



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

218148
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 21 05 80
(21) (PV 3556-80)

(40) Zveřejněno 25 06 82

(45) Vydáno 15 02 85

(51) Int. Cl.³
A 23 K 1/18
// C 07 G 7/00

(75)
Autor vynálezu KOREC EVŽEN ing., PRAHA

(54) Přípravek ke zvýšení odolnosti mláďat hospodářských zvířat

1

Jedná se o instantní, rychle použitelný přípravek s kontrolovatelnými složkami, umožňující při podání per os rychlé vytvoření zásob imunoglobulinů — a tím obratnosti mláďat hospodářských zvířat proti infekčním onemocněním.

V přípravku je použito levného gammaglobulinu směsného o nízké elektroforetické čistotě, získaného z jateční krve. Enzymatická aktivita mláďat je inhibována trypsinovým inhibitorem průmyslové kvality, získaným při výrobě přípravků léčebných a diagnostických. Obdobně v průmyslové kvalitě je použit emulgátor C.

Přípravku může být alternativně použito při chovu hospodářských zvířat proti infekčním onemocněním mláďat.

Může být rovněž použit jako preventivní prostředek proti infekčním onemocněním mláďat některých savců.

2

Vynález se týká instantního přípravku ke zvýšení odolnosti mláďat hospodářských zvířat.

Ke snížení ztrát způsobených úhynem mláďat hospodářských zvířat je mimo zlepšení hygienických a dalších podmínek chovu, vitaminové a komplexní výživy, způsobem přechodu na rostlinnou výživu apod., velmi důležitým činitelem zvýšení odolnosti mláďat proti infekčním onemocněním.

Narozená hospodářská zvířata začínají poměrně pozdě vytvářet obranné látky proti antigenům patogenních mikrobů působícím vážná infekční onemocnění. Například telata začínají vytvářet vlastní imunoglobuliny až po čtyřech týdnech po narození a úplnou jejich hladinu lze zjistit v krevním séru až po osmi týdnech po narození.

V krátkém časovém období po narození mají mláďata schopnost přijímat gastrointestinálním traktem imunoglobuliny (telata, kůzlata a jehňata do 24 hodin, selata do 36 hodin po narození).

Vzhledem ke kvantitativně a kvalitativně odlišnému obsahu imunoglobulinů v kolostru jednotlivých samic, je významným činitelem ke včasnému posílení nedostatečné nebo neúplně vyvinuté imunologické reakce mláďat — podání imunoglobulinů zažívacím traktem.

Intenzivní výzkum přenosu pasivní imunity z matky na mláďe prováděný již více než 70 let přinesl jednoznačné závěry. Například T. Smith a R. B. Little v roce 1922 redukovali úhyn telat, kterým nebylo dáno kolostrum, podáním krevního séra dospělých zvířat způsobem per os nebo intravenózním („Cow serum as a substitute for colostrum in new born calves“ *Journal exper. Medic.* 36, 453—468).

Průchod imunoglobulinů z krevního séra dospělých zvířat do krevního oběhu telat jejich gastrointestinálním traktem byl později dokázán např. C. P. Millsteinem a A. Feinsteinem („Structural differences and similarities between two bovin immunoglobulins Ig — G 1 a IG — G 2“, A. R. C. Institute of Animal Physiology, Babraham, Cambridge, Report for 1966 — 1967, p. 41).

Jednoznačně byla rovněž zjištěna doba přenosu pasivní imunity gastrointestinálním traktem mláďate. Např. T. W. Brambell stanoví tuto dobu u hovězího dobytka 24 hodin po narození, u prasete 36 hodin, u ovcí, koz a koní 24 hodin, u psů a koček 1 až 2 dny „Transmission of passive immunity from mother to young, „North Holland Publishing Company, Amsterdam, London 1970).

Pokud jde o tvorbu vlastních protilátek mláďate zjistili např. R. G. Hansen a P. H. Phillips v letech 1947 až 1949, že jednotlivé frakce sérových proteinů telat, která nebyla napájena kolostrum dosáhly normální výše až po 8 týdnech po narození a že do 4 týdnů po narození neprodukuje telata vlastní protilátky vůbec. („Studies on proteins

from bovine colostrum“, *Journal biol. Chem.* 179, 523 až 527).

Důležitý je též poznatek zjištěný v roce 1961 výzkumem J. T. Hubera, N. L. Jakobsona, R. S. Allena, P. A. Hartmana, že aktivita trávicích enzymů narozených telat (pankreatická amyláza, lipáza a proteáza) je nejnižší během prvních dnů po narození, vzrůstá během týdne a později se mění již jen nepatrně („Digestive enzyme activities in the young Calf“, *Journal Dairy Sci.* 44, 1491 až 1501).

Na základě výzkumných poznatků je ve světě i v tuzemsku vyráběna řada přípravků, které mají sloužit k transmissi imunoglobulinu gastrointestinálním traktem narozených mláďat hospodářských zvířat.

Podstata vynálezu spočívá ve vhodném složení přípravku, v jednoduché použitelnosti, kontrolovatelnosti jednotlivých složek přípravku a v jeho způsobu výroby.

Složení přípravku zabraňuje jak při výrobě, tak použití možnost denaturace imunoglobulinů. Jako účinná složka je použit sérový gamaglobulin vyrobený z krevního séra běžných jatečních zvířat. Instantní forma zajišťuje snadnou rozpustnost přípravku v nezávadné vodě nebo fyziologickém roztoku a tím i snadné a rychlé použití v kteroukoliv hodinu v provozních zemědělských podmínkách bez odborného veterinárního dozoru.

Složení instantní směsi pro různé alternativní použití respektuje nutnost zamezení štěpení imunoglobulinů v gastrointestinálním traktu mláďat a tím umožňuje jejich průchodnost do krevního oběhu.

Svým charakterem jde o přípravek umožňující uplatnění gnotobiologických a jiných poznatků, neboť instantní směs má jednotlivé složky kontrolovatelné. Instantnost přípravku pak umožňuje jeho snadné a rychlé (v omezeném časovém termínu) podání přípravku.

V přípravku je používáno mimo globuliny směsných vyrobených levně z jateční krve též v některých případech specifických globulinů imunizovaných zvířat. Lze použít gamaglobulinů o menší elektroforetické čistotě a o nižších titrech účinných protilátek (bez koncentrace), nevádí příměs albuminu a jiných frakcí obsažených v krevním séru.

Přípravek se skládá z mikrobiologicky nezávadného odstředěného šetrně sušeného mléka, jednoduchých proteinů, monosacharidu a podmíněně též z některých dalších přísad, umožňujících velmi rychlou smáčivost a rozpustnost sušeného přípravku ve vlažné nezávadné vodě.

Základní médium je doplňováno různými druhy jednoduchých proteinů (imunoglobuliny směsnými nebo specifickými, a to gammaglobuliny (bovinními, ovčími, kozími nebo prasečími).

Obdobně jako globuliny prostupuje zažívacím traktem monosacharid (D glukóza),

a to bez nutného štěpení, jako je tomu u laktózy, sacharózy nebo maltózy.

Monosacharid je přidáván proto, aby byl udržen zvýšený poměr globulinů v krevní plazmě. Jde o to, aby u mláďete v případě delšího trávení (hladovění) neklesal obsah globulinů v krevní plazmě (při zvyšování obsahu albuminu).

Při výrobě, skladování a použití výrobku je zabráněno denaturaci imunoglobulinů. Vysoká teplota, kyseliny, zásady nebo soli těžkých kovů nevratným procesem denaturace působí ztrátu biologických vlastností proteinů, přípravky obsahující enzymy nebo jejich zbytky proteiny štěpí.

V různých alternativách přípravků je proto zajišťováno inhibování trypsinu.

Podle potřeby použití vznikají různé druhy výrobků, a to podle druhů globulinů (bovinní, ovčí, kozí, prasečí) a podle titru účinných protilátek (imunoglobulinů) směsné nebo specifické přípravky.

Svým charakterem jde o přípravky umožňující rychlé doplnění zásob imunoglobulinů jako vhodné přídatné krmivo použité v několikahodinových intervalech krátce po narození mláďete. Nejde tedy o přípravek léčebný nebo preventivně léčebný s přesně vyznačenými titry účinných protilátek.

Přípravek na zvýšení odolnosti mláďat hospodářských zvířat v sušeném stavu (podle alternativ použití) obsahuje

odstředěné mléko v množství 703,8 až 860,2 hmotných dílů
D-glukózu v množství 32,5 až 48,75 hmotných dílů
škrobový sirup v množství do 2,5 hmotných dílů
emulgátor C v množství 0,675 až 0,825 hmotných dílů
gammaglobulin směsný v množství 4,5 až 9 hmotných dílů
hydrofosforečnan sodný v množství 0,133 až 1,47 hmotných dílů

případně další přísady (vitaminy, aminokyseliny atd.) vyznačující se tím, že obsahuje (bovinní) gammaglobulin směsný z jateční krve o nízké elektroforetické čistotě (90 až 95 %) v množství 4,5 až 9 hmotných dílů, trypsinový inhibitor ze sójových bobů, nebo bovinních plic případně jiný inhibitor průmyslové kvality 140 UI BAEE 1 mg v množství 0,060 až 0,24 hmotných dílů, nebo lyofilizované prasečí kolostrum a emulgátor C v množství 0,675 až 0,825 hmotných dílů.

Přípravek podle bodu 1 vyznačuje se tím, že obsahuje navíc lyofilizované (bovinní) kolostrum v objemu 20 až 30 hmotných dílů. Vyznačuje se dále tím, že jde o konečnou formu alternativně pro různé použití vyrobeného přípravku se všemi na nezávadnost kontrolovatelnými složkami, jehož instantní schopnost zároveň umožňuje okamžité a opakovatelné rychlé podání přípravku na-

rozeným hospodářským zvířatům v běžných provozních zemědělských podmínkách.

Způsob výroby směsi např. pro narozená telata je proveden běžným provozním způsobem, a to tak, že se mléko po zkoušce bakteriologické nezávadnosti s přidáním D-glukózy, emulgátoru C a hydrofosforečnanu sodného zahušťuje na odparkách na 50 % (± 5 % sušiny, k zahuštěné směsi se přidá vmícháním škrobový sirup a suší se šetrně na rozprašovací sušárně. Po vychladnutí, instantizaci a zkouškách nezávadnosti provedených obvyklým způsobem vyznačuje se další postup tím, že druhá fáze přípravy výrobku se provádí tak, aby byla zachována expirační lhůta konečného výrobku, základní sušené médium se dokonale mísí s lyofilizovaným gammaglobulinem, inhibitorem trypsinu, lyofilizovaným kolostrum a případně dalšími přísadami při maximálním zahřátí směsi do 30 °C.

Přípravek použitelný k doplnění imunoglobulinů mláďatům zažívacím traktem má několik alternativ odvislých od způsobu použití, zejména zde slouží k doplnění imunoglobulinů obsažených v kolostru, nebo zda je k dispozici nezávadné lyofilizované kolostrum nebo zda má přípravek nahradit kolostrum úplně při ozdravných chovech, nebo zda je přípravek určen k rychlému podání mláďeti v noci.

Základní varianty a jejich obměny je možno použít při laboratorní nebo průmyslové výrobě přípravku pro jednotlivé druhy zvířat: telata (s bovinním sériovým gammaglobulinem směsným nebo specifickým, jehňata (s gammaglobulinem z ovčího séra), kůzlata (s gammaglobulinem z kozího séra), selata (s gammaglobulinem prasečím), hříbata (s gammaglobulinem koňským), psi (s gammaglobulinem ze psiho krevního séra) apod.

Příklad běžného, nákladově nenáročného přípravku pro telata vyrobeného laboratorním a průmyslovým způsobem.

Složení přípravku:

a) laboratorní, výroba 10 dávek

7820 g odstředěného mléka (ošetřeného a získaného předepsaným způsobem)
325 g D glukóza
25 g škrobový sirup
7,5 g emulgátor C
45 g bovinní gammaglobulin směsný lyofilizovaný
0,7 g trypsinový inhibitor (140 UI — BAEE/1 mg)

b) průmyslová, výroba 10 000 dávek

7,82 · 10⁶ g odstředěného mléka (ošetřeného a získaného předepsaným způsobem)

32,5	.10 ⁴	g glukóza
25	.10 ³	g emulgátor C
6	.10 ⁴	g bovinní gammaglobulin směsný
7	.10 ²	g trypsinový inhibitor (140 UI BAEE)

1. Mléko (ošetřené a připravené předepsaným způsobem) po zkoušce bakteriologické nezávadnosti s přidavkem D glukózy a emulgátoru se zahušťuje na odparkách na 50 % ($\pm$ 5 % sušiny).

2. K zahuštěné směsi se přidá škrobový sirup vmícháním a suší se šetrně na rozprašovací sušárně.

3. Po vychladnutí a instantizaci je provedena zkouška kvality a bakteriologické nezávadnosti (podle norem humánního sušeného přípravku).

4. Pokud možno v kratší době před vyskladňováním se polotovar dokonale mísí s lyofilizovaným bovinním gammaglobulinem.

Požadavky na výrobek (sušené médium):

a) výrobek musí mít čistý neporušený obal uzavřený a označený se zřetelným označením data výroby,

b) barva žlutá až světlehnědá,

c) konzistence sypká, různá velikost smíšených částic, bez cizích příměsí,

d) největší obsahy prvků na 1000 g sušiny:

měď 2 mg, cín 2 mg, olovo 1,5 mg,

e) mikrobiologické požadavky:

celkový počet mikroorganismů v 1 g sušiny nejvýše 100 000

počet koliformních mikrobů v 1 g sušiny nejvýše 20

výrobek nesmí obsahovat patogenní a toxigenní organismy,

f) smáčivost dle Mohra při 40 °C ... 60 s

g) ve 100 g sušiny je přibližně 22 g bílkovin, 35 g mléčného cukru, 32 g glukózy, 1 g tuku, 4 g vody a 6 g minerálních a jiných látek,

h) fyzikálně chemické rozbory se provádějí podle ČSN 570 105, mikrobiologické rozbory podle metodiky ČSN 57 0101, rovněž vzorkování, počet a druh podle vyšetření sušených výrobků průmyslově vyráběných podle ČSN 570 101.

Míchání konečného výrobku

Při mísení je dbáno, aby nedošlo k zahřátí výrobku na více než 30 °C. Při dobrém smísení v mísicím zařízení se směs rozplní do hygienických obalů. Základní médium (polotovar) se dokonale mísí s lyofilizova-

ným gammaglobulinem, případně dalšími přísadami, jako trypsinovým inhibitorem, lyofilizovaným kolostrem, vitaminy, aminokyselinami atd. Nelze použít látky obsahující nebo tvořící zásady, kyseliny nebo vzniklé enzymatickým štěpením.

Vlastnosti jednotlivých surovin:

Mléko

a) pro laboratorní přípravu výrobku (v menším množství) je vhodné použít mléko od krav zdravých, vitamínově dobře krmených (pokud možno od krav dojených bezprostředně po odstavení telat)

dojení je provedeno tak, aby byla zajištěna hygienická nezávadnost mléka,

před přípravou (pro jednotlivá použití smísením v předepsaném poměru s gammaglobulinem a D-glukózou, je nutné uchovat v teplotě od 0° do + 3° v uzavřených sterilních nádobách

kyselost mléka nesmí překročit 8,0 °SH

nesmí být použito konservačních prostředků (ani H₂O₂ peroxid vodíku), je možné v nutných případech použít lyofilizace.

je provedena zkouška bakteriologické nezávadnosti přípravku

b) Pro průmyslové zpracování

je nutné použít mléko od krav zdravých dobře vitamínově krmených (pro výrobu 10 000 kusů přípravku se jedná o potřebu mléka nadojeného 1 den od přibližně 800 krav),

zvířata musí být hygienicky ošetřována, dojení musí být provedeno do dobře vymytých nádob

mléko musí být urychleně dodáno ke zpracování v dobře vymytých nádobách a chlazené tak, aby jeho teplota nebyla vyšší než 3 °C

kyselost mléka nesmí překročit 8,0 °SH,

jako konservačního prostředku je možno použít jen H₂O₂ peroxid vodíku

mléko je odstředěno na obsah tuku 0,5 % pasterizace je provedena těsně před sušením nebo lyofilizací

Glukóza (hexóza)

K výrobě přípravku je použita D-glukóza krystalická nebo rekrytalizovaná (nelze použít jen glukózu vyráběnou enzymaticky), a to těchto vlastností:

sušina nejméně
popel v sušině nejvýše
titrační kyselost ml N/10 louhu na 5 g
sušiny nejvíce
průzračnost
nejvyšší obsah mědi (Cu) nejvýše mg/kg
koliformní mikroorganismy v 1 g nejvýše
při kultivaci v masopeptonovém agaru
(30 °C) sporující nebo jiné nepatogenní
mikróby v 1 g nejvýše

89 %
0,08 %
0,30
80 %
10
10
10

při výrobě musí být použito technologicky nezávadné vody (bez nadprůměrných obsahů sodíku (Na), draslíku (K) a hořčíku (Mg))

Škrobový sirup

Jde o součást přípravku, kterou je možné

sušina nejméně
popel v sušině nejvíce
titrační kyselost ml 0,1 N NaOH na 100 g
sušiny nejvíce
pH (zředění vodou 1 : 3)
měď v mg 1000 g maximálně (Cu)
rtuť (Hg), Zinek (Zn), Olovo (Pb), ve
20 g
kysličník siřičitý (SO₂) v mg/1000 g nejvýše

96 %
0,4 %
25
4,7 až 5,4
12
0
70

Hydrofosforečnan sodný (Na₂HPO₄ · 12 H₂O)

Lze použít i jiných neškodných stabilizátorů avšak s přihlédnutím k tomu, že kyseliny a zásady nejsou vhodné.

V kvalitě pro potravinářské účely s označením „čistý“

při výrobě přípravku průmyslovým způsobem (při vmíchání se provádí ochrana pokožky oděvem a rukavicemi, oči protichemickými brýlemi a plíce protiprašným ventilátorem. Na pracovišti nelze jíst, pít a kouřit a je nutno dodržovat pravidla osobní hygieny)

při výrobě přípravku se vzhledem k lehké rozpustnosti rozpustí nejdříve stabilizátor v odstředěném mléce v předepsaném poměru. Po rozpuštění se přidá k ostatním složkám

purifikace
elektroforetická čistota
zdroj
stabilizátor
trypsinový inhibitor
(u sójových bobů nebo bovinních plíc)

média připraveným k zahuštění a sušení.

Emulgátor C

je použit v běžné tržní kvalitě dodávané pro potravinářské účely. Musí vyhovovat těmto požadavkům:

obsah monoglyceridů	30 %
obsah vody maximálně	1 %
číslo kyselosti maximální	10
bod tání minimální	40°
obsah mýdla	0

Bovinní gammaglobulin (směsný)

Je možno použít běžný komerční výrobek o nízké elektroforetické čistotě s příměsí ostatních frakcí bovinního séra.

nejlépe alkohol frakcionací
90 až 95 %
bovinní sérum
kyselina aminooctová

1 mg 140 UI BAEE
A = 253 n M

Obal výrobku

konečný výrobek se plní do NTS lahví, nebo v případech, kdy nejde o další skladování, do sterilních papírových skládacích krabic s vnitřním svarovým sáčkem, do uzavřených sáčků z papírové fólie s nátěrem termoplastu nebo do jiných funkčně vyhovujících obalů. Na obalu musí být označena hmotnost, způsob ředění a přípravy, způsob skladování a způsob použití přípravku.

Skladování lyofilizovaných částí přípravků (gammaglobulinu, kolostra), je dobře zajištěno při teplotě -18°C po dobu 3 let, sušeného média v temnu a suchu při teplotě 2°C až 5°C po dobu 1 roku. Expirační doba konečného výrobku při skladovací teplotě do 5°C je šestiměsíční. V provozních podmínkách bez uchování v chladničce se doporučuje použít přípravek do 14 dnů.

Postup při podávání přípravku

Při podávání přípravku narozeným telatům je nutno dbát všech hygienických pravidel a při zahřívání směsi dbát, aby nedošlo k překročení teploty a tím i denaturaci malých proteinů a ke ztrátě jejich biologických vlastností.

Přípravek je možno podle podmínek provozu podávat různým způsobem:

1. způsob (podávání přípravku s čerstvým nebo lyofilizovaným kolostrem)

1 dávka přípravku se vmíchá do 1 litru kolostra (mleziva)

při míchání je nádoba s kolostrem ponořena ve vodní lázni přibližně 40°C teplé tak, aby teplota kolostra při vmíchávání přípravku se udržela mezi 35°C až 37°C a neklesla pod 30°C při podávání telatům. Je nutno dbát, aby nebyla překročena uvedená teplota.

K napájení telat je použito lahví s gumovým strukem s otvorem přibližně o průměru 7 mm. Lahve i gumové struky musí být čistě vymyté horkou vodou s přísadou čistících prostředků a opět dokonale vypláchnuté nezávadnou vodou.

2. způsob

přípravek smíšený v předepsaném pomě-

ru s nezávadnou vodou určené teploty je podáván odstaveným telatům nebo v době přerušení napájení vlastní matkou.

Sušený přípravek je smíchán s nezávadnou teplou vodou na maximální teplotou 40°C v poměru 1 dávka přípravku a 400 g nezávadné vody nebo fyziologického roztoku.

Podávání přípravku telatům, jako při 1. způsobu v lahvích.

3. způsob

v případech, kdy nelze zajistit zahřáté kolostrium nebo nezávadnou vodu na předepsanou teplotu nebo v jiných případech lze přípravek podat po několika částech v želatinovém nebo oplatkovém obalu (bez obsahu sacharózy) přitlačením ke kořeni jazyka zvířete.

Doba podávání jednotlivých dávek narozeným telatům:

(podávaných obvykle 3 × po sobě)

1. 2 dávky (výjimečně 1 dávka v noci) do 2 hodin po porodu

2. 2 dávky do 7 hodin po porodu

3. 1 dávka do 12 hodin po porodu

to jest celkem až 5 dávek do 12 hodin po porodu.

Zpoždění tohoto cyklu podávání dávek je možné maximálně o 3 hodiny. Mimo první dávku, kde není zpoždění možné vůbec.

Přípravek pro další druhy hospodářských zvířat

Základní médium přípravku je stejné jako bovinní médium. Přípravky pro různé druhy mláďat se liší

a) druhem směsného nebo specifického gammaglobulinu. Např. gammaglobulin ovčí, kozí, prasečí, koňský, psí, kočičí

b) váhovým množstvím podávaného přípravku, a to na 1 kg váhy ml mláďate 2 ($\pm 5\%$) g sušeného přípravku

c) časovým obdobím podávání přípravku (např. u selat je 2 hodiny po narození, dále po 8, 14, 26, 32 hodinách při maximálním zpoždění o 4 hodiny).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Přípravek na zvýšení odolnosti mláďat hospodářských zvířat v sušeném stavu, obsahující
mléko v množství 703,8 až 860,02 hmotných dílů,
D-glukózu v množství 32,5 až 48,75 hmotných dílů,
emulgátor C v množství 0,675 až 0,825 hmotných dílů,
stabilizátor s výhodou hydrofosforečnan sodný v množství 0,133 až 1,47 hmotných dílů, případně škrobový sirup v množství do 2,5 hmotných dílů a případně další pří-

sady, zejména vitaminy a aminokyseliny, vyznačující se tím, že obsahuje
bovinní gammaglobulin směsný nebo specifický o elektroforetické čistotě 90 až 95 % v množství 4,5 až 9 hmotných dílů, trypsinový inhibitor ze sójových bobů nebo z bovinních plic, případně jiný inhibitor průmyslové kvality v množství 0,060 až 0,24 hmotných dílů.

2. Přípravek podle bodu 1 vyznačující se tím, že obsahuje navíc lyofilizované kolostrum v množství 20 až 30 hmotných dílů.