



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

231 146

(11) (B1)

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 28 02 83

(21) PV 1378-83

(51) Int. Cl.

C 12 P 1/04

(40) Zverejnené 15 02 84

(45) Vydané 01 06 86

(75)

Autor vynálezu

SOVA OTO MUDr. CSc., KOŠICE,

VIEST MIROSLAV MVDr., NITRA

(54)

Sposob výroby subcelulárnej parenterálnej
látky proti neonatálnej kolienteritíde
a kolihnačke teliat a prasiat

Vynález sa týka nového spôsobu izolácie pilusového telového antigénu k 99 baktérií *Escherichia coli*. Uvedený izolovaný antigen K 99 slúži buď k imunizácii telných kráv a najnovšie prasných prasnič osve, alebo ako doplnok k iným vakcínam proti črevným zápalom a hnačkám.

Nachádza použitie v živočíšnej veľkovo- výrobe, kde podstatne prispieva k zníženiu úhynu novorodencov.

Vynález sa týka spôsobu účinnej subcelulárnej parenterálnej látky proti neonatálnej kolienteritíde a kolihnačke teliat a prasiat, podávanej matkám 6 týždňov pred pôrodom injekčne do svalu alebo podkožne.

Kolienteritída a kolihnačka teliat a prasiat je vážnym problémom veľkochovov. Jej príčinou sú enteropatogénne baktérie *Escherichia coli*, nesúce na povrchu svojho tela aj pilusový antigén K 99, ktorý umožňuje ich adhérenciu na črevnú stenu novorodených teliat a najmä aj prasiat a tým spôsobuje enteritídu, ktorej následkom sú úperné hnačky a hynutie zvierat do desiatich dní po narodení. Jej zdolanie je veľmi náročné a zdĺhavé, zriedka úspešné. Doteraz najúčinnjším spôsobom jej likvidácie je imunizácia novorodených teliat a prasiat autochtónnou perorálnou vakcínou, obsahujúcou umrtené baktérie *Escherichia coli*, s pilusovým antigénom K 99, alebo imunizácia teľných kráv a prasných prasníc pred pôrodom parenterálnou vakcínou obsahujúcou buď umrtené baktérie *E. coli* K 99⁺, alebo izolovaný antigén K 99. Perorálna vakcína má viaceré nevýhody. Vyžaduje neustále dopĺňanie vakcíny novými kmeňmi, podávanie veľkých kvánt vakcíny denne manuálne, čo sťažuje prácu vo veľkochove. Parenterálna celulórna, alebo subcelulórna vakcína imunizuje teľnú kravu, alebo prasnú prasnicu a následne

po napití kolostra sa prenesú protilátky z matky na novorodenca. Doteraz vyrábané parenterálne subcelulárne vakcíny sú pripravované náročnými, viacstupňovými chemickými izoláciami, vyžadujúcimi nákladné zariadenia a komplikovaný postup.

Uvedené nedostatky v podstatnej miere odstraňuje spôsob výroby subcelulárnej pereterálnej látky proti neonatálnej kolienteritíde a kolihnačke teliat a prasiat podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že sa pilusový antigén K 99 z povrchu tela baktérií *Escherichia coli* separuje homogenizáciou a izoluje izoelektrickou autofokusáciou do takej koncentrácie, že vykazuje jasnú percipitačnú líniu pri difúzii v agare voči antiséru anti K 99 až do riedenia 1 : 128.

Výhodou uvedeného spôsobu výroby antigénu K 99 je jednoduchosť, energetická nenáročnosť, vylúčenie trvalej obsluhy aparatury a potreby akýchkoľvek chemikálií, pretože separácia prebieha jedine v apyrogénnej sterilnej destilovanej vode.

Príklad

Enteropatogénne baktérie *Escherichia coli* K 99⁺, nesúce pilusový antigén K 99 sa po bežnej kultivácii, zaručujúcej produkciu uvedeného antigénu odstredia a bakterín bez supernatantu sa resuspenduje v 4 °C chladnej sterilnej destilovanej vode pomocou homogenizéra 5 až 10 min pri 3 000 l/min a teplote 4 °C. Tak nastane odseparovanie pilusov obsahujúcich antigén K 99. Potom sa homogenát odstredí pri 70 000 m.s⁻² po dobu 20 min a pri teplote 4 °C. Supernatant, ktorého vodivosť sa upraví na hodnoty do 800 µS pridaním sterilnej destilovanej vody, alebo ďalším pridaním antigénu K 99, sa apikuje do

horizontálnej izoelektrofokusačnej veľkokapacitnej aparatury s mechanicky stabilizovaným deleným roztokom. Do aparatury sa aplikuje jednosmerný elektrický prúd maximálne 3 VA a roztok fokusuje pri teplote 4°C kým prúd neklesne pod 3 mA pri napätí 1 000 V. Po fokusácii sa zmeria vo všetkých priehradkách aparatury pH. Pilusový antigén K 99 fokusuje k pH 9,5 až 10,8 automaticky. Z priehradok s pH v tomto rozmedzí sa zhromažďuje fimbriálny pilusový antigén K 99. Jeho pH sa upraví na 7 až 7,5 a koncentrácia sa upraví tak, aby vykazoval pri sledovaní precipitácie v agare jasnú precipitačnú líniu voči antiséru anti K 99 až do riedenia 1 : 128. Po dosiahnutí tejto koncentrácie sa k roztoku antigénu pridá vhodné adjuvans, napr. olejové a podáva sa parenterálne injekčne v dávke 2 až 3 ml podkožne alebo intramuskulárne matkám asi 6 týždňov pred pôrodom. Táto dávka a doba postačujú k tomu, aby sa u matiek vytvorili protilátky voči K 99 antigénu a po napití kolostra sa preniesli do čriev novorodencov. Tieto protilátky zabráňujú patogénnym baktériám E. coli K 99⁺ adherovať sa na črevnú stenu a tým spôsobovať kolienteritídu a kolihnačku.

Vynález môže mať široké praktické využitie v živočíšnej veľkovýrobe.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

231 146

Spôsob výroby subcelulárnej parenterálnej látky proti neonatálnej kolienteritíde a kolihnačke teliat a prasiat vyznačujúci sa tým, že sa pilusový antigén K 99 z povrchu tela baktérií *Escherichia coli* separuje homogenizáciou a izoluje izoelektrickou autofokusáciou do takej koncentrácie, že vykazuje jasnú precipitačnú líniu pri difúzii v agare voči antiséru anti K 99 až do riedenia 1 : 128.