

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

56803

Patent dodatkowy
do patentu _____

Kl. 30 h, 6

Zgłoszono: 11.XI.1964 (P 106 289)

Pierwszeństwo: _____

MKP C 12 k 5/100

Opublikowano: 10.II.1969

UKD

Twórca wynalazku: doc. dr Marian Świetlikowski

Właściciel patentu: Polska Akademia Nauk (Zakład Parazytologii), Warszawa (Polska)

Sposób wyodrębniania z kału cieląt larw nicienia Dictyocaulus viviparus, służących do wytwarzania szczepionki przeciw robaczycy płuc bydła

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wyodrębniania z kału cieląt — dawców larw nicienia Dictyocaulus viviparus, stosowanych do otrzymywania szczepionki przeciw robaczycy płuc bydła.

Znane są szczepionki przeciw diktiokaulozie np. z opisów patentowych NRF Nr 1074825 oraz szwajcarskiego Nr 370526, gdzie larwy Dictyocaulus viviparus wyodrębnia się z kału cieląt specjalnie zarażonych diktiokaulozą, naświetla promieniami Roentgena lub kobaltu, a następnie sporządza z nich szczepionkę. Stosowanie szczepionek — zawierających osłabione przez naświetlanie promieniami jonizującymi larwy — powodujących słaby przebieg diktiokaulozy i uodporniających trwale dane zwierzę na powtórne zarażenie jest od dawna znane. Natomiast masowe hodowanie larw do odpowiedniego stadium rozwojowego stanowi dotąd poważny problem techniczny, jakkolwiek zasada iż larwy te powinny być zebrane z kału cieląt zarażonych specjalnie na dawców larw jest także znana.

Problemu tego również nie rozwiązuje sposób uzyskiwania larw Dictyocaulus viviparus z kału podany w opisach wyżej wymienionych patentów, a polegający na tym, że kał zarażonych cieląt zbiera się, rozsmarowuje na cienkie warstwy i przetrzymuje w ciągu 8 dni w temperaturze pokojowej w wilgotnej atmosferze, po czym larwy splukuje wodą i zawiesinę ich poddaje filtrowaniu, wirowaniu i dekantacji.

2

Szczepionka, przygotowywana według powyższego sposobu nie daje jednak pozytywnych wyników. Jak wykazały doświadczenia przyczyną niepowodzeń jest nieodpowiedni sposób wyodrębniania larw podany w cytowanych opisach patentowych, który nie daje pożądanych efektów w stosunku do każdego szczepu pasorzyty, gdyż nie można wyodrębnić samych larw Dictyocaulus viviparus, ponieważ kultury poczynawszy od 5 dnia pokrywają się nalotem, a potem szybko rozwijającą się siecią pleśni, a ponadto pojawiają się w nich masowo nicienie wolnożyjące i ich larwy oraz larwy innych robaków, których jaja znajdują się w kale. Również zagęszczanie larw zebranych z kultur kałowych przez wirowanie prowadzi do znacznych zanieczyszczeń produktu. W efekcie hodowla larw w omawianym wyżej sposobie pozwala na uzyskanie zaledwie 10 do 30% liczby larw zawartych w świeżym kale.

W związku z powyższym konieczne było opracowanie nowego ulepszanego sposobu wyodrębniania larw Dictyocaulus viviparus z kału cieląt — dawców, który to sposób doprowadziłby możliwie dużą ilość larw do stadium inwazyjnego, gwarantując przez to opłacalność hodowli larw do produkcji szczepionki.

Będący przedmiotem wynalazku sposób wyodrębniania z kału cieląt — dawców larw nicienia Dictyocaulus viviparus, służących do wytwarzania szczepionki przeciw robaczycy płuc bydła, cha-

rakteryzuje się przede wszystkim tym, że proces dojrzewania larw w kale prowadzi się dwuetapowo. Początkowo kał rozsmarowany na płytkach lub siatkach pozostawia w ciągu 5 dni w temperaturze 20—23°C, przy czym płytki umieszcza się w pozycji pionowej pod szklanym przykryciem zanurzone w wodzie na głębokość do 1 cm. Potem spłukuje się je wodą, powtarzając tę czynność po 24 godzinach, a otrzymaną zawiesinę poddaje filtrowaniu przez filtry siatkowe o średnicy otworów 60—30 mikronów i następnie powstały osad poddaje powtórному dojrzewaniu przez pozostawienie go w akwarium wraz z ustawionymi poziomo filtrami w temperaturze 20—26°C na okres 20—22 godzin, przy czym po upływie pierwszych 12 godzin na dno akwarium wprowadza się warstwę wody o grubości do 1 cm i o temperaturze 20—26°C, wskutek czego larwy migrują w dół do warstwy wodnej, skąd zostają zebrane razem z wodą i odpowiednio skoncentrowane drogą przecedzenia kolejno przez filtry siatkowe o średnicy otworów 60—30 mikronów. Larwy pozostające jeszcze na filtrze z częścią zanieczyszczeń przepłukuje się 2—3 razy wodą.

Larwy uzyskane powyższym sposobem stosuje się do otrzymywania szczepionki przeciw diktio-
kaulozie przez poddanie ich naświetlaniu, doprowadzając do właściwego stężenia i mieszając z antybiotykiem, najkorzystniej streptomycyną w ilości 1 g na litr szczepionki. Wyniki leczenia przy użyciu tej szczepionki okazały się bardzo korzystne.

Kał cieląt — dawców opłaca się zbierać gdy liczba larw w 1 gramie kału wynosi powyżej 30. Kał rozsmarowuje się na metalowych siatkach z drutu o grubości 0,8 mm, a wielkości boku kwadratowych oczek 5 mm i o wymiarach 25 cm na 16 cm. Siatki z nałożonym na nie kałem umieszcza się w wilgotnej komorze (akwarium) o wymiarach 30×20×30 cm, której dno pokrywa woda o głębokości do 1 cm. Siatki w akwarium układa się jak plastry miodne w pozycji pionowej w statywie, znajdującym się na dnie akwarium i umożliwiającym oddzielenie od siebie poszczególnych siatek. Liczba siatek w akwarium — 15 sztuk. Grubość warstwy kału na siatce — 0,5 cm. W jednym akwarium mieści się około 3 kg kału.

Tak ustawione akwarium z siatkami przykrywa się od góry szybą o wymiarach akwarium i pozostawia w pomieszczeniu jasnym o temperaturze 20—23°C, zapewniającym możliwie wszechstronny dostęp światła do siatek, a tym samym nie dopuszcza się do intensywnego rozwoju pleśni na kulturach kałowych. Po 5 dniach rozwijają się larwy nicieni wolnożyjących, których nie udaje się oddzielić od larw pasożytów płucnych — wobec tego piątego dnia zbiera się larwy przez opłukiwanie siatek wodą. W tym czasie jednak larwy nicieni płucnych wprawdzie nie osiągają jeszcze stadium inwazyjnego, ale są wolne od niepożądanych nicieni i nie zostają uwikłane w oczkach sieci pleśni. Ilość larw zebranych tym sposobem wynosi około 80—90% liczby larw zawartych pierwotnie w kale. Czynność płukania larw

powtarza się po 24 godzinach, podnosząc przez to procent zebranych larw.

Drugim również wydajnym sposobem zbierania larw z kultur kałowych jest umieszczenie siatek z kałem w akwarium również na okres do 5 dni, po czym wyjmując je i na jedną z ich dwu powierzchni nakłada gazę bawełnianą (bandaż). Stronę z bandażem umieszcza się na płasko na tacy — siatki zaś podwarstwia wodą aż do pełnego zanurzenia. Tak ustawione tace z siatkami pozostawia się bez przykrycia w temperaturze 20—26°C przez okres 12 godzin. Warstwa gazy przyczynia się do zachowania struktury zanurzonego w wodzie kału i nie zezwala na odrywanie jego cząsteczek i przenikanie ich do wody na tacy. Larwy zaś migrują z kału i osiadają na dnie tacy, skąd zostają zebrane do dalszego dojrzewania na filtrach jak wyżej. Ten sposób postępowania pozwala także na zebranie do 90% liczby larw z kału.

Dalsze postępowanie przedstawia się następująco: zebrany z opłukiwania lub podwarstwiania siatek płyn zawierający larwy zostaje poddany filtrowaniu przez 3 kolejne filtry siatkowe, zbudowane w formie sita:

- 1) o oczkach około 60 mikronów
- 2) „ „ 30 „
- 3) „ „ 20 „

Po odciedzeniu wody na filtrach pozostają larwy z drobnymi cząsteczkami kału. Filtry wraz z larwami wstawia się do akwarium w pozycji poziomej przykrywając płytką szklaną. Larwy na filtrze przechodzą teraz w dalszy okres dojrzewania — przejście do stadium inwazyjnego, co trwa około 12 godzin przy temperaturze 20—26°C. Po tym okresie czasu filtry podwarstwia się wodą o temperaturze 20—26°C do 1 cm głębokości i pozostawia w takim stanie przez dalsze 8—10 godzin. W tym czasie larwy zebrane w osadzie na filtrze przewędrują własnym ruchem do wody podwarstwiającej filtr i osiadają na dnie akwarium. Po czym filtr — jako zbędny — usuwa się, a wodę (koncentrat larw) zlewa się do dalszego postępowania przy produkcji szczepionki, a więc naświetlania, liczenia larw, rozlewania na dawki itd.

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika również, że liczba larw potrzebna do zarażenia cieląt na dawców larw musi być inna niż to przedstawiają cytowane opisy patentowe N.R.F. i Szwajcarii. Mianowicie należy stosować dawki około 4 razy mniejsze, co nasuwa wniosek że występujący w Polsce szczep *Dictyocaulus viviparus* jest około cztery razy bardziej patogenny od opisywanego z terenu Wielkiej Brytanii, z czym się wiąże i inne właściwości immunogenne. Tym samym najkorzystniej dla produkcji wartościowej szczepionki dla danego rejonu jest używanie występującego w tym rejonie kraju szczepu pasożyta. Przytoczone niżej dane ilustrują słuszność powyższego wniosku.

Inwazyjne larwy *Dictyocaulus viviparus* przechowywano w jednakowej temperaturze na różnej głębokości słupa wody (od 1 do 50 cm) i badano ich żywotność. Okazało się, że larwy ginęły

w czasie proporcjonalnym do wysokości pokrywającego je słupa wody.

Najdłużej żyły larwy umieszczone pod najpłytszym do 1 cm słupem wody.

Trzem grupom cieląt, po 5 sztuk każda, w wieku od 2 do 3 miesięcy, zadano w celu uodpornienia ich przed reinwazją, po 2 dawki larw w odstępie 5 tygodni.

Grupa 1 pierwsza dawka 1000 larw,

druga dawka 1500 larw

Grupa 2 pierwsza dawka 500 larw,

druga dawka 500 larw

Grupa 3 pierwsza dawka 250 larw,

druga dawka 250 larw

Grupa kontrolna doświadczenia nie została zarażona. Dwa tygodnie po podaniu drugiej dawki larw, cielęta z grup 1, 2, 3, zarażano trzecią jednakową dawką złożoną z 6000 larw. Dawka taka powoduje śmierć połowy cieląt w wieku 6 miesięcy. Cielęta kontrolne zarażano zaś w tym samym czasie dawką 2500 larw.

Ogólne zachowanie się, stan kliniczny, wyniki badań kału oraz poziomu miana przeciwciał w surowicach cieląt grup 1, 2 i 3 wykazało, że cielęta z grupy 3 uodporniane 2 dawkami po 250 larw były w podobnym stopniu odporne na zarażenie dawką 6000 larw jak cielęta z grupy 1.

Cielęta grupy kontrolnej bardzo ciężko przechorowały zarażenie dawką 2500 larw, podczas gdy uodpornione cielęta z grup 1, 2 i 3 nie wykazały najmniejszych nawet klinicznych objawów inwazji po zarażeniu dawką 6000 larw.

Doświadczenie to wykazało, że cielęta uodpor-

niane 2 dawkami larw po 250 każda, są dostatecznie odporne na zarażenie dawką 6000 larw — dawką powodującą upadek połowy cieląt nieuodpornionych w wieku 6 miesięcy. W Wielkiej Brytanii stosowano zaś dawki 4000 larw, które okazały się w Polsce za wysokie i powodowały śmierć cieląt.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wyodrębniania z kału cieląt larw nicieni *Dictyocaulus viviparus*, służących do wytwarzania szczepionki przeciw robaczycy płuc bydła przez zebranie kału, rozsmarowanie go w cienkie warstwy, które poddaje się dojrzewaniu w temperaturze pokojowej w wilgotnej atmosferze, a następnie odfiltrowanie larw, **znamienny tym**, że larwy zbiera się z miejscowego szczepu pasożyta, a proces dojrzewania larw w kale prowadzi się dwuetapowo, mianowicie początkowo kał rozsmarowany na płytkach lub siatkach pozostawia w ciągu 5 dni w temperaturze 20—23°C, przy czym płytki umieszcza się w pozycji pionowej w akwarium pod przykryciem, zanurzone w wodzie na głębokość do 1 cm, po czym larwy splukuje się wodą i zawiesinę poddaje filtrowaniu przez filtry siatkowe o średnicy otworów 60—30 mikronów, a następnie powstały osad poddaje powtórnemu dojrzewaniu przez pozostawienie go wraz z filtrami w pozycji poziomej w temperaturze 20—26°C na okres 20—22 godzin, przy czym po upływie pierwszych 12 godzin na dno akwarium wprowadza się warstwę wody o grubości do 1 cm i o temperaturze 20—26°C, wskutek czego larwy migrują do warstwy wodnej.