

①9



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

①1 CH 674 149 A5

⑤1 Int. Cl.⁵: A 61 K 35/66
C 12 N 1/00

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

// (C 12 N 1/00, C 12 R 1:10, 1:125)

①2 PATENTSCHRIFT A5

②1 Gesuchsnummer: 4117/88

②2 Anmeldungsdatum: 24.02.1987

②4 Patent erteilt: 15.05.1990

④5 Patentschrift
veröffentlicht: 15.05.1990

⑦3 Inhaber:
Institut Mikrobiologii i Virusologii Imeni D. K.
Zabolotnogo Akademii Nauk Ukrainskoi SSR,
Kiev (SU)
Ukrainskaya Selskokhozyaistvennaya Akademia,
Kiev (SU)

⑦2 Erfinder:
Smirnov, Valery Veniaminovich, Kiev (SU)
Kharchenko, Svetlana Nikolaevna, Kiev (SU)
Reznik, Semen Rafailovich, Kiev (SU)
Litvin, Vladimir Petrovich, Kiev (SU)
Vjunitskaya, Valentina Alexeevna, Kiev (SU)

⑦4 Vertreter:
Patentanwälte Schaad, Balass & Partner, Zürich

⑧6 Internationale Anmeldung: PCT/SU 87/00024
(Ru)

⑧7 Internationale Veröffentlichung: WO 88/06619
(Ru) 07.09.1988

⑤4 **Arzneimittel zur Prophylaxe und Behandlung von gastrointestinalen Erkrankungen des Landwirtschaftsviehs.**

⑤7 Das Arzneimittel zur Prophylaxe und Behandlung der gastrointestinalen Erkrankungen des landwirtschaftlichen Viehs besteht aus der Biomasse des Stammes *Bacillus subtilis* TsMPM Nr. V-2335 und Biomasse des Stammes *Bacillus licheniformis* TsMPM Nr. V-2336 und einem Füllstoff beim folgenden Verhältnis der Ausgangskomponenten in Masse-%:

Biomasse des Stammes <i>Bacillus subtilis</i> TsMPM Nr. V-2335, die 150 bis 200 Mrd. Mikrobenzellen je 1 ml enthält,	45-60
Biomasse des Stammes <i>Bacillus licheniformis</i> TsMPM Nr. V-2336, die 150 bis 200 Mikrobenzellen je 1 ml enthält,	15-20
Füllstoff	alles übrige

PATENTANSPRÜCHE

1. Arzneimittel zur Prophylaxe und Behandlung der gastrointestinalen Erkrankungen des landwirtschaftlichen Viehs, das die Bakterienbiomasse vorsieht, dadurch gekennzeichnet, dass es als Bakterienbiomasse die Biomasse des Stammes *Bacillus subtilis* TsMPM Nr. V-2335 und die Biomasse des Stammes *Bacillus licheniformis* TsMPM Nr. V-2336 enthält und im Zentralmuseum für Industriemikroorganismen des Allunions-Forschungsinstituts für Genetik und Selektion der Industriemikroorganismen hinterlegt worden sind und einen Füllstoff beim folgenden Verhältnis der Ausgangskomponenten in Masse-% enthält:

Biomasse des Stammes <i>Bacillus subtilis</i> TsMPM Nr. V-2335, die 150 bis 200 Mrd. Mikrobenzellen je 1 ml enthält,	45–60
Biomasse des Stammes <i>Bacillus licheniformis</i> TsMPM Nr. V-2336, die 150 bis 200 Mrd. Mikrobenzellen je 1 ml enthält,	15–20
Füllstoff	alles übrige

2. Arzneimittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es als Füllstoff ein Gemisch aus dem Blutserum des Rindviehs oder Gelatine mit Saccharose oder Glukose enthält.

3. Verfahren zur Selektionierung der Stämme *Bacillus subtilis* TsMPM Nr. V-2335 und *Bacillus licheniformis* TsMPM Nr. V-2336 für das Arzneimittel nach Anspruch 1 oder 2 durch natürliche Auswahl nach den Merkmalen der höchsten und stabilen antagonistischen Aktivität beim Kultivieren auf künstlichen Nährmedien.

BESCHREIBUNG

Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Veterinärmedizin und betrifft insbesondere ein Arzneimittel zur Prophylaxe und Behandlung von gastrointestinalen Erkrankungen des Landwirtschaftsviehs.

Stand der Technik

In den modernen Viehzuchtanlagen, wo eine bedeutende Menge vom landwirtschaftlichen Vieh konzentriert ist, entstehen sogar beim Beachten befriedigender hygienischer Bedingungen bei einem wesentlichen Teil der Neugeborenen akute Magen- und Darmerkrankungen.

Die Hauptgründe solcher Erkrankungen bestehen darin, dass in den ersten Stunden und Tagen nach der Geburt die Tiere noch keine normale Mikroflora haben, die eine wichtige Rolle im Schutz gegen die Infektionen spielt. Zu dieser Periode können in den Organismen der Tiere aus der Umgebung (aus der Luft, aus Pflegegegenständen, von den kranken Tieren, vom Personal und von anderen Quellen) verschiedene pathogene und fakultativ pathogene Mikroorganismen (enteropathogenes Kolibakterium, Staphylokokkus, Proteus, Klebsiella, Salmonella u. a.) gelangen, die sich im Darm der Neugeborenen praktisch ungehindert vermehren, indem sie bei den Tieren gastrointestinale Erkrankungen von verschiedener Schwere hervorrufen. Die Entwicklung solcher Erkrankungen im früheren Lebensalter führt zur Abschwächung der Neugeborenen und zur Herabsetzung des Prozents der Erhaltung (zum Tod eines Teils der Tiere).

Es ist die Anwendung von Antibiotika, Sulfamid- und Nitrofuranylpräparaten sowie von Gräserdekokten und anderen Mitteln zur Behandlung akuter gastrointestinaler Erkrankungen breit bekannt. Alle diese Mittel sind jedoch nicht effektiv genug, weil eine Reihe von pathogenen und fakultativ pathogenen Mikroorganismen gegen diese Mittel resistent ist.

Zur Zeit sind die Präparate aus lebendigen Mikrobenkulturen zur Prophylaxe und Behandlung der Magen- und Darmerkrankungen der Tiere aussichtsreicher. Diese Präparate tragen zu einer künstlichen Formung in der früheren Lebensperiode der Tiere in ihrem Magendarmkanal von der Mikroflora bei, die fähig ist, die Vermehrung von pathogenen und fakultativ pathogenen Mikroorganismen darin zu unterdrücken. So ist beispielsweise ein Präparat aus lebendigen Kulturen des Mikroorganismus *Streptococcus faecium* Cernelle 68 bekannt (GB, B 1 300 446).

Das genannte Präparat sieht nur eine Art des Mikroorganismus vor, was kein breites antagonistisches Wirkungsspektrum bewirkt. Ausserdem übt das genannte Präparat keine stimulierende Wirkung auf die Schutzreaktionen des tierischen Organismus aus (induziert das endogene Interferon nicht, erhöht die Phagozytenaktivität der Blutleukozyten nicht), was dessen Anwendungsgebiet auch begrenzt.

Darstellung der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch die Veränderung der Bakterienbiomasse und die Verwendung von neuen Mikroorganismenstämmen ein Arzneimittel zur Prophylaxe und Behandlung von gastrointestinalen Erkrankungen des Landwirtschaftsviehs zu entwickeln, dass eine hohe Wirkungseffektivität besitzt, durch ein breites Wirkungsspektrum in bezug auf die Wachstumshemmung von pathogenen und fakultativ pathogenen Mikroorganismen gekennzeichnet wird, Schutzreaktionen des tierischen Organismus stimuliert, keine Komplikationen hervorruft, keine Nebenwirkung ausübt, in der Anwendung einfach ist, lange aufbewahrt werden kann.

Die Aufgabe wurde durch das erfindungsgemässe Arzneimittel zur Prophylaxe und Behandlung der gastrointestinalen Erkrankungen des Landwirtschaftsviehs, das die Bakterienbiomasse vorsieht, gelöst, das erfindungsgemäss als Bakterienbiomasse die Biomasse des Stammes *Bacillus subtilis* TsMPM- Nr. V-2335 und die Biomasse des Stammes *Bacillus licheniformis* TsMPM Nr. V-2336 enthält. Diese Stämme wurden aus wilden Kulturen durch die natürliche Auswahl nach den Merkmalen der höchsten und stabilen antagonistischen Aktivität beim Kultivieren auf künstlichen Nährmedien selektioniert.

Ausserdem sind sie im Zentralmuseum für Industriemikroorganismen des Allunions-Forschungsinstituts für Genetik und Selektion der Industriemikroorganismen VSESOJUZNY NAUCHNO-ISSLEDOVATELSKY INSTITUT GENETIKI I SELEKTSII PROMYSHLENNYKH MIKROORGANIZMOV (VNIIGENETIKA) USSR, Moscow, Dorozhny prozed, 1 hinterlegt. Das Hinterlegungsdatum ist der 22. Mai 1981. Das Arzneimittel enthält auch einen Füllstoff beim folgenden Verhältnis der Ausgangskomponenten in Masse%:

Biomasse des Stammes <i>Bacillus subtilis</i> TsMPM Nr. V-2335, die 150 bis 200 Milliarden Mikrobenzellen je 1 ml enthält,	45–60
Biomasse des Stammes <i>Bacillus licheniformis</i> TsMPM Nr. V-2336, die 150 bis 200 Milliarden Mikrobenzellen je 1 ml enthält,	15–20
Füllstoff	alles übrige.

Die Effektivität der Wirkung des erfindungsgemässen Arzneimittels wird durch die Verwendung der genannten Stämme gesichert.

Der Stamm *Bacillus subtilis* TsMPM Nr. V-2335 wird durch die Eigenschaft gekennzeichnet, eine bestimmte Zeit in verschiedenen Abschnitten des Verdauungskanals der Tiere aufrechterhalten zu werden, besitzt eine antagonistische Wir-

kung in bezug auf pathogene und fakultativ pathogene Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Salmonella Weslaco*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella stenley*, *Salmonella newport*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* und andere), stimuliert Phagozytenaktivität der Blutleukozyten, erhöht die Induktion des endogenen Interferons im tierischen Organismus, beeinflusst die normale Mikroflora nicht.

Der Stamm *Bacillus licheniformis* TsMPM Nr. V-2336 wird durch die Eigenschaft gekennzeichnet, eine bestimmte Zeit in verschiedenen Abschnitten des Verdauungskanal der Tiere aufrechterhalten zu werden, besitzt eine antagonistische Wirkung in bezug auf pathogene Bakterien und Pilze (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Candida albicans*, *Aspergillus flaves* und andere), stimuliert Phagozytenaktivität der Blutleukozyten der Tiere, beeinflusst die normale Mikroflora nicht, wird durch die fermentative Aktivität gekennzeichnet, die zu den Verdauungsprozessen beiträgt.

Als Füllstoff enthält das erfindungsgemässe Arzneimittel vorzugsweise ein Gemisch aus dem Blutserum des Rindviehs oder Gelatine mit Saccharose oder Glukose.

Die Verwendung des Blutserums vom Rindvieh oder der Gelatine trägt zur Stabilisierung biologischer Eigenschaften der Kulturen bei, die zum Arzneimittel gehören. Die Verwendung von Saccharose oder Glukose bewirkt optimale Bedingungen der Lyophilisierung bei der Herstellung des Arzneimittels, indem diese biologische und physikalische Eigenschaften bei der Aufbewahrung und eine gute Mischbarkeit mit dem Lösungsmittel des Präparats während seiner Anwendung aufrechterhält.

Bester Weg zur Ausführung der Erfindung

Das erfindungsgemässe Arzneimittel besteht aus der Biomasse der genannten neuen Stämme. Die Stämme *Bacillus subtilis* TsMPM Nr. V-2335 und *Bacillus licheniformis* TsMPM Nr. V-2336 sind im Zentralmuseum für Industriemikroorganismen des Allunions-Forschungsinstituts für Genetik und Selektion der Industriemikroorganismen hinterlegt worden. Der Stamm *Bacillus subtilis* TsMPM Nr. V-2335 wurde aus wilden Kulturen isoliert und im Prozess der Untersuchung seiner natürlichen Veränderlichkeit bei der Kultivierung auf künstlichen Nährmedien durch die Auswahl der Varianten selektioniert, die durch die höchste und gleichzeitig stabile (im Laufe von mindestens 50 Passagen) antagonistische Aktivität gekennzeichnet werden.

Der Stamm hat folgende kulturell-morphologische und physiologisch-biochemische Besonderheiten: die Zellen sind von stäbchenartiger Form, im Präparat der «zerdrückte» oder «hängende» Tropfen beweglich, grampositiv, produzieren Katalase; unter aeroben Bedingungen bildet der Stamm Sporen, die in der Zelle zentral angeordnet sind. Die Kultur wächst reichlich auf den üblich gebräuchlichen Nährmedien (Fleisch-Peptonagar, Würzeagar, Medium nach Gromyko, Kartoffelagar). Auf dem Fleisch-Peptonagar bildet Kolonien, die eine unregelmässige Form mit faltiger matter Oberfläche von weissem oder weisslich-cremefarbenem Ton mit zerschnittenen zackigen Rändern haben. Die Kolonien können auch rund, glatt mit glänzender Oberfläche und ebenen Rändern sein. Die beiden Kolonienarten lassen sich vom Agar mit der Öse abnehmen. Beim Wachstum auf der Fleisch-Peptonbouillon bildet die Kultur einen Film. In den Abstrichen der 18 Stunden alten Kultur werden gerade grampositive Zellen von stäbchenartiger Form, von $2,0-2,2 \times 0,7-0,85 \mu\text{m}$ Grösse nachgewiesen, die einzeln oder in Form von Ketten angeordnet sind. Bei der Sporenbildung schwellen die Zellen nicht an, nach dem Wachstum auf dem Glukoseagar werden im Protoplasma keine Ein-

schlüsse von Poly- β -oxybuttersäure nachgewiesen. Die Kultur fermentiert Glukose, Arabinose, Mannit, Xylose unter Säurebildung ohne Gas. Die Reaktion nach Foges-Proskower ist positiv. Die Kultur bildet kein Gas aus NO_3 unter anaeroben Bedingungen, produziert Arginindihydrolase nicht. Die Kultur wächst auf dem Nährmedium, das 7% NaCl enthält, hydrolysiert Stärke, Gelatine, verwertet Zitrat, nutzt Propionat nicht aus, besitzt keine Lezithinasenaktivität, ist für Warmblüter nicht pathogen.

Der Stamm *Bacillus licheniformis* TsMPM Nr. V-2336 wurde aus wilden Kulturen isoliert und im Prozess der Untersuchung dessen natürlicher Veränderlichkeit bei der Kultivierung auf künstlichen Nährmedien durch die Auswahl der Varianten selektioniert, die durch die höchste und zugleich stabile (im Laufe von mehr als 45 Passagen) antagonistische Aktivität gekennzeichnet werden.

Der Stamm hat folgende kulturell-morphologische und physiologisch-biochemische Besonderheiten: die Zellen sind von stäbchenartiger Form, im Präparat der «zerdrückte» oder «hängende» Tropfen beweglich, von $2,4-2,7 \times 0,5-0,75 \mu\text{m}$ Grösse, hauptsächlich in Form von Ketten angeordnet. Die Sporen sind oval, in der Zelle zentral angeordnet, quellen die Zelle nicht auf. Nach dem Wachstum auf dem Glukoseagar werden im Protoplasma 25 keine Globula nachgewiesen.

Auf dem Fleisch-Peptonagar haben die Kolonien eine trübe grobe Oberfläche, sind undurchsichtig. Sie können auch eine glänzende glatte Oberfläche aufweisen. Die beiden Kolonienarten haften an Agar dicht an und lassen sich mit der Öse schwer abnehmen. Nicht selten wird auf der Oberfläche Schleim nachgewiesen.

Die Kolonien alter Kulturen können eine dunkelbraune Farbe bekommen. Auf dem Fleisch-Peptonagar wird ein faltiger Film manchmal mit cremefarbener Schattierung gebildet. Die Kultur bildet Katalase. Wird durch Fähigkeit gekennzeichnet, auf dem Agar unter anaeroben Bedingungen zu wachsen. Weist eine positive Reaktion nach Foges-Proskower auf, wächst auf einem Nährmedium, das 7% NaCl enthält, hydrolysiert Stärke, Kasein, hydrolysiert Harnstoff nicht. Verdünnt Gelatine langsam. Beim Wachstum auf der Fleisch-Peptonbouillon bildet Ammoniak, bildet kein Indol, keinen Schwefelwasserstoff. Fermentiert Glukose, Laktose, Mannit unter Säurebildung. Reduziert Nitrate, bildet unter anaeroben Bedingungen Gas aus Nitraten. Die Kultur besitzt keine Koagulasen-, Hyaluronidasen- und Lezithinasenaktivität, ist für Warmblüter nicht pathogen.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel stellt eine poröse kristallisierte trockene wasserunlösliche Masse von hellbraunem Ton dar, bildet in Wasser und Milch eine homogene vollständige Suspension. Der Masseanteil von Wasser beträgt höchstens 5%. Das Präparat wird in Glasampullen mit einem Gehalt an Trockensubstanz von 250 mg (300 bis 400 Mrd. Mikrobenzellen) oder in Glasflaschen mit einem Gehalt an Trockensubstanz von 500 mg (600 bis 800 Mrd. Mikrobenzellen) hergestellt.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel kann als Mittel zur Prophylaxe oder Behandlung von akuten gastrointestinalen Erkrankungen des landwirtschaftlichen Jungviehs angewendet werden (Dysbakteriosis, Kollbakteriosis, Salmonellosis, verschiedene andere aktive gastrointestinale Erkrankungen des landwirtschaftlichen Viehs, die durch pathogene und fakultativ pathogene Mikroorganismen hervorgerufen werden).

Das Verfahren zur Anwendung des Arzneimittels zwecks Prophylaxe besteht in folgendem: der Ampulleninhalt, in welchen 300 bis 400 Mrd. lebensfähige Mikrobenzellen enthalten sind, wird in 1 l gekochter und auf eine Temperatur von 25 bis 30 °C abgekühlter Milch oder gekochtem und auf

eine Temperatur von 25 bis 30 °C abgekühltem Wasser vermischt und 200 ml Gemisch werden dem neugeborenen Vieh vor der Fütterung mit Kolostralmilch, jedoch spätestens 1 bis 2 Stunden nach der Geburt gegeben; nachher wiederholt man die Prozedur nach 24 und 48 Stunden.

Das Verfahren zur Anwendung des Arzneimittels zum therapeutischen Zweck besteht in folgendem: der Ampulleninhalt, in welchem 300 bis 400 Mrd. lebensfähige Mikrobenzellen enthalten sind, wird in 1 l gekochter und auf eine Temperatur von 25 bis 30 °C abgekühlter Milch oder gekochtem und auf eine Temperatur von 20 bis 30 °C abgekühltem Wasser vermischt und je 200 ml Gemisch werden dem kranken Vieh 2 bis 3mal täglich bis zur Genesung gegeben.

Die Anwendung des erfindungsgemässen Arzneimittels zum therapeutischen Ziel schliesst die Verordnung den Tieren anderer Mittel der pathogenetischen Therapie ausser der peroralen Einführung von Antibiotika nicht aus. In den empfohlenen Dosen ruft es keine Komplikationen hervor und übt keine Nebenwirkungen aus. Es gibt keine Kontraindikationen zur Anwendung des erfindungsgemässen Arzneimittels. Die Verwendung des Arzneimittels in der veterinären Praxis verlangt keine Sicherheitsmassnahmen.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel wurde zwecks Prophylaxe und Behandlung der gastrointestinalen Erkrankungen des landwirtschaftlichen Jungviehs untersucht. Zum prophylaktischen Ziel wurde das Arzneimittel bei 328 neugeborenen Kälbern verwendet. Die Verwendung des erfindungsgemässen Arzneimittels wurde folgenderweise verwirklicht. Der Ampulleninhalt (300 bis 400 Mrd. Mikrobenzellen) wurde in 1 l gekochter und auf eine Temperatur von 25 bis 30 °C abgekühlter Milch oder gekochtem und auf eine Temperatur von 20 bis 30 °C abgekühltem Wasser vermischt und den Tieren individuell in den ersten 2 bis 3 Stunden nach der Geburt zu je 200 ml, nachher wiederholt am zweiten und dritten Tag ebenso zu je 200 ml gegeben. In einzelnen Fällen wurde das Arzneimittel auch am 4. bis zum 7. Tag gegeben. Parallel wurde der Versuch an Kontrollgruppe der Tiere (185 Köpfe) durchgeführt, wo allgemein übliche prophylaktische Massnahmen getroffen wurden. Die Kälber wurden innerhalb von einem Monat beobachtet. Die Tiere wurden am Geburtstag und 30 Tage nach der Geburt gewogen.

Die Ergebnisse der Untersuchung des erfindungsgemässen Arzneimittels zeigten, dass aus 328 neugeborenen Kälbern, die das angebotene Arzneimittel erhielten, 19 davon die Störungen des Magendarmkanals aufwiesen. In der Kontrollgruppe erkrankten von 185 123 Tiere, 4 davon starben. Auf diese Weise wurde die Morbidität dank der Anwendung des angebotenen Arzneimittels um das 10fache herabgesetzt.

Zum therapeutischen Ziel wurde das erfindungsgemässe Arzneimittel an 284 Kälbern mit verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen angewendet, die durch enteropathogene Stämme von Kolibakterium, durch Staphylokokkus, Proteus, Klebsiella, Salmonella induziert wurden. Das erfindungsgemässe Arzneimittel wurde folgenderweise verwendet. Der Ampulleninhalt (300 bis 400 Mrd. Mikrobenzellen) wurde in 1 l gekochter und auf eine Temperatur von 25 bis 30 °C abgekühlter Milch oder gekochtem und auf eine Temperatur von 25 bis 30 °C abgekühltem Wasser vermischt und den Tieren bis zur Genesung (gewöhnlich innerhalb von 4 bis 5 Tagen) gegeben. Im Ergebnis der Anwendung des angebotenen Arzneimittels zum therapeutischen Ziel überlebten 279 von 284 Tieren. In den Kontrollgruppen aus 134 Tieren, die mit Antibiotika, Chemotherapeutika, Gräserdekoten und anderen Methoden behandelt wurden, gingen 18 Tiere zugrunde.

Somit ist das Überleben der Tiere unter Ausnutzung des

Arzneimittels um 12% höher, als unter Ausnutzung der allgemein üblichen Massnahmen.

Auf Grund der durchgeführten Untersuchungen wies das erfindungsgemässe Arzneimittel eine hohe therapeutisch-prophylaktische Effektivität auf. Das Arzneimittel wird durch ein hohes antagonistisches Wirkungsspektrum in bezug auf verschiedene Arten der Mikroorganismen — der Erreger von gastrointestinalen Erkrankungen des Viehs gekennzeichnet. Das Arzneimittel trägt zur Erhöhung der Schutzreaktionen des tierischen Organismus bei (die Induktion des endogenen Interferons, die Erhöhung der Phagozytenaktivität der Blutleukozyten). Die Anwendung des Arzneimittels ist einfach, es ist unschädlich und ungefährlich, verlangt keine Veränderung der Technologie der Fütterung und Aufzucht des neugeborenen Viehs.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel wird folgenderweise hergestellt.

Die Kulturen des Stammes *Bac. subtilis* TsMPM Nr. V-2335 und *Bac. licheniformis* TsMPM Nr. V-2336 werden vereinzelt innerhalb von 18 Stunden und 12 Tagen auf dem Würzeagar bei einer Temperatur von 28 °C gezüchtet. Die gewachsenen Biomassen der Kulturen werden mit sterilem Leitungswasser abgewaschen und es werden Suspensionen bereitgestellt, die 150 bis 200 Mrd. Mikrobenzellen in 1 ml enthalten. Es werden gleiche Volumina der 12 Tage alten und der 18 Stunden alten Kultur *Bac. subtilis* TsMPM Nr. V-2335 und besonders gleiche Volumina der 12 Tage alten und 18 Stunden alten Kultur *Bac. licheniformis* TsMPM Nr. V-2336 vereinigt.

Nachher wird das Präparat bei folgenden Komponentenverhältnissen in Gew. % hergestellt: die Biomasse des Stammes *Bac. subtilis* TsMPM Nr. V-2335 45 bis 60; die Biomasse des Stammes *Bac. licheniformis* TsMPM Nr. V-2336 15 bis 20; der Füllstoff — alles übrige.

Als Füllstoff wird ein Gemisch aus Blutserum des Rindviehs oder Gelatine mit Saccharose oder Glukose ausgenutzt.

Das erhaltene Gemisch wird in sterile Ampullen abgefüllt und im Kühlschrank für 24 Stunden bei einer Temperatur von höchstens -20°C untergebracht. Die Lyophilisierung des Arzneimittels wird innerhalb von mindestens 44 Stunden bei einer Temperatur von -20°C bis $+20^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Nach der Lyophilisierung werden die Ampullen zugeschmolzen.

Das angebotene Arzneimittel hält die Aktivität bei einer längeren Aufbewahrung innerhalb von mindestens 2 Jahren aufrecht.

Zum besseren Verständnis der vorliegenden Erfindung werden folgende konkrete Varianten der Zusammensetzung des angebotenen Arzneimittels, die Prüfung dessen Unschädlichkeit und spezifischer Aktivität angeführt.

Beispiel 1.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel folgender Zusammensetzung in Ma. %:

Biomasse des Stammes <i>Bac. subtilis</i> TsMPM Nr. V-2335	45
Biomasse des Stammes <i>Bac. licheniformis</i> TsMPM Nr. V-2336	20
Blutserum des Rindviehs	32
Saccharose	3

Alle Komponenten werden vermischt, in sterile Ampullen zu je 2 ml abgefüllt, für 24 Stunden bei einer Temperatur von höchstens -20°C untergebracht und dann innerhalb von mindestens 44 Stunden bei einer Temperatur von -20°C bis $+20^{\circ}\text{C}$ lyophilisiert. Nach der Lyophilisierung werden die Ampullen zugeschmolzen. Es werden die Unschädlichkeit und die spezifische Aktivität des Arzneimittels geprüft.

Die Unschädlichkeitsprüfung wird nach folgendem Test durchgeführt: bei der peroralen Einführung der 10%igen wässrigen Arzneimittellösung mindestens 5 Mäusen von 18 bis 22 g Körpergewicht in einer Menge von 5000 mg pro 1 kg lebendige Masse müssen alle Mäuse am Leben und klinisch gesund während 3 Beobachtungstage bleiben.

Die Prüfung der spezifischen Aktivität wird folgenderweise durchgeführt. Es werden antagonistische Eigenschaften der Assoziation der Mikrobenzellen, die dem Arzneimittel angehören, in bezug auf eine Reihe von Test-Mikroorganismen untersucht (Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus, Candida tropicalis).

Um die antagonistische Aktivität zu prüfen, wird die Assoziation der Kulturen, die dem Arzneimittel angehören, auf die Petrischale mit dem Nährmedium Nr. 2 nach Gause strichartig dem Durchmesser entlang ausgesät und nach 48 Stunden langem Wachstum wird bei einer Temperatur von 37°C parallel zu der aufgewachsenen Assoziation die Suspension der Test-Mikroorganismen, die 200 Millionen Mikronemzellen enthält, strichweise aufgetragen. Nach 18 Stunden langem Wachstum bei einer Temperatur von 37°C müssen die Hemmungszonen des Wachstums der Test-Kultur mindestens 10 bis 15 mm betragen.

Die Prüfungsergebnisse sind in der Tabelle dargestellt.

Beispiel 2.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel folgender Zusammensetzung in Ma. %:

Biomasse des Stammes Bac. subtilis	60
TsMPM Nr. V-2335	
Biomasse des Stammes Bac. licheniformis TsMPMP Nr. V-2336	20
5%ige Gelatinelösung	15
Glukose	5

Die Herstellung und die Prüfung des Arzneimittels werden ähnlich mit dem Beispiel 1 durchgeführt. Die Prüfungsergebnisse sind in der Tabelle dargestellt.

Beispiel 3.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel folgender Zusammensetzung in Ma. %:

Biomasse des Stammes Bac. subtilis	50
TsMPM Nr. V-2335	
Biomasse des Stammes Bac. licheniformis TsMPM Nr. V-2336	15
Blutserum des Rindviehs	32
Saccharose	3

Die Herstellung und die Prüfung des Arzneimittels werden ähnlich mit dem Beispiel 1 durchgeführt. Die Prüfungsergebnisse sind in der Tabelle dargestellt.

Beispiel 4.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel folgender Zusammensetzung in Ma. %:

Biomasse des Stammes Bac. subtilis	
5 TsMPM Nr. V-2335	55
Biomasse des Stammes Bac. licheniformis TsMPM Nr. V-2336	20
5%ige Gelatinelösung	21
Saccharose	4

10 Die Herstellung und die Prüfung des Arzneimittels werden ähnlich mit dem Beispiel 1 durchgeführt. Die Prüfungsergebnisse sind in der Tabelle dargestellt.

Beispiel 5.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel folgender Zusammensetzung in Ma. %:

Biomasse des Stammes Bac. subtilis	
15 TsMPM Nr. V-2335	52
Biomasse des Stammes Bac. licheniformis TsMPM Nr. V-2336	18
20 Blutserum des Rindviehs	25
Glukose	5

Die Herstellung und die Prüfung des Arzneimittels werden ähnlich mit dem Beispiel 1 durchgeführt. Die Prüfungsergebnisse sind in der Tabelle dargestellt.

Beispiel 6.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel folgender Zusammensetzung in Ma. %:

Biomasse des Stammes Bac. subtilis	
25 TsMPM Nr. V-2335	58
30 Biomasse des Stammes Bac. licheniformis TsMPM Nr. V-2336	17
Blutserum des Rindviehs	22
Saccharose	3

35 Die Herstellung und die Prüfung des Arzneimittels werden ähnlich mit dem Beispiel 1 durchgeführt. Die Prüfungsergebnisse sind in der Tabelle dargestellt.

Beispiel 7.

Das erfindungsgemässe Arzneimittel folgender Zusammensetzung in Ma. %:

Biomasse des Stammes Bac. subtilis	
40 TsMPM Nr. V-2335	45
Biomasse des Stammes Bac. licheniformis TsMPM Nr. V-2336	15
45 Blutserum des Rindviehs	37
Glukose	3

Die Herstellung und die Prüfung des Arzneimittels werden ähnlich mit dem Beispiel 1 durchgeführt. Die Prüfungsergebnisse sind in der Tabelle dargestellt.

Tabelle. Ergebnisse der Prüfung des erfindungsgemässen Arzneimittels

Präparate des erfindungsgemässen Arzneimittels gemäss Beispielen	Unschädlichkeit des Arzneimittels	Antagonistische Aktivität (Ausmass der Hemmungszonen in bezug auf Test-Kulturen in mm)		
		Salmonella typhimurium	Staphylococcus aureus	Candida tropicalis
1	unschädlich	10	15	12
2	unschädlich	11	16	13
3	unschädlich	11	16	13
4	unschädlich	11	16	13
5	unschädlich	11	16	13
6	unschädlich	11	16	12
7	unschädlich	10	15	12

65

Gewerbliche Verwertbarkeit
Das erfindungsgemässe Arzneimittel kann als Mittel zur Prophylaxe und Behandlung der akuten gastrointestinalen

Erkrankungen des landwirtschaftlichen Jungviehs Verwendung finden.