

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 318

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/08 (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35489**
(22) Přihlášeno: **19.10.2018**
(47) Zapsáno: **13.11.2018**

- (73) Majitel:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ
Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané, CZ
- (72) Původce:
Mgr. Marcel Kosina, Ph.D., Hranice, Hranice I-
Město, CZ
MVDr. Josef Krejčí, Brno, Královo Pole, CZ
MVDr. Jan Bernardy, Ph.D., Brno, Černá Pole, CZ
Hana Kudláčková, Dolní Kounice, CZ
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D., Velešovice, CZ
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D., Sentice, CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Na bělidle 64/3, 150 00 Praha 5,
Smíchov

- (54) Název užitého vzoru:
**Vakcína proti klostridiové infekci k
veterinárnímu užití**

CZ 32318 U1

Vakcína proti klostridiové infekci k veterinárnímu užití

Oblast techniky

5

Předkládané technické řešení poskytuje veterinární preparát ke zvýšení specifické odolnosti zvířat, zejména prasat, proti klostridiové infekci.

Dosavadní stav techniky

Klostridiové infekce v chovech prasat nejčastěji postihují novorozená selata. Původci těchto onemocnění projevujících se průjmy jsou zejména druhy: *Clostridium perfringens* typu A a C a *Clostridioides difficile* (Kongsted a kol.: Diarrhoea in neonatal piglets: a case control study on microbiological findings. Porcine Health Manag. 2018, 4:17; Mesonero-Escuredo a kol.: Viral and bacterial investigations on the aetiology of recurrent pig neonatal diarrhoea cases in Spain. Porcine Health Manag. 2018, 4:5).

Postižená a bezprostředně ohrožená selata bývají léčena většinou antibiotiky, jejich léčebné nasazení však může mít klinický efekt pouze v případech pomalejšího nástupu onemocnění. Největším problémem zůstává jejich nasazení u selat pod prasnici, které je spojeno s opakovanou náročnou manipulací a tvorbou rezistence k antimikrobikům. Zásadním a rovněž logickým řešením tohoto problému je imunizace prasnici před porodem, která by měla indukovat vysoké hladiny specifických protilátek v kolostru a mléce (kolostrální a laktogenní imunita). Protilátky přítomné ve střevě neutralizují vytvořené toxiny a zabraňují jejich vazbě na buňky střevního epitelu. V případech vakcín proti *C. perfringens* nelze o účinnosti tohoto postupu pochybovat, neboť jejich efekt je v modelových podmínkách opakovaně potvrzován. Nicméně výsledky dosahované v terénních podmínkách běžných chovů nejsou zcela přesvědčivé. Příčinou tohoto stavu je zřejmě skutečnost, že většina komerčních vakcín je pouze toxoidová (viz Tabulka 1), vyvolávající protilátkovou odpověď zejména proti hlavním toxinům (v případě prasat proti toxinům alfa a beta, resp. beta2 *C. perfringens* typu A); neberou však v úvahu další méně toxické, nicméně patogeneticky velmi závažné toxiny, např. enterotoxin. Tyto vakcíny rovněž pomíjejí adhezivní faktory, které v patogenezi těchto infekcí hrají podstatnou roli.

35 Tabulka 1: Typy vakcín známých ve stavu techniky

	vakcína 1	vakcína 2	vakcína 3	vakcína 4	vakcína 5
původ toxinů: <i>C.perfringens</i> typ	A + C	A	A + C + D	C	B + C + D
toxoid alfa	+	+	+	-	-
toxoid beta	+	+	+	+	+
toxoid epsilon	-	-	+	-	+

Jedním z možných řešení výše uvedeného problému je vakcinace prasnici, které prostřednictvím laktogenní imunity budou chránit nově narozená selata před ranou postnatální infekcí.

40 Z Tabulky 1 je rovněž patrné, že žádná z uvedených vakcín neobsahuje složku schopnou indukovat imunitu proti *C. difficile*, ačkoliv jeho podíl na vzniku části novorozeneckých infekcí byl již dříve popsán (Krutova a kol.: The emergence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in piglets in the Czech Republic clusters with *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 isolates from Germany, Japan and Taiwan. Int. J. Med. Microbiol. 2018, 308(7):770-775.; Grzeškowiak a kol.:
45 Impact of early-life events on the susceptibility to *Clostridium difficile* colonisation and infection in the offspring of the pig. Gut Microbes. 2018, 25:1-9; 1.; Bernardy a kol.: Případová studie

koinfekce *Clostridium perfringens* a *Clostridium difficile* u novorozených selat. Veterinářství 2018, 68 (3): 180-183).

5 Podstata technického řešení

Předmětem předkládaného technického řešení je veterinární vakcína pro imunizaci prasnic, jejímž účelem je chránit jejich selata před klostridiovou infekcí. Vakcína je vhodná pro aplikaci prasnicím v předporodním období; vakcínou indukovaná tvorba protilátek je pak pasivně předávána selatům prostřednictvím kolostra a mléka.

Vakcína obsahuje inaktivované bakterie (bakterin) *Clostridium perfringens*, *Clostridioides difficile* a inaktivovaný beta toxin (toxoid) z *Clostridium perfringens*.

15 K přípravě vakcíny lze použít kterýkoliv typ bakterie *Clostridium perfringens*, tj. typ A nebo B nebo C, a to jak jako bakterin, tak jako zdroj beta toxinu. S výhodou lze použít typ A nebo C.

Na rozdíl od vakcín známých ve stavu techniky uvedených v Tabulce 1, navrhovaná vakcína kromě hlavního toxoidu obsahuje i celobuněčnou složku, která indukuje tvorbu protilátek i proti povrchovým strukturám bakteriálních buněk. Tyto struktury hrají zásadní roli v adhezi patogenních bakterií ke stěně střevní sliznice, což je důležitý krok v řetězci interakcí mezi patogenem a jeho hostitelem.

25 Vakcína dále může obsahovat další farmaceuticky přijatelné pomocné látky, typicky rozpouštědla, nosiče a/nebo adjuvanty jako látky zvyšující odpověď imunitního systému na vakcínu. Zejména vhodnými pomocnými látkami jsou thiomersal a formaldehyd.

Vakcína je s výhodou ve formě vhodné pro parenterální, tj. intramuskulární, subkutánní nebo intradermální aplikaci.

30

Příklad uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Složení a příprava vakcíny

35

Kvalitativní a kvantitativní složení vakcíny

Vakcína obsahuje inaktivovaný celobuněčný antigen (tj. inaktivovanou bakterii) *Clostridium perfringens* typ C, který je producentem beta toxinu a je v přípravku obsažen v koncentraci 1,5 McFarlanda. Vakcína dále obsahuje celobuněčný antigen *Clostridioides difficile* v koncentraci 1,5 McFarlanda. Pro testování imunogenity byla připravena také varianta obsahující 7,5 McFarlanda každého bakterinu. Třetí antigenní složkou vakcíny je toxoid beta, produkovaný bakterií *C. perfringens* typ C, v koncentraci 10 %. Vakcína obsahuje pomocné látky thiomersal (0,1 mg/ml) a formaldehyd (max. 0,5 mg/ml) a také adjuvans na olejové bázi Montanide ISA 35 VG (Seppic, Francie).

45

Příprava antigenů

Antigen *C. perfringens* (CP) a *C. difficile* (CD):

50 Lyofilizovaná bakteriální kultura je rehydratována ve sterilním fyziologickém roztoku a pomnožena na agarové půdě za anaerobních podmínek při 37 °C po dobu 18 až 24 hodin.

Pomnožená kultura je následně inokulována do přednásad s živným bujónem s nízkým redoxpotenciálem a inkubována při 37 °C po dobu 18 až 24 hodin za aerobních podmínek. Následuje velkokapacitní kultivace ve fermentoru ve 200 l v tekutém médiu s nízkým

55

redoxpotenciálem za aerobních podmínek při 37 °C po dobu 3 až 4 hodin a je ukončena inaktivací. Kultura je inaktivována jednorázovým přídatkem 35% roztoku formaldehydu na koncentraci 5 ml/l celkového objemu kultury. Proces inaktivace trvá alespoň 2 hodiny. Následuje separace a purifikace inaktivovaných buněk klostridií pomocí ultrafiltračního zařízení přes kazety s odpovídající porozitou a oplach koncentrovaných buněk sterilním fyziologickým roztokem opakovanou ultrafiltrací. Hodnota pH koncentrovaného bakterinu je upravena na 6,5 až 7,5. Bakterin je skladován při 2 až 8 °C. Bakterin je kvantifikován na základě měření hustoty suspenze na spektrofotometru při vlnové délce 605 nm. Z naměřené hodnoty je vypočtena hustota suspenze udávaná v jednotkách McFarlanda: „McF“. V dalším kroku bylo množství naředěno na požadovanou koncentraci.

Antigen beta toxoid:

Produkce beta toxoidu je zahrnuta při kultivaci kultur *C. perfringens*. Pro účely koncentrace beta toxoidu je využito dvoustupňové ultrafiltrace, kdy po separaci buněk *C. perfringens* následuje koncentrace toxoidu pomocí kazet s nízkou porozitou. Vzniklý koncentrovaný beta toxoid je dále filtrován přes bakteriologický filtr (0,2 µm) za sterilních podmínek v prostoru s laminárním prouděním. Antigen je kvantifikován pomocí ELISA soupravy na detekci CP beta toxinu (výrobce BioX Diagnostics). Obsah beta toxoidu v testovaných vzorcích se počítá jako % obsahu beta toxoidu ve WHO standardu (*Clostridium Welchii* /*Perfringens*, Beta/ Toxoid CwBT WHO Reference Reagent). Antigen je uložen při teplotě od -20 °C.

Formulace vakcíny

Formulace vakcíny probíhá v duplikátorovém kotli. Bakterinová složka (buněk *C. perfringens* a *C. difficile*) s beta toxoidem a 1% roztokem thiomersalu zaujímají objem 74 % z celkového objemu šarže přípravku. K antigenům je přidáno adjuvans Montanide ISA 35 VG v objemu 26 % z celkového objemu šarže přípravku. Následuje homogenizace všech složek po dobu 15 minut při 120 rpm. Na konci doby homogenizace je ověřeno pH vakcíny, které musí být v rozmezí pH = 6,5 až 7,5. Bulk vakcíny je plněn do zásobních lahví a následně do lékovek.

Příklad 2: Ověření bezpečnosti a imunogenity vakcíny na selatech

Do pokusu bylo zahrnuto 6 selat ve věku 3 až 4 týdny. Tři selata byla vakcinována vakcínou s obsahem 1,5 McF bakteriálních antigenů a tři selata byla vakcinována vakcínou s obsahem 7,5 McF bakteriálních antigenů. V den vakcinace před aplikací přípravku byla selatům odebrána krev z *vena cava cranialis* v množství přibližně 3 ml. Tento odběr sloužil pro zjištění iničiálního titru protilátek proti antigenům obsažených ve vakcíně. Přípravek byl aplikován intramuskulárně do paraaurikulární krajiny v dávce 2 ml. Revakcinace byla provedena stejným způsobem, tj. 2 ml intramuskulárně do paraaurikulární krajiny na druhé straně krku 14 dní po aplikaci první dávky. Před samotnou revakcinací byl opět proveden odběr krve pro přípravu séra ke zjištění protilátkové odpovědi. Poslední odběr krve byl proveden 28. den od začátku pokusu. Sérokonverze proti beta toxoidu byla hodnocena pomocí komerčně dostupné soupravy ELISA BioX Diagnostics (kat. č. BIO K 317/2, <https://www.biox.com/en/bio-k-317-monoscreen-abelisa-clostridium-perfringens-beta-toxin-blocking-p-252/>). Výsledky jsou prezentovány v Tabulce 2. Sérokonverze proti celobuněčným antigenům byla hodnocena metodou ELISA, ve které byl jako antigen použit bakterin *C. perfringens* nebo *C. difficile* totožný jako ve vyvíjeném přípravku. Antigen je ředěn 1 : 2000 v PBS o pH 7,2. Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 µl naředěného antigenu. Destička byla inkubována přes noc při 4 °C. Následně byla deska promyta v poloautomatické promývačce roztokem PBS s 0,05 % Tween celkem 3x 300 µl. Blokace nespecifických vazebných míst byla provedena 250 µl roztoku PBS s 5 % netučného mléka. Destička byla inkubována 1 hod při 37 °C. Následovalo promytí roztokem PBS s 0,05 % Tween v množství 3x 300 µl. Vzorky byly zředěny 1 : 200 v roztoku PBS s 5 % netučného mléka a byly nanášeny na destičku v množství 100 µl na jamku. Inkubace destičky byla 1 hod při 37 °C. Následně promytí bylo provedeno PBS s 0,05 % Tween 3x 300 µl. Konjugát křenové peroxidázy

- s protilátkou anti-pig IgG (Sigma) byl předředěn 1 : 10000 v roztoku PBS s 5 % netučného mléka a byl přidán do jamek v objemu 100 µl na jamku. Inkubace destičky byla 1 h při 37 °C. Jamky byly opět promyty PBS s 0,05 % Tween 3x 300 µl. Do jamek bylo napipetováno 100 µl substrátu TMB, který působil 15 min při laboratorní teplotě. Reakce byla zastavena přidávkem 50 µl 1M H₂SO₄ do každé jamky. Absorbance intenzity barevné reakce byla měřena při 450 nm.
- Procentuální vyjádření výsledků bylo provedeno na základě srovnání s vybraným sérem, kterému byla přidělena hodnota 100 %. Výsledky jsou prezentovány v Tabulce 3 a Tabulce 4. Z výsledků na selatech vyplývá, že došlo k signifikantní sérokonverzi v porovnání s iniciálním sérem. Zároveň nebyly pozorovány celkové změny zdravotního stavu ani lokální změny v místě aplikace vakcíny.

Tabulka 2: Stanovení protilátek proti Beta toxoidu (v % inhibice)

Vakcína	Sele č.	Iniciální titr	Den po vakcinaci: 14	Den po vakcinaci: 28	
					průměr
Vakcína s obsahem 1,5 McF bakteriálních antigenů	1	6,33 %	7,85 %	65,38 %	68,97 %
	2	8,15 %	19,84 %	74,44 %	
	3	15,30 %	37,33 %	67,08 %	
Vakcína s obsahem 7,5 McF bakteriálních antigenů	4	9,34 %	5,96 %	77,30 %	67,43 %
	5	11,38 %	9,86 %	53,51 %	
	6	8,06 %	8,37 %	71,46 %	

Tabulka 3: Stanovení protilátek proti antigenu CP (procentuální vyjádření)

Vakcína	Sele č.	Iniciální titr	Den po vakcinaci: 14	Den po vakcinaci: 28	
					průměr
Vakcína s obsahem 1,5 McF bakteriálních antigenů	1	4,55 %	23,41 %	77,90 %	54,57 %
	2	7,63 %	19,74 %	64,80 %	
	3	6,09 %	16,81 %	21,00 %	
Vakcína s obsahem 7,5 McF bakteriálních antigenů	4	5,80 %	37,36 %	100,00 % *	95,57 %
	5	8,22 %	73,40 %	140,30 %	
	6	6,97 %	19,52 %	46,40 %	

- * Zvolené sérum, udávající imunitní odpověď 100 %, podle kterého je nastaveno procentuální vyjádření imunitní odpovědi v cílovém druhu zvířete.

Tabulka 4: Stanovení protilátek proti antigenu CD (procentuální vyjádření)

Vakcína	Sele č.	Iniciální titr	Den po vakcinaci: 14	Den po vakcinaci: 28	
					průměr
Vakcína s obsahem 1,5 McF bakteriálních antigenů	1	3,89 %	11,86 %	202,80 %	134,57 %
	2	2,88 %	11,83 %	169,50 %	
	3	2,64 %	8,21 %	31,40 %	
Vakcína s obsahem 7,5 McF bakteriálních antigenů	4	2,26 %	9,34 %	100,00 % *	230,07 %
	5	2,74 %	24,00 %	472,70 %	
	6	2,11 %	12,94 %	117,50 %	

- * Zvolené sérum, udávající imunitní odpověď 100 %, podle kterého je nastaveno procentuální

vyjádření imunitní odpovědi v cílovém druhu zvířete.

Příklad 3: Ověření imunogenity na prasnicích

- 5 Do pokusu bylo zahrnuto 5 prasnic. Pro pokus byla použita vakcína s obsahem 1,5 McF bakteriálních antigenů. V den vakcinace před aplikací přípravku byla prasnicím odebrána krev z *vena cava cranialis* v množství přibližně 3 ml. Tento odběr sloužil pro zjištění iniciálního titru protilátek proti antigenům obsažených ve vakcíně. Tato aplikace proběhla ještě před umělou inseminací. Přípravek byl aplikován intramuskulárně do paraaurikulární krajiny v dávce 2 ml.
- 10 Deset týdnů po aplikaci byl proveden odběr za účelem zjištění titru protilátek. Revakcinace byla provedena stejným způsobem, tj. 2 ml intramuskulárně do paraaurikulární krajiny na druhé straně krku 2 týdny před očekávaným termínem porodu. Poslední odběr krve byl proveden v den porodu. Krev selatům byla odebrána 4. den po porodu. Sérokonverze proti beta toxoidu (Tabulka 5) i proti celobuněčným antigenům (Tabulka 6 a Tabulka 7) byla hodnocena stejně jako v případě
- 15 pokusu na selatech. Z výsledků na prasnicích a selatech vyplývá, že aplikace vede k sérokonverzi a tyto protilátky jsou také předávány selatům cestou kolostrální/laktogenní imunity.

Tabulka 5: Stanovení protilátek proti beta toxoidu (v % inhibice)

Prasnice č.	Protilátky: prasnice			Protilátky: selata (4. den po porodu)		
	Iniciální titr	10 týdnů po první aplikaci	Porod	A	B	C
127	7,99 %	62,93 %	93,58 %	94,76 %	94,96 %	92,01 %
128	14,15 %	82,45 %	94,04 %	94,24 %	92,53 %	94,30 %
129	-9,56 %	72,36 %	69,09 %	93,19 %	94,63 %	94,76 %
130	10,61 %	71,19 %	92,60 %	94,11 %	93,98 %	92,60 %
132	7,99 %	64,77 %	92,47 %	94,11 %	94,96 %	93,91 %

- 20 Tabulka 6: Stanovení protilátek proti antigenu CP (procentuální vyjádření)

Prasnice č.	Protilátky: prasnice			Protilátky: selata (4. den po porodu)		
	Iniciální titr	10 týdnů po první aplikaci	Porod	A	B	C
127	27,70 %	43,70 %	60,60 %	16,20 %	13,20 %	28,00 %
128	17,80 %	26,80 %	95,20 %	84,90 %	11,10 %	71,20 %
129	19,80 %	29,60 %	67,50 %	25,00 %	40,70 %	34,10 %
130	22,20 %	21,60 %	63,10 %	73,10 %	56,60 %	36,30 %
132	22,00 %	26,20 %	58,40 %	69,50 %	112,60 %	104,60 %

Tabulka 7: Stanovení protilátek proti antigenu CD (procentuální vyjádření)

Prasnice č.	Protilátky: prasnice			Protilátky: selata (4. den po porodu)		
	Iniciální titr	10 týdnů po první aplikaci	Porod	A	B	C
127	5,70 %	7,10 %	28,30 %	12,60 %	10,30 %	21,10 %
128	5,60 %	9,40 %	126,10 %	161,00 %	20,30 %	138,30 %
129	6,70 %	22,70 %	78,70 %	50,20 %	74,00 %	65,50 %
130	5,30 %	8,10 %	93,80 %	205,10 %	173,20 %	95,70 %
132	7,30 %	8,60 %	30,40 %	68,10 %	98,20 %	91,80 %

NÁROKY NA OCHRANU

5

1. Vakcína ke zvýšení specifické odolnosti zvířat proti klostridiové infekci, **vyznačující se tím**, že obsahuje bakterin *Clostridium perfringens*, bakterin *Clostridioides difficile*, a inaktivovaný beta toxin *Clostridium perfringens*.

10

2. Vakcína podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje další farmaceuticky přijatelné pomocné látky vybrané ze skupiny zahrnující rozpouštědla, nosiče a adjuvanty.

3. Vakcína podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje formaldehyd a/nebo thiomersal.

15

4. Vakcína podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že je ve formě pro subkutánní, intramuskulární nebo intradermální podání.