

# INAKTIVACE VIRUSU INFEKČNÍ OBRNY VEPŘŮ FORMALINEM

(Dopl nek k práci EMI 7, 73, 1958)

B. KORYCH, F. PATOČKA, VL. KUBELKA

Kultivace virusu infekční obrny vepřů (Těšínské choroby prasat) na tkáňových kulturách<sup>1 2 3 4 5</sup>) dala mimo jiné i mořnost získat toto infekční agens ve velk m množství v relativn  čist m prostředí. Takto pomnořen ho virusu pro imunizační u cely bylo poprvé, ve formě formolizovan  vakuiny, pouřito námi k imunizaci v modelov m pokusu 1958.<sup>6 7</sup>) Pro terénní imunizaci byla ař dosud prováděna inaktivace virusu v mozkomíšní suspenzi, a to víceméně empiricky, bez předchozího ur en  inaktivační křivky virusu formalinem. V nařem modelov m pokusu o imunizaci vepřů proti I. O. virem z tkáňových kultur inaktivovan m formalinem<sup>6 7</sup>) byla vakcina připravena podle schematu uřivan ho při produkci vakuiny proti lidsk  poliomyelitidě. U kolem této práce je experiment ln  ov řen  u inku formalinu na virus I. O. vepřů za dan ch experimentálních podmínek.

## MATERIÁL A METODY

Tk ňov  kultury vepřov  embryonální ledvinn  tk n  připraveny způsobem propracovan m v nař  laboratoři.<sup>4</sup>) Jako kultivačního i udrřovac ho media uřito 0,5% laktalbuminhydrolys tu (LAH) v Hankov  n razn kov m roztoku s přidáním 2,5 % kořsk ho s ra, antibiotika penicilín a streptomycin aa 100 j., resp. gamma na ml. K infekci kultur bylo uřito virusu I. O. vepřů z p t  pasáže na tkáňových kulturách. Medium z kultur odebíráno a slito 4. den po infekci, kdy tk n  byla kompletn  destruována virem. Infekční medium bylo filtrováno Jensk m filtrem G5, aerov no probubláváním vzduchu při pokojov  teplotuře (20  C) po 48 hod. k odstranění CO<sub>2</sub>, pH bylo pak upraveno přidáním 0,5% kys. octov  na 7,0 %. Takto připraven  medium s virem bylo centrifugováno při 3000 rpm po 20 min. K supernatantní tekutině byl po konstatování bakteriologick  sterility přidán formalin 1 : 40 v množství, aby jeho celkov  koncentrace byla 1 : 4000, a medium pak bylo ulořeno do vodn  l zn  při teplotuře 37  C. Před přidáním formalinu a pak v časových intervalech 24, 48, 72, 86 hod. byly odebírány vzorky inaktivovan  tekutiny s virem. Vzorky byly dialyzovány při teplotuře +4  C proti Hankovu roztoku po 24 hod., pak v ampulkách uskladněny na -20  C do doby titrace. Konečn  produkt po dvanáctidenní inaktivační proceduře byl neutralizován natriumbisulfitem k zastaven  u inku formalinu a po negativním testu bezpečnosti na tkáňových kulturách a na zvířatech byl uřit jako vakcina proti I. O. vepřů v modelov m pokusu s výsledkem 50% u innosti. Výsledky inaktivační procedury pod v  přehledn  tabulka.

Konečn  zhodnocení titrace provedeno po 11 dnech inkubace. Jako udrřovac  medium po infekci bylo uřito amniov  vody 95%, 5% kořsk ho s ra, penicilín a streptomycin aa 100 j., event. gamma na ml.

Tab. 1. Titr virusu na tkáňových kulturách.

před neutralizací	10-50
24 hod. po přidání formalinu	10-2,0
48 hod.	10-0,5
72 hod.	0
86 hod.	0

#### DISKUSE A SOUHRN

Suspenze virusu infekční obrny vepřů, pomnoženého v tkáňových kulturách embryonální vepřové ledvinné tkáně, byla inaktivována formalinem v ředění 1 : 4000 při teplotě 37° C a pH 7,0. Celková inaktivační doba byla 12 dní. Před přidáním formalinu a během inaktivace byly odebrány jednotlivé vzorky inaktivovaného infekčního media v intervalech: 1. před přidáním formalinu, 2. 24 hod. po přidání formalinu, 3. 48 hod po přidání formalinu, 4. 72 hod. po přidání formalinu, 5. 86 hod. po přidání formalinu. Jednotlivé vzorky byly dialyzovány při 4° C proti Hankovu roztoku po 24 hod. a pak titrovány na tkáňových kulturách vepřové ledvinné tkáně. Jednotlivým vzorkům odpovídaly tyto titry: 1. 10<sup>-5</sup>, 2. 10<sup>-2,0</sup>, 3. 10<sup>-0,5</sup>, 4. 0, 5. 0. Imunogennost vakciny byla 50 %.

Z výsledků titrace u vzorků odebraných po 24hod. intervalech vyplývá, že virus, o počátečním titru 10<sup>-5</sup>, pomnožený na tkáňových kulturách, suspendovaný v relativně čistém prostředí (0,5 % LAN v Hankově nárazníkovém roztoku s 2,5 % koňského séra) je inaktivován za daných experimentálních podmínek do 72 hod. Relativně slabší imunizační účinek vakciny po dvanáctidenní inaktivaci je možno z větší části přičíst této nadbytečně dlouhé době, která byla empiricky zvolena při původním modelovém pokusu, analogicky podle zkušeností s produkcí lidské antipoliomyelitické vakciny.

#### ВЫВОДЫ

##### Инактивация вируса энцефаломиелита свиней формалином

Вирус энцефаломиелита свиней, размноженный на тканевых культурах гомологических эмбриональных почек, был инактивирован формалином в разведении 1:4 000 при pH 7,0 и 37° C. Время инактивации вируса длилось 12 дней по схеме вакцины Салька против полиомиелита, чтобы было возможно использовать его к активной иммунизации. На установление кривой инактивации следующие образцы взяты: до прибавления формалина, 24, 48, 72, 86 часов после прибавления формалина. При титрации на тканевых культурах из свиных почек получились следующие соответственные числа: 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-0,5</sup>, 0,0. До титрации образцы были диализированы 24 ч. при 4° C против раствора Ганкса.

Как явно из кривой инактивации, установленной на тканевых культурах в наших экспериментальных условиях, 72 ч. хватает для инактивации вируса. Рекомендуется в будущем проводить пробы безопасности (safety tests) на животных с вирусом формализованным не дольше чем 3—4 дня, что наверно хватает для безопасной инактивации вируса при наибольшем сохранении его иммуногенной активности. Авторы узнали, что время инактивации 12 дней, использованного при образцовой иммунизации свиней против энцефаломиелита свиней (болезни Тешена) вирусом из тканевых культур убитым формалином (EMI 7, 73, 1958), было бесполезно долгое и что вероятно антигенность вакцины уменьшилась.

## S U M M A R Y

### **Inactivation of Hog Encephalomyelitis Virus with Formalin**

Hog encephalomyelitis virus, propagated in tissue cultures of homologous embryo kidneys, was inactivated with formalin 1:4000 at pH 7.0 and 37° C. The inactivation period of the virus was 12 days, according to the schema for Salk's poliomyelitis vaccine, so it could be used for active immunization. For the determination of the inactivation curve the following samples were taken: before the addition of formalin, 24, 48, 72, 86 hrs. after the addition of formalin. On titration in pig kidney tissue cultures the following values were obtained:  $10^{-5}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-0.5}$ , 0, 0, respectively. Prior to titration samples were dialyzed for 24 hrs. at 4° C against Hanks' solution.

As is shown by the inactivation curve, determined with the aid of tissue cultures in our experimental conditions, 72 hrs. is sufficient for the inactivation of the virus. It is recommended for the future to carry out safety tests on animals with a virus treated with formalin for 3—4 days at the most, which surely is sufficient for safe inactivation of the virus while preserving the maximum of its immunogenicity. The authors also admit that the inactivation period of 12 days, used in the model immunization of swine against hog encephalomyelitis with a formalin treated virus from tissue cultures (EMI 7, 73, 1958), was needlessly prolonged and that it probably diminished the antigenic value of the vaccine.

## L I T E R A T U R A

1. Larski, Z.: *Med. weteryn.* 11, 589, 1955. — 2. Mayr, A., Schwöbel, W.: *Mh. prakt. Tierheil.* 8, 49, 1956. — 3. Patočka, F., Kubelka, Vl., Korych, B.: *Čs. Epidemiol., Mikrobiol., Imunol.* 6, 162, 1957. — 4. Korych, B., Patočka, F., Kubelka, Vl.: *Čs. Epidemiol., Mikrobiol., Imunol.* 6, 166, 1957. — 5. Bourdin, P., Atanasiu, P., Lepine, P., Jacotot, H., Valée, A.: *Ann. Inst. Pasteur* 93, 581, 1957. — 6. Patočka, F., Kubelka, Vl., Korych, B.: *Čs. Epidemiol., Mikrobiol., Imunol.* 7, 73, 1958. — 7. Patočka, F., Kubelka, Vl., Korych, B.: *J. of Hyg., Epidemiol., Microbiol., and immunol.* 2, 250, 1958. — 8. Mayr, A.: *Zblt. Bakt., I. Abt. Orig.* 172, 465, 1958.