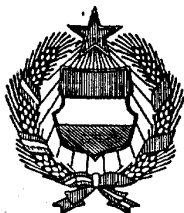


(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

B

(11) 189 222

A bejelentés napja: (22) 83. 02. 03.

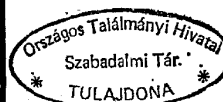
(21) 373/83

A bejelentés elsőbbsége: (33) GB: (32) 82. 02. 05. (31) (82 03400)

A közzététel napja: (41) (42) 1984. 04. 30.

Megjelent: (45) 88.01.30.

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO,
A 61 K 39/215



Feltaláló(k): (72)

BURGER Alois Gregor, vegyész, BL Doorn, DAVELAAR Frans
Gerrit, állatorvos, EG Putten, LÜTTICKEN Heinrich Dieter, vírusku-
tató, CE Boxmeer, NL

Szabadalmas: (73)

Akzo N. V., Arnhem, NL

(54)

ELJÁRÁS ÚJ, FERTŐZŐ BRONCHITIS ELLENI VAKCINA ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány a csirke-eritrocitákat spontán he-
magglutináló fertőző bronchitis vírusokból szár-
mazó új, fertőző bronchitis elleni vakcinákkal és
ezek előállítási eljárásával, valamint az új, a csirke-
eritrocitákat spontán hemagglutináló fertőző bron-
chitis vírus törzsekkel és a tojó-madarak fertőző
bronchitis elleni immunizálásának módszerével
foglalkozik.

A találmány tárgya eljárás új, élő vagy inaktivált, fertőző bronchitis elleni vakcina előállítására.

Egy madár-eredetű korona-vírust tartanak a fiatal és felnőtt csirkék akut, erősen fertőző légúti betegsége okozójának, amely betegséget légcsőzörejek, köhögés, tüsszögés és orrfolyás jellemez. A betegségnek, amelyet fertőző bronchitisnek (FB) neveznek, nagy a halálozási arányszáma, főleg fiatal csirkékben, ezen kívül a vesére és a szaporító traktusra is hathat, az utóbbinak a károsodása a tojástermelés csökkenését eredményezheti tojó- és tenyésztőtyúkoknál. A tojáshozam-csökkenés több esetben bélgyulladásal is társul, amely hasmenésben jelentkezik.

A csirkét tekintik az FB vírus (FBV) egyetlen természetes gazdaszervezetének, de nemrégiben a vírust izolálták pulykákból is. A madár-eredetű FBV-n kívül a pulykák koronavírusos bélgyulladásának okozóját (CET, kékcómb-betegség) írták le, mint egy másik madár-eredetű koronavírus-fajt.

Az FB visszaszorítására a baromfiaknál nagy mennyiségben használnak vakcinákat. A peccsenyecsirkék, a fiatal leendő tojók és tenyésztőtyúkok immunizálása jórészt élő, legyengített vakcinák alkalmazásán alapul. Az élő vakcina vírus törzseket immunogén tulajdonságain kívül antigén spektrumuk és csökkentett patogenicitásuk alapján választják ki. A vakcinákat aszerint írják le, vajon egy meghatározott szerotípust – mind Connecticut (pl. Connecticut Isolate A 5968) vagy Massachusetts (pl. Baudette Type IBV 421) – tartalmaznak, amelyek csak a homológ típus ellen védenek, vagy pedig ezek egy szélesebb antigén-spektrummal bíró meghatározott vírus törzsből – mint pl. H törzsből – származó vakcinák.

A különböző FB szerotípusok kombinálását élő vakcinákban szintén megpróbálták, valószínűleg a kölcsönös interakció eredményeképpen azonban az így nyújtott védelem a megfelelő szerotípusok ellen nem volt optimális. Úgy tűnik tehát, hogy ezeken a gyakran használt FB vírus törzseken, vagy ezek kombinációján alapuló FB vakcinák nem eredményeznek teljes immunizálást az FB kitörése ellen.

A jelen találmány szerinti új FB vakcinák azonban meglepő módon sokkal hatásosabbak a fertőző bronchitis ellen.

Ezek az új vakcinák azzal jellemezhetők, hogy olyan fertőző bronchitis vírusokból származnak, amelyek spontán hemagglutinálják a csirke eritrocitákat.

A csirke eritrocitákat spontán hemagglutináló tulajdonságú FB vírusok találhatók különböző ismert szerotípusok FBV-k között is, pl. Massachusetts típusúak vagy Connecticut típusúak között, de új szerotípusú FBV-k között is.

A csirke eritrocitákat spontán hemagglutináló vírus törzsek immunizáló potenciálja meghaladja az azonos szerotípushoz tartozó, de az eritrocitákat spontánul nem agglutináló vírusok immunizáló potenciálját.

Ezen kívül azt is felfedeztük, hogy a csirke eritrocitákat spontán agglutináló FB vírusok kombinációjából származó FB vakcinák jobb védelmet nyújtanak, mint a csirke eritrocitákat nem agglutináló,

különböző szerotípusokból származó FBV törzsek kombinációján alapuló vakcinák.

Ezen kívül a találmány szerinti FB vakcinák akkor is kiváló immunizáló tulajdonságokat mutatnak, amikor olyan vakcinákkal kombinálják, amelyek egyféle vagy többféle nem-hemagglutináló FB vírust tartalmaznak, valamint akkor is, ha másféle vírusokat tartalmazó vakcinákkal kombinálják, mint pl. a Marek-betegség, New-Castle betegség vagy tojáshozam-csökkentő betegség (egg drop disease) vakcináival.

A találmány szerinti FB vakcinák származhatnak pl. új, csirke-eritrocitákat spontán hemagglutináló tulajdonságú FB vírus törzsekből, amely törzsek a Központi Állatorvosi Laboratóriumban (Central Veterinary Laboratory, New Haw at Weybridge, Nagy-Britannia) VLO 10 110/AVI/3; VLO 10 110/AVI/4; VLO 10 110/AVI/5; VLO 10 110/AVI/6 és VLO 10 110/AVI/7 számon vannak letétbe helyezve, ezek a belső jelölés szerinti D 274, D 1466, D 580, 246 G és 249 G törzseknek felelnek meg.

Az új FBV törzsek különböző szerotípusokhoz tartozóknak mutatkoztak. A 246 G és D 580 törzsek Massachusetts, illetve Connecticut típusúak. A D 274, 249 G és D 1466 törzsek új, eddig le nem írt szerotípusokhoz tartoznak. Az 1. Táblázatban foglaljuk össze a vírus semlegesítési vizsgálat (VN) eredményeit, amelyet tojásban végeztünk, állandó szérumot, hígított vírus módszert használva; az eredmények megmutatják, hogy az új D 274 és D 1466 izolátumok nem tartoznak sem a Massachusetts szerotípusba – amelyet ezekben a kísérletekben a holland H₂ törzsből származó vakcina képviselt –, sem a H törzs vakcinákat magába nem foglaló észak-amerikai FB szerotípusok valamelyikébe. A D 274 hemagglutináló törzset az új D 207 szerotípusba lehet osztályozni, míg a D 1466 törzs a D 212 szerotípusba tartozik. A 249 G törzs ugyanabba a szerotípusba tartozik, mint a D 274 törzs. Ez megmutatkozik a 2. Táblázatban található kereszt-semlegesítési kísérletekből [a csirke-embrió fibroblaszt sejtekben (CEF) mért tarfolt-csökkenési tesztet alkalmazva], a kereszt-semlegesítési kísérleteket az új izolátumok és a különleges patogén-mentes (SPF) csirkék szérumából preparált fajlagos antiszérum között végeztük.

A vakcinálás fontosságát az új D 274, 249 G és D 1466 FBV törzsek ellen illusztrálja ezeknek a szerotípusoknak igen nagy gyakorisága a baromfiudvarokból származó izolátumokban. A 3. Táblázatban található az új szerotípusú FB vírusok elleni antitestekkel rendelkező csapatok számai (3 A) és az a gyakoriság, amellyel a megfelelő szerotípusú FB vírusok izolálhatók voltak a csapatokból (3 B).

Az új vírusok alább következő jellemző tulajdonságai alapján ezek madár-eredetű korona-vírusként voltak meghatározhatók:

1. RNS-típusú nukleinsavakkal rendelkeznek; 5-fluor-dezoxi-uridint a vírus csirke-embrió vese sejt tenyésztéséhez (CEK) adva nem befolyásolja jelentősen a vírus replikációját.

2. A vírusok érzékenyek a zsiroidoszerekre; a fertőzött amnion-allantoisz folyadék (AAF), amely embriót tartalmazó SPF-csirketojásból vírusok

szaporításával nyerhető, kezelése kloroformmal a fertőzési titer jelentős csökkenését okozza. Ez az olyan burokkal ellátott vírusok tulajdonsága, amelyek eszenciális zsírokat tartalmaznak, ez pedig szintén a madár-eredetű korona-vírusokra jellemző.

3. Fertőzött AAF-ből származó, ultra-centrifugában sűrített vírus-készítmény elektronmikroszkópos vizsgálata azt mutatja, hogy a vírus-részecskék alakja és mérete a koronavírusokra jellemző, és jellegzetes kidudorodások (15–20 nm hosszú) találhatók a felületükön. A részecskék átmérője a dudorokat nem számítva 75–120 nm.

4. Gél-diffúziós vizsgálatot alkalmazva kimutatható volt, hogy ezek a vírusok általában tartalmaznak antigént ismert madár-eredetű korona-vírusok ellen, pl. Baudette FBV referencia törzs ellen. Más madár-eredetű vírusok ellen viszont általában nem volt kimutatható antigén.

Az új törzsek ellen készített fajlagos antiszérumok az SPF csirkékben nem reagálnak olyan antigénnel, amelyek madár-eredetű vírusokból, de nem madár-eredetű korona-vírusokból készültek.

5. Az új törzsek sokszorozódnak a fertőzött sejtek citoplazmájában. Megfelelő in vitro rendszerek – embriót tartalmazó SPF-csirke-tojások (célszerűen az allantoiszon keresztül fertőzve)

- légcső-szövet tenyészet
- csirke-sejtek
- csirke-embrió sejtek (célszerűen CEK sejtek)

A fenti adatok megfelelően behelyezik ezeket az új vírusokat a madár-eredetű korona-vírusok közé, és jól elkülöníthetők a más madár-eredetű vírusoktól, mint pl. a madár-influenza-vírustól, a Newcastle vírustól, a REV-vírustól, az adenovírustól, leukózis-vírustól, retikoendoteliózis vírustól, madár-enkefalomielitisz-vírustól, herpesz-vírusoktól, ez utóbbiba beleértve a fertőző laringotracheitis vírust, a Marek-betegség vírusát, a galamb- és pulyka herpesz vírusokat és a fertőző nyáktömlő betegség (bursitis) vírusát.

A jelen találmány a madár-eredetű korona-vírusokat – amelyek a fentebb leírt spontán hemagglutinációt mutatják – tartalmazó vakcinák készítésével foglalkozik.

A vírust embriót tartalmazó SPF csirke-tojásban növeszthetjük, vagy valamilyen sejt-tenyészetben, előnyösen madár-szövettenyészetben.

Ha élő, legyengített vakcinát kell készíteni, a legyengítést a vírus izolátumok adaptálásával lehet végrehajtani az embriót tartalmazó tojáshoz vagy sejt-tenyészethez (előnyösen CEK sejtekhez) és a vírust ezeken a tenyészeteken pl. 10–200-szor kell passzálni. A biztonságos élő vakcina termelésének egy másik megközelítése egy madár-eredetű korona-vírus megfelelő klónjainak kiválasztása és tenyésztése, feltéve, hogy ezek még rendelkeznek a spontán agglutináció képességével.

1. táblázat

Vírus ↓	Szérum → J 97	J 609	Connecticut	Florida	J MK	3896
J 97	≥ 6,2	0,7	1,2	1,4	0,7	1,7
J 609	≤ 2,9	4,9	≤ 2,9	≤ 2,9	≤ 2,9	3,6
Connecticut	2,1	2,1	6,1	6,1	1,8	3,6
Florida	0,6	1,3	≥ 4,2	≥ 4,2	0,5	2,6
JMK	2,8	1,5	2,3	2,3	≥ 6,3	2,8
D-3896	≤ 0,8	0,9	1,5	1,5	≤ 0,8	> 6,6
D-207	0,5	0	0,5	0,5	≤ 0,3	2,6
D-212	0	1,2	1,0	1,0	0,3	2,3
H-52	1,6	2,8	2,8	2,8	1,1	1,8
D-274	2,2	2,7	3,7	3,7	2,8	4,2
D-1466	ND	ND	ND	ND	ND	1,8
D-3128	ND	ND	ND	ND	ND	1,5
D-752	—	—	—	—	—	1,9

1. Táblázat (folytatás)

Vírus ↓	Szérum → 207	212	H 52 (Mass.)	3128	274	1466
J 97	0	0	0,7	—	≤ 1,5	≤ 1,9
J 609	≤ 2,9	≤ 2,9	5,1	—	≤ 2,8	≤ 2,8
Connecticut	1,6	≤ 1,2	4,1	—	≤ 2,5	≤ 2,6
Florida	1,0	0	1,3	—	3,0	≤ 2,3
JMK	1,3	1,3	1,2	—	—	—
D-3896	1,9	≤ 0,3	≤ 0,7	3,2	—	—
D-207	≥ 5,3	1,3	1,4	1,4	—	—
D-212	0,5	5,3	0,5	1,4	—	—
H-52	1,1	1,1	≥ 5,3	—	—	—
D-274	5,0	≤ 1,5	≤ 1,6	3,4	≥ 5,9	3,5
D-1466	1,2	≥ 4,9	0,5	—	—	—
D-3128	0	0	0	6,4	—	—
D-752	1,5	1,3	1,5	1,9	2,0	3,9

ND = nem mutatható ki

2. Táblázat

ANTISZÉRUM ↓ VÍRUSTÖRZS	Massachusetts	D-207	D-212	Connecticut
M 41 (Mass.)	++	--	--	--
D-274	--	++	--	--
249 G	--	++	--	--
246 G	++	--	--	--
D-212	--	--	++	--
D-580	--	--	--	++
Connecticut	--	--	--	++

++: 1 : 16 hígítású fajlagos antiszérum, amely a ± 40 tarfolt teljes csökkenését idézi elő;
 --: ugyanez az antiszérum nem okoz jelentős tarfoltszám csökkenést.

3. Táblázat

Az egy vagy több új szerotípus elleni antitestekkel rendelkező csapatok százalékos száma			
A Szerológiai vizsgálat 197 vizsgált csapat	D 207 61%	D 212 32%	
Az osztályozott izolátumok száma			
B Vírus-izolálás 52 csapatból	Mass. 9	D 207 29	D 212 4

A H-vakcina törzsektől elkülönítés nélkül.

Az új vírusokból inaktivált vakcina készítése érdekében az AAF-et vagy szövet-tenyészet folyadékot lehet inaktiválni pl. formaldehiddel vagy β -propiolaktonnal.

Az inaktiválás és ha szükséges, pH beállítás és az inaktiváló agens semlegesítése után az inaktivált antigént adjuvánssal lehet keverni. Az adjuváns lehet pl. alumínium hidroxid, vagy egy ásványolajat [pl. Marcol^(R)82] vagy növényi olajat és egy vagy több emulzió-képzőt, pl. Tween^(R)80-at vagy Span^(R)80-at tartalmazó kompozíció.

Az élő vakcinák beadhatók szemcseppekben, orrcseppekben, ivóvízben, vagy spray formájában, a beadás 1 napos kortól egészen a tojásrakás időpontjáig (kb. 18 hét) változhat.

Az inaktivált vakcina általában 10–20 hetes korban adható be szubkután vagy intramuszkuláris injekció formájában.

Az élő vakcinákból az adagolás madaranként log 3–log 7 EID₅₀ tartományban történhet, előnyösen log 4 és log 5 EID₅₀ között.

Az inaktivált vakcinák log 5–log 8 EID₅₀ antigén ekvivalenst tartalmaznak egy madár-dózishoz, előnyösen log 6–log 8 EID₅₀-et.

Ha a vakcina (élő, vagy inaktivált) több, mint egyféle korona-vírust tartalmaz, minden egyes törzs a fentebb említett adagolási tartománynak megfelelő szinten legyen jelen.

Egy vagy több új madár-eredetű vírus kombinációja egy vagy több nem rokon madár-eredetű vírussal (mint pl. NDV, fertőző nyáktömlő-betegség vírus, EDS 76 vírus, adeno- és reovírusok) inakti-

vált vakcinákban szintén a találmány tárgyát képezi.

A találmányt a következő példák mutatják be:

I. Példa

A fertőző bronchitis vírusok izolálása

Az izolálás tojó- és tenyészcserkékből történik a következő eljárással: Légutat áttörölt tampont és/vagy a bélrendszer vakbél-réséből származó kaparekot antibiotikumot tartalmazó triptóz-foszfát tápközegben szuszpendálunk. Legalább tíz darab 9–11 napos, embriókat tartalmazó SPF csirke-tojást inokulálunk vírus-mintával, egyenként beoltva az allantoiszon keresztül. 48–72 órával később a 10 darab passzálásra használt tojás közül négyből az allantoisz-folyadékot és a CAM-et kinyerjük. Kontrollként legalább három vak passzálást hajtunk végre minden egyes passzási sorozathoz. Az egyes passzálások után megmaradó tojásokat (általában hatot a tízből) hét napig inkubáljuk és a még élő embriókat megvizsgáljuk fejlődési visszamaradásra és FB-re jellemző károsodásokra.

II. Példa
Élő vakcinák

A. A vírus szaporítása

10–11 napig inkubált, embriókat tartalmazó SPF csirke-tojást inokulálunk az 50%-os tojást fertőző dózis (EID₅₀) log 3–log 4 mennyiségével az allan-

toisz-üregben. A tojásokat 18–24 óra múlva gertyával átvilágítjuk, és a nem tipikus, elpusztult embriókat eldobjuk. 18–72 órás inkubációs periódus után (az alkalmazott vírus-törzstől függően) az AAF-et kinyerjük, centrifugálással tisztítjuk és/vagy szűrjük, és esetenként a megfelelő mennyiségű antibiotikummal keverjük, ha ez szükségesnek látszik.

B. A vakcina készítése

Az AAF-et ezt követően ismert módon gyógyászati készítménnyé alakítjuk. A stabilizálást megfelelő stabilizálószerrel segítségével hajthatjuk végre, ilyenek a szénhidrátok, pl. a szorbit, mannit, vagy a fehérjék, mint pl. az albumin, kazein, vagy megfelelő keverékek. Az AAF nagyobb mennyiségét hűthetjük -35°C alá és ilyen módon tárolhatjuk a további felhasználásig. Egy másik módszer szerint az AAF nagyobb mennyiségét $+4^{\circ}\text{C}$ -on tárolhatjuk a további felhasználásig. Az egyes tételekből mintákat veszünk vírus-tartalom vizsgálatra. A stabilizált AAF-et (ha fagyasztott mintákról van szó, felengedés után) liofilizáló ampullákba töltjük 1–2 ml-es mennyiségekben. A vírus-tartalmat olyan módon állítjuk be, hogy a liofilizálás után a titer legalább $4,0 \log \text{EID}_{50}$ legyen madárdózisonként. A liofilizálás után az ampullákat vákuumban vagy nitrogén-atmoszférában forrasztjuk le.

III. Példa

Inaktivált vakcina

A. A vírus készítése

A vírust a II. példa A. részében leírt módon szaporítjuk. Nagyobb tömegű vírus tárolását az inaktiválás és a további műveleti lépések előtt -35°C -nál alacsonyabb hőmérsékleten végezhetjük.

B. A vírus inaktiválása

A fagyasztott AAF-et felengedtetjük, a vírustiter (EID_{50}) meghatározásához mintát veszünk; az AAF-et annyi formalinnal inaktiváljuk, hogy a végső formaldehid-koncentráció $0,4\%$ legyen. 24 óra szobahőmérsékleten tartás után a formalint nátrium-metabiszulfittal semlegesítjük. Az inaktiválódás mértékének vizsgálatára mintát veszünk, és ezzel inokulálunk fogékony SPF-csírke embriókat vagy CEF-tenyészetet legalább egy passzálassal.

Egy másik módszer szerint az inaktiválást β -propiolaktonnal, etilén-iminnel vagy ezek származékaival végezzük.

Az inaktivált AAF-et hígítjuk vagy koncentrálnak a szükséges titernek megfelelően. A koncentráció elvégezhető az inaktiválás előtt is. A koncentráció alkalmas módja pl. az ultraszűrés vagy precipitálás polietilén-glikollal.

Az inaktivált AAF-et $+4^{\circ}\text{C}$ -on lehet tárolni.

C. A vakcina készítése

Inaktivált olajemulziós vakcina készítéséhez Tween^(R)80-at adunk, az inaktivált antigén szuszpenzió $3,5\%$ -ának megfelelő koncentrációban. Az antigén-tartalmat legalább $7,0 \log \text{EID}_{50}$ -re állítjuk be madárdózisonként. Az antigén-mennyiséget enzimimmún meghatározással mérhetjük.

A szuszpenziót ez után az adjuváns olajos fázisával emulzióba visszük olyan módon, hogy az olaj-víz arány $70 : 30$ vagy $55 : 45$ legyen. Az adjuváns összetétele:

5	Marcol ^(R) 52	90%
	Tween ^(R) 80	3,5%
	Span ^(R) 80	6,5%

A vizes fázis átlagos részecskemérete kevesebb, mint $1,0 \mu\text{m}$.

IV. Példa

Kombinált vakcina

A. Kombinált élő vakcina

15 Az élő kombinált vakcina előállításához a II. példa szerint előállított, különböző vírus-törzseket tartalmazó AAF-eket kombinálunk, olyan módon, hogy az egyes törzsekre megkívánt minimális vírus-tartalom legyen meg a végtermékben.

B. Kombinált inaktivált vakcina

20 A vírus törzset a II. példa A. része szerint szaporítjuk, és -35°C -on tároljuk.

A megfelelő vírus törzsek antigénjeit a III. példa B. része szerint inaktiváljuk, majd $+4^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten tároljuk.

25 Tween^(R)80-at, $3,5\%$ koncentrációig, adunk a megfelelő antigén-szuszenzióhoz. A vírus-szuszenziók antigén-tartalmát olyan módon állítjuk be, hogy minden egyes vírus-törzsről madárdózisonként az antigén-ekvivalens legalább $7,0 \log \text{EID}_{50}$ legyen. A polivalens vakcinával a III. példa C. részében leírtak szerint emulziót képzünk. A vizes fázist össze lehet keverni az egyes törzsek szuszpenziójából az emulzió kialakítása előtt, vagy az egyes antigéneket külön lehet emulzióba vinni az összekeverés előtt.

V. Példa

A csirke eritrociták hemagglutinálása

40 Két ténnyel, az I. példa A. része szerint előállított fertőzött AAF-et vagy fertőzött szövettényészet felülűsöt szobahőmérsékleten összekeverünk 1 rész 2% -os csirke eritrocita szuszpenzióval.

45 Az agglutinálás kb. 2 percen belül, esetenként 5 percen belül bekövetkezik. A hemagglutinálást gyorsítani lehet $+4^{\circ}\text{C}$ -on történő inkubálással.

A hemagglutinin a vírus-részecskékhez kapcsolódik, amelyet bromelin-kezeléssel ki lehet mutatni.

VI. Példa

A hemagglutinálás gátlása (HI)

55 A. Azt, hogy a csirke-eritrociták új FB törzsek által okozott hemagglutinálása fajlagos és a vírus antigénnek tulajdonítható, a hemagglutinálási reakció gátlásával mutathatjuk be, amely gátlást a megfelelő vírus ellen fajlagos antiszérumnak az eritrocitákhoz történő hozzáadás előtti beadásával idézhetünk elő. Az SPF tojásokat D-274 hemagglutináló törzsekkel inkubáljuk, 48 óra inkubálás után az AAF-et kinyerjük.

60 A kezeletlen AAF-et önmagában használjuk, vagy $1 : 1$ arányba hígítva szérummal vagy antiszé-

rummal: Az eredményeket a 4. Táblázat tartalmazza.

4. Táblázat

Adalékok	HA + / -
Kezeletlen AAF	+
AAF + SPF csirke-szérum	+
AAF + fajlagos FBV antiszérum (207. típusú)	-
AAF + fajlagos NDV antiszérum	+

NDV = Newcastle betegség vírusa

B. Mivel az új FB vírusok hemagglutininint hordoznak, (amint ez bromelines kezeléssel kimutatható) és különböző szerotípusokhoz tartoznak, a hemagglutinálási tesztet használhatjuk az új vírusok közötti megkülönböztetés céljából.

Az alkalmazott módszert Alexander D. J. és munkatársai írták le [Avian Pathology 5, 125-134 (1976)]. A foszfolipáz C-t használták a megfelelő antigén kezelésére.

Az így nyert titert 2 logaritmusában fejezzük ki. Az adatokat az 5. Táblázat tartalmazza.

5. Táblázat

ANTIGÉN	AZ FBV- M 41	D 274	D 1466
BŐL			
(szerotípus)			
↓ SZÉRUM	(Mass.)	(Mass.)	(212)
H 52 (Mass.)	9	6	5
207	6	10	5
212	5	5	8
246 G (Mass.)	10	5	ND

6. Táblázat

Vakcina	Hetek száma a vakcinálás után											
	0	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12
207 (HA -)	4,0	5,4	6,2	5,9	6,6	4,8	4,2	5,5	5,8	5,2	4,1	5,2
274 (HA +)	4,7	7,5	8,2	8,7	8,2	10,0	9,3	10,0	10,1	9,5	8,8	9,3
kontroll	< 5											

A vakcinált tyúkok fentivel azonos két csoportjának szérumban a semlegesítő választ (> 4,0 log) vizsgáljuk D 274 (52-szer passzált) homológ törzse ellen. A választ mutató állatok számát (a 10 vakcinált állatból) a 7. Táblázat tartalmazza.

7. Táblázat

Hetek száma a vakcinálás után	Vakcinacsoport	
	207 (HA -)	274 (HA +)
3	7/10 ⁺	9/10 ⁺
12	5/10	9/10

VII. Példa Vakcinációs kísérletek SPF csirkékkel

A. A vírusok szaporítása és a vakcinák készítése
D 207 vírustörzset [nem hemagglutináló (HA -)] és D 274 törzset [hemagglutináló (HA +)] tenyésztünk SPF tojásokban 54, illetve 52 passzálassal legyengítve. Ezekből a legyengített vírus törzsekből a vakcinákat a III. példa szerinti módszerrel készítjük.

B. Vakcinálás

Csoportonként 10-10 csirkéből álló 2 csoport 6 hetes SPF csirkét vakcinálunk szemcseppekkel, 4,0 log EID₅₀ mennyiséggel a megfelelő, A. részben említett vakcinákkal. A tyúkokat izolátorban helyezzük el és szérum-vizsgálatokra vért veszünk tőlük hetenkénti intervallumban. Ezeknek a szérumoknak a HI titerét a VI. példa B. részében leírt módszer szerint határozzuk meg, FBV D 274-ből készített antigént használva. Az eredmények a 6. Táblázatban találhatók, megmutatva a D 274 antigének elleni immunizálás kifejlődését 12 héten át a vakcinált tyúkok két csoportjában; nem vakcinált tyúkok szintén részt vettek a vizsgálatban.

C. Emlékeztető fertőzési kísérletek

20 héttel a vakcinálás után a kontrollcsok vakcinált és nem-vakcinált csoportját megfertőzzük 4,0 log EID₅₀ mennyiségű D 274 (52-szer passzált) törzsszel. A megfertőzés után 4 nappal a madarakból légúti metszetet készítünk az immunfluoreszcens (IFT) szövettani vizsgálathoz, a vizsgálathoz standard technikát alkalmazva. A madarak számát (a 10 vakcináltból), amelyek kóros mikroszkópos elváltozást vagy pozitív IFT-t mutatnak, a 8. Táblázat mutatja be.

8. Táblázat

Vakcina	Kóros mikroszkópos elváltozás	IFT pozitív
207 (HA -)	6/10 [±]	2/10
274 (HA +)	0/10	0/10
kontroll	10/10	6/10

Azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az új hemagglutináló D 274 törzsből készített vakcina magas szintű HI és antitestsemlegesítő titer vált ki a vakcinálást követő egy héten belül, és ez a magas titer megmarad a védelemhez elegendő szinten legalább 12 hétig a vakcinálás után. Ezt bizonyítja a D 274 csoport 100%-os védelme az emlékeztető fertőző kísérletek folyamán.

Ezzel ellentétben az ugyanolyan szerotípusú, de nem hemagglutináló D 207 törzs csupán alacsony szintű HI antitest képzést vált ki a kísérleti periódus folyamán. Sőt, a semlegesítő antitest-titer szignifikánsan alacsonyabb, amikor összehasonlítjuk a D 274 vakcinált csoporttal 12 héttel a vakcinálás után, és szignifikánsan alacsonyabb védelmi arányt is (kb. csak 50%) találunk a D 207 csoportban.

5

10

15

25

VIII. Példa

Vakcinálás kombinált élő vakcinával

A. A vírusok szaporítása és a vakcinák készítése
A hemagglutináló D 274 és D 1466 vírustörzseket az I. példa A. részében leírt módszer szerint szaporítjuk, és ezekből monevalens, illetve poliválens vakcinákat készítünk a II. Példa B. része illetve a IV. példa A. része szerint, 4,0 log EID₅₀ mennyiséget alkalmazva minden egyes törzsből.

B. Vakcinálás

Tíz hetes SPF csirkéket négy csoportba osztunk és négy szeparált izolátorban helyezünk el. A csirkéket szemcseppekkel vakcináljuk. Az A csoportot D 274 vakcinával vakcináljuk, a B. csoportot D 1466 vakcinával, a C. csoportot kombinált vakcinával; a D csoport a nem vakcinált csoport.

C. Az immunizálás vizsgálata

A vakcinálást követő napon, majd, 2, 4, 6 és 8 héttel később vért veszünk. A szérumokat egyenként vizsgáljuk homológ és heterológ antitest választásra, különböző prototípusú (M 41, D 274 és D 1466) törzsekből preparált antigéneket használva. Az eredményeket a 9. Táblázat mutatja be.

9. táblázat

Csoport-vakcinák ↓	Ag-típus	Hetek száma a vakcinálás után								
		0			2			4		
		M 41	D 274	D 1466	M 41	D 274	D 1466	M 41	D 274	D 1466
A. D 274		3,6	4,0	3,5	9,4	9,8	8,0	6,8	10,1	5,9
B. D 1466		3,4	3,7	3,2	7,0	5,8	7,3	5,2	5,1	7,2
C. D 274 + 1466		3,4	3,9	3,4	7,8	8,0	7,3	6,6	9,0	7,3
D. Kontroll		3,3	3,8	3,3	4,8	4,0	3,8	3,7	3,9	4,1

9. táblázat (folytatás)

Csoport-vakcinák ↓	Ag-típus	Hetek száma a vakcinálás után					
		6			8		
		M 41	D 274	D 1466	M 41	D 274	D 1466
A. D 274		5,2	10,0	4,4	4,4	10,3	3,1
B. D 1466		4,1	4,4	6,8	4,1	5,1	6,3
C. D 274 + 1466		5,2	8,4	6,4	5,7	9,0	6,9
D. Kontroll		3,0	3,6	3,5	3,2	4,2	3,0

A D 274 törzsszel vakcinált csirkék (A csoport) a homológ HI antitest magas titerével válaszolnak a második héttől egészen a kísérlet végéig. A vakcinálást követő 2. és 4. hétben szignifikáns keresztreakció figyelhető meg az M 41 és D 1466 heterológ antigének ellen, ez a jelenség a 6-8. hétre eltűnik. A B csoport csirkéi hasonló választ adnak alacsonyabb titer szinten. A homológ válasz védelmi szinten áll legalább a kísérlet végéig (8 héttel a vakcinálás után). A kombinált vakcina (C csoport) hosszan tartó HI antitest szintet vált ki mindkét vakcinatörzs ellen. Az M 41 antigénre is határozott hetero-

lóg válasz látható a vakcinálást követő 2. és 4. héten. A korai heterológ választ talán meg lehet magyarázni a csoportspecifikus antigénekkal reagáló immunoglobulinok magasabb arányával. A kísérletekből úgy tűnik, hogy a két hemagglutináló törzs (D 274 és D 1466) mind az egyedi, mind a kombinált élő vakcinákban kifejti immunogén potenciálját.

IX. Példa
Vaksinálási kísérletek a baromfiudvarban

A. A vírus szaporítása és a vakcina készítése
Az élő vakcina készítése a nem hemagglutináló H 120 és D 207 vírus törzsekből és a hemagglutináló D 274 vírus törzsből a VII. példa A. része szerint történik.

B. Vakcinálás
Fehér leghoorn és barna tyúkok csapatait vakcináljuk egy napos korukban H 120 vakcinával. 10 hetes korukban a fehér leghoorn tyúkokat és a barna tyúkokat vakcináljuk D 207, illetve D 274

vakcinákkal. A dózis 4,5 log EID₅₀ madaraként. Az átlagos csoportszám 15 000 madár, és a vakcinát sprayvel adjuk be (háti szóróval).

C. Vérminta-gyűjtés
A D 207 és D 274 vakcinákkal történő vakcinálás napján csapatonként 24 vérmintát veszünk szerológiai vizsgálatra és ezt 4 héttel a vakcinálás után megismételjük.

D. Az immunizálás ellenőrzése
A semlegesítési indexet (NI) használjuk a védelem mértékének kifejezésére. Ha az NI átlaga több, mint 4 log a megfelelő szerotípus ellen, akkor ezt hatásos vakcinálásnak tekintjük.

10. táblázat

Vakcinatörzs	A csapatok száma (átlagmért: 15 000 madár)			
	Vakcinált	A vakcinálás napján pozitív*	A vakcinálás utáni 4. héten pozitív*	A választ adó csapatok százalékos növekedése
D 207 (HA -)	10	4	6	40-60%
D 274 (HA +)	20	4	18	20-90%

* Pozitív: az átlagos NI ≥ 4 log a D 207 szerotípus ellen

A 10. Táblázat megmutatja, hogy azoknak a csapatoknak a százaléka, amelyek védetségét jelentő semlegesítő válasszal reagálnak, szignifikánsan nagyobb a D 274 csoportban a D 207 vakcinált csoporttal összehasonlítva.

X. Példa
A HI antitest titer kifejlődése és eloszlása a vakcinálási kísérletek folyamán a baromfiudvarban

A tojó- és tenyészcsapatoknak hemagglutináló D 274 törzsből készült vakcinával történt vakcinálása utáni szerológiai választ figyeljük meg.

137, átlagban 15 000 madarat tartalmazó csapatot vakcinálunk 10-12 hetes korukban egy dózis élő D 274 vakcinával (D 207 szerotípusú), háti szóróval történő beadással.

Massachusets típusú vakcinálást végzünk ugyanezekben a csapatokban 1 napos korban (H 120) és kb. 15 hetes korban (H 52). Minden csapatot megvizsgálunk HI antitestre a megfelelő szerotípusok (Massachusets D 207 és D 212) ellen 18-20 hetes korban.

A HI titer eloszlási sémáját – a három FB szerotípus ellen a D 274 vakcinával történt vakcinálás után – az I. ábra mutatja. A 137 csapatból 16-ot követünk 38 hetes korig és a HI titert mérjük négyhetes intervallumokban. Az eredményeket a II. ábra szemlélteti, amely a 16 vakcinált csapat titerének hossz méretű ábrázolása. A vakcinálás 1 napos korban H 120 törzsszel, 16 hetes korban H 52 törzsszel (mindkettő Massachusets típusú) és 12 hetes korban D-274 törzsszel történt. A 137 csapatból 86% mutatott 7-nél nagyobb HI titert, 63% 8-nál nagyobb HI titert és 25% 9-nél nagyobb HI titert a D 207 szerotípus ellen. A válasz a Massachusets

szerotípus ellen – két vakcinálás után nem hemagglutináló törzsekkel – gyengébb volt: a csapatok 66%-ának HI titere 7-nél kisebb volt. A válasz a D 212 szerotípus (vakcinálás nélkül) ellen az elvárásnak megfelelően még alacsonyabb volt: a csapatok 82%-ának HI titere 7-nél kisebb volt.

A II. ábrán látható hosszmenti ábrázolásból szintén az a következtetés vonható le, hogy a D 274 törzsszel történt egyszeri vakcinálás után a HI titer következetesen magasabb, mint amelyet a hagyományos Massachusets vakcinákkal történő kétszeres vakcinálás kivált.

XI. Példa
Csirke (RBC) eritrociták hemagglutinálása

Az új FBV törzsek spontán hemagglutináló aktivitását, amelyet megvizsgáltunk az V. és VI. példákban gyors lemez HA teszttel, megvizsgáljuk sokkal pontosabb módon lassú HA teszttel is mikrotitráló lemezekon, ha a spontán hemagglutinálás nem mutatkozott következetesen.

Mivel kíváncsiak a hemagglutináló és nem-hemagglutináló törzseket megkülönböztetni lassú, kvantitatív HA teszttel mikrotitráló lemezekon, koncentrált és részben tisztított vírus szuszpenziókat alkalmazunk a HA aktivitás demonstrálására.

A. A vírus szuszpenzió készítése
A 10 napos embrió tartalmazó tojásokból allantoisz-folyadékot gyűjtünk 24-48 órával az inokulálás után. Az AAF-et centrifugálással tisztítjuk (1000 xg, 10 perc).

35 ml AAF vírus-tartalmát pellet formában nyerjük ki SW-28 rotort (Beckman) használva 30 000 xg-nél 60 percen át. Az így nyert pelletet 1 ml, foszfáttal puffertolt sóoldattal felfuszpendáljuk.

B. A hemagglutinálás vizsgálata

A vírus szuszpenzió kétszeres hígítási sorát készítjük el mikrotiter lemezekben. 25 µl RBC-t (1%-os) adunk az 50 µl végtérfogatú vírus-hígításhoz. A lemezeket 2–18 óráig, 4 °C-on történő inkubálás után olvassuk le.

A titert a még több, mint 75%-os agglutinációt mutató legnagyobb hígítás reciprok értékével fejezzük ki. Az eredményeket a 11. Táblázat ábrázolja.

11. Táblázat

Törzs	HA		HA a 35-szörös koncentráció után
	a koncentráció előtt	mértani átlag tartomány	
AAF (negatív)	– (n=1)	– (n=2)	–
M 41	– (n=4)	– (n=3)	–
D 274	– (n=5)	3 (n=6)	2 – 8
246 G	– (n=5)	3 (n=5)	2 – 8
D 1466	– (n=3)	4 (n=5)	2 – 8

n = kísérletek száma

A három spontán hemagglutináló törzset (D 274, 246 G és D 1466) vizsgálva mind 2–8 közötti HA-titert mutatnak 35-szörös koncentrációsi lépés

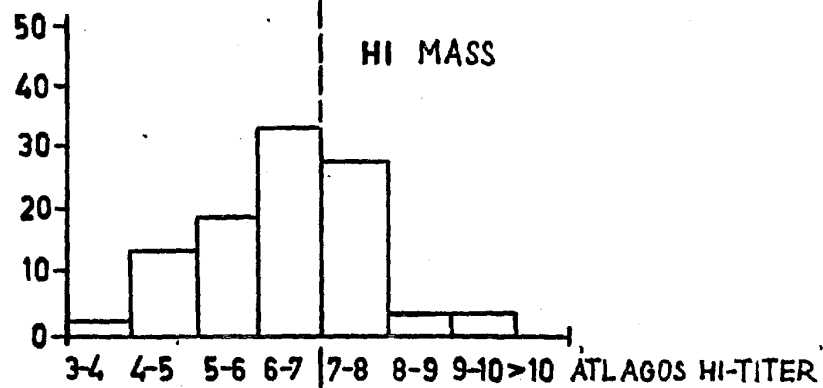
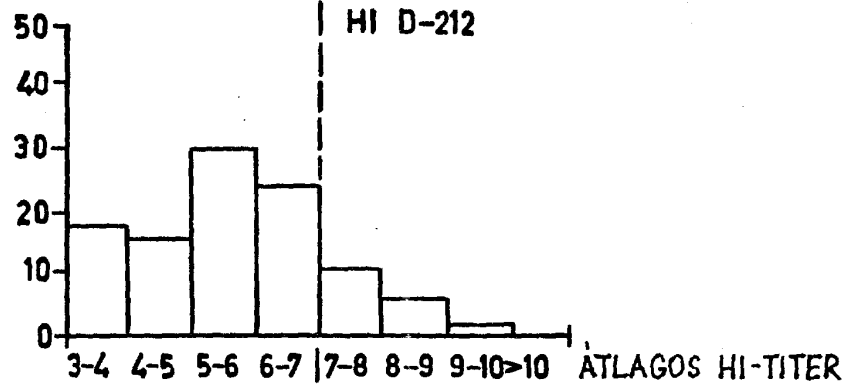
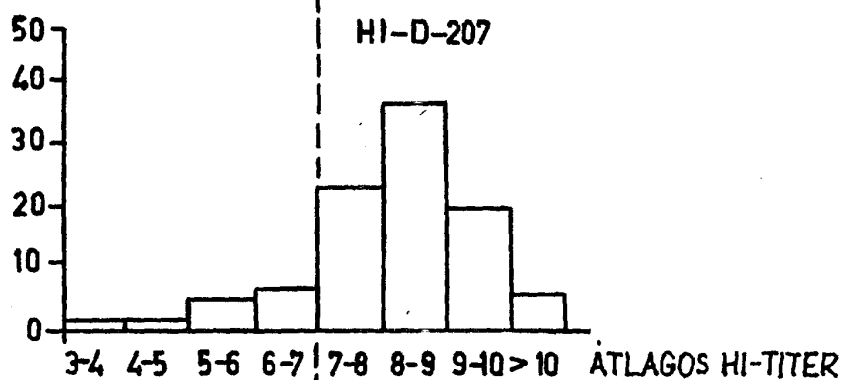
után, míg a nem fertőzött AAF (negatív kontroll) és a nem hemagglutináló M 41 referencia törzs negatív marad ez után a kezelés után.

Ezek a kísérletek azt mutatják, hogy mind a lassú, mind a gyors HA tesztekkel megtalálható az új FBV törzsek hemagglutináló képessége. A koncentrációsi lépést rutinszerűen használják az FBV részecskék besűrítésére és részbeni tisztítására. Ez jelzi, hogy a HA a leírt törzsek jellemzője és a vírus részecskékhez kapcsolódik.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás élő vagy inaktivált, fertőző bronchitis elleni vakcinák előállítására a fertőző bronchitis vírus törzs megfelelő tápközegen végzett tenyésztésével, a fertőző anyagnak a tápközegből való kinyerésével, és a kinyert anyagnak előnyösen a vírus legyengítése vagy inaktiválása után végzett gyógyászati készítménnyé alakításával, *azzal jellemezve*, hogy egy vagy több, csirke eritrocitákat spontán hemagglutináló fertőző bronchitis vírus törzset használunk.

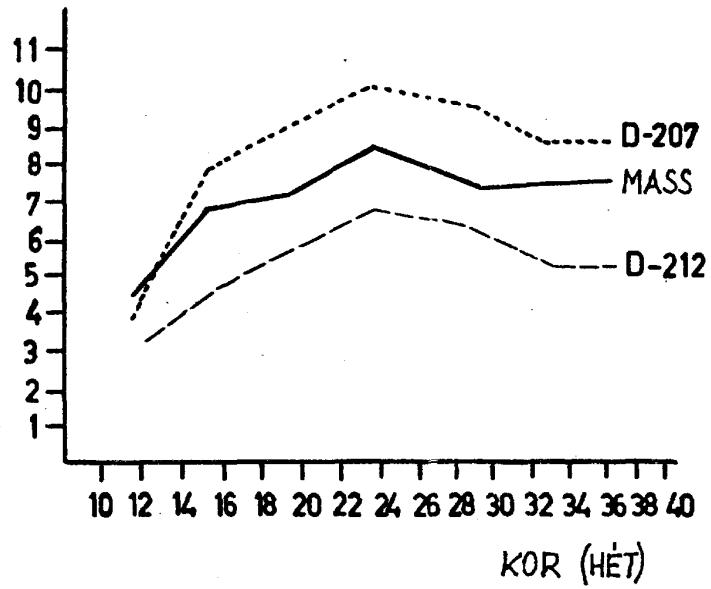
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy fertőző bronchitis vírustörzsként a Central Veterinary Laboratory-ban (New Haw at Weybridge, Nagy-Britannia) VLO 10110/AVI/3, VLO 10110/AVI/4, VLO 10110/AVI/5, VLO 10110/AVI/6, és/vagy VLO 10110/AVI/7 számon letétbe helyezett törzseket használjuk.

CSAPATOK
%CSAPATOK
%CSAPATOK
%

1. ábra

HI-TITER

2 ALAPU LOGARITMUSBAN



2. ábra