monošpecifickým IBR-antisérom pripraveným na králikoch imunizovaných východiskovým virulentným kmeňom alebo niektorým zo zbierkových kmeňov IBR-IPV; b/ pomocou imunofluorescencie ofarbením bunkových kultúr infikovaných kontrolovaným kmeňom špecifickým konjugovaným IBR-imunoglobulínom; c/ intranazálnym očkovaním vnímavých dvoj- až štvormesačných teľiat avirulentným kmeňom v dávke najmenej 10^6 TKID₅₀ so zisťovaním množenia vírusu, vývoja zmien na slizniciach nosa a celkového zdravotného stavu zvierat; d/ stanovením titrov neutralizačných protilátok v krvných sérach teľiat za dva, štyri a šesť

týždňov po intranazálnom očkovaní; e/ dôkazom rezistencie intranazálne očkovaných teliat proti infekcii známym virulentným kmeňom vírusu IBR-IPV.

Kmeň, ktorý u jedno až štvormesačných vnímavých teliat nevyvolá po i.nas. aplikácii v množstve najmenej 10^7 TKID₅₀ vírusu poruchy zdravotného stavu, vykazuje dobré rastové vlastnosti na slizniciach horných dýchadiel /najmenej 10^5 TKID₅₀ vírusu na 1 ml sekrétu na 3.deň po aplikácii/ ale s vylučovaním v nosných sekrétoch najdlhšie do 9. dňa, je vhodný pre prípravu živej vakcíny proti IBR-IPV s možnosťou produkcie vírusu na kultúrach z boviných obličiek a semeníkov, králičích obličiek a na diploidných bunkových líniach derivovaných z boviných a ovčích orgánov.

Novovyšľachtený kmeň podľa vynálezu BNZ/K 4C CAPM V-257 je schopný množiť sa na boviných, králičích a jahňacích obličkových kultúrach a ich subpasáž, ako aj definovaných diploidných bunkách derivovaných z boviných, jahňacích a králičích orgánov. Uvedené vlastnosti kmeňa podľa vynálezu dovoľujú výrobu bezpečnej a účinnej živej IBR-IPV vakcíny, s možnosťou voľby viacerých druhov tkanív pre jej produkciu.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob šľachtenia kmeňa vírusu infekčnej bovinnej rhinotracheitídy a pustulárnej vulvovaginitídy vyznačujúci sa tým, že kmeň vírusu infekčnej bovinnej rhinotracheitídy a pustulárnej vulvovaginitídy INRV 3760 sa najprv 200 až 250 krát pasážuje na primárnych kultúrach telacích obličkových buniek pri teplote 36°C až 37°C a potom 30 až 50 krát na primárnych bunkových kultúrach jahňacích obličiek pri teplote 35°C až 37°C , v ktorom sa pokračuje pri postupnom znižovaní kultivačnej teploty o 1°C na hodnotu 28°C a následne sa pasážuje pri teplote 30°C na primárnych bunkových kultúrach jahňacích obličiek alebo semeníkov a na primárnych bunkových kultúrach králičích obličiek.

2. Avirulentný kmeň vírusu infekčnej bovinnej rhinotracheitídy a pustulárnej vulvovaginitídy BNZ/K 4 C CAPM V-257 so zvýšenou schopnosťou reprodukcie vlastnej vírusovej substancie na tkanivových kultúrach, získaný spôsobom podľa bodu 1.