



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

261 460

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 09 06 86
(21) PV 4207-86.S

(51) Int. Cl.⁴
A 61 K 35/70

(40) Zveřejněno 15 07 88
(45) Vydáno 2.1.1990

(75)
Autor vynálezu

RYBNÍKÁŘ ALOIS RNDr., BRNO,
CHUMELA JOSEF MVDr.,
VRZAL VLADIMÍR MVDr., IVANOVIC NA HANÉ,
HEJTMÁNEK MILAN doc. RNDr. DrSc.,
WEIGL EVŽEN doc. MUDr. CSc., OLOMOUC

(54)

Vakcína proti trichofytóze koní a způsob její výroby

Vakcína proti trichofytóze koní je biopreparát určený k imunoprofylaxi a imunoterapii trichofytozy koní. Vakcína obsahuje po naředění zředovačem 4 až 12 milionů konidií kmene *Trichophyton equinum* CCM F-787 v 1 cm³. Vakcinační kmen má dobré imunogenní schopnosti, masívní tvorbu konidií a sníženou virulenci pro koně. K výrobě vakcíny je použita 9 až 17denní kultura tohoto kmene, pomnoženého na agarové živné půdě při 24 až 26 °C. Po homogenizaci kultury je ke vzniklé suspenzi přidáno protekční lyofilizační médium. Vakcína je rozplněna do lékových a lyofilizována. Při preventivním použití vakcíny ve veterinární praxi je zajištěna ochrana koní před onemocněním trichofytózou. V ohnisku trichofytozy koní se vakcína používá s terapeutickým cílem.

Vynález se týká vakcíny proti trichofytóze koní a způsobu její výroby. Vakcína je určena k imunoprofylaxi a imunoterapii trichofytózy koní.

Onemocnění koní trichofytózou má v posledních letech u nás i v zahraničí stoupající tendenci. Nemocní koně jsou odvoláváni ze soutěží, aukcí a dostihů a jejich přísná izolace činí mnohé provozní a organizační potíže v chovech. K likvidaci této kožní nákazy koní je nutno vynaložit značné náklady na léčivé a dezinfekční prostředky. Závažná je také skutečnost, že onemocnění je přenosné na lidi.

Dosud používané lokální terapeutické přípravky nepřinesly očekávaný efekt. V citlivé pokožce koní dochází často po jejich aplikaci k nežádoucím reakcím a ke vzniku dermatóz. Použitím léčivých prostředků se nezabrání vzniku nových trichofytických ložisek.

Vakcína k profylaxi trichofytózy koní byla připravena sovětskými autory (Sarkisov A.Ch., Petrovič S.V.: Pat. SSSR 130 7574 2/1969, pat. USA 4,229,434, Oct. 1980). Tato vakcína obchodního názvu S-P-1 obsahuje virulentní kmen *Trichophyton equinum*. Po její aplikaci byly často zjištěny u koní postvakcinační reakce: bolestivý otok v místě aplikace vakcíny, zvýšení tělesné teploty až o 1,5 °C, zvířata byla poněkud skleslá a odmítala potravu /Petrovič S.V., Sarkisov A.Ch.: Veterinarija (Moskva), 1981, č. 9, s. 40-42/.

Podstatou našeho vynálezu je vakcína proti trichofytóze koní a způsob její výroby. Vakcína se vyznačuje tím, že obsahuje po naředění zředovačem 4 až 12 milionů životaschopných konidií kmene *Trichophyton equinum* CCM F-787 v 1 cm³ suspenze. Způsob výroby vakcíny se vyznačuje tím, že vakcinační kmen se kultivuje po dobu 9 až 17 dnů na agarové živné půdě při teplotě 24 až 26 °C, houbový porost se oddělí a homogenizuje ve fyziologickém roztoku, přidá se protekční lyofilizační médium, suspenze se rozplní, zmrazí a suší v lyofilizačním zařízení.

Předmět vynálezu, vakcína proti trichofytóze koní, je připravena z kmene *Trichophyton equinum* CCM F-787, který obsahuje změněnou genetickou informaci - mutaci, vyjádřenou avirulencí pro morčata a sníženou virulencí pro koně. Po intramuskulární

aplikaci naší vakcíny nedochází k postvakcinačním komplikacím u vakcinovaných koní. V místě vpichu vakcíny nevznikají mykotická ložiska obsahující šupiny a krusty, které by mohly být potenciálním zdrojem další infekce. Předností naší vakcíny oproti vakcíně S-P-1 je, že vedle velmi dobrého profylaktického účinku má i výrazný terapeutický efekt. Způsob výroby vakcíny proti trichofytóze koní umožňuje získat vyšší počet vakcinačních dávek než u vakcíny S-P-1 při použití stejného množství kultivačních lahví.

Vakcína proti trichofytóze koní je určena k imunoprofylaxi a imunoterapii trichofytózy koní. Její dobrý profylaktický a terapeutický účinek byl potvrzen v čelenžních biologických pokusech a dále v chovech koní s výskytem dermatofytózy, vyvolané *T. equinum*, který je hlavním původcem kožních mykóz u koní.

Použitím vakcíny proti trichofytóze koní ve veterinární praxi dojde ke snížení nákladů, které bylo nutné vynaložit na léčbu koní postižených trichofytózou a na dezinfekci v ohnisku nákazy. Prevence trichofytózy koní účinnou vakcinací se příznivě projeví i ve zdravotnictví, sníží se riziko profesionální infekce u ošetřovatelů a dalších pracovníků v chovech koní.

Příklad 1 - výroba 60.000 dávek vakcíny

Vakcinační kmen *T. equinum* CCM F-787 byl inokulován na sterilní agarovou živnou půdu složení: 20 litrů destilované vody, 1,5 litrů kanditního sladového výtažku, 322,5 g agaru, 107,5 g peptonu. Množství inokula jsme zvolili tak, že na 1 cm² povrchu pomnožovacího média bylo naočkováno 85 tisíc konidií výrobního kmene. Použité inokulum bylo vyšetřováno kontrolním výsevem a inkubací na běžných živných půdách (masopeptonový agar a bujon při 20 a 37 °C, krevní agar při 37 °C a Sabouraudův agar při 28 °C) na nepřítomnost jiné mikroflóry.

Kultivační láhve s inokulovanou živnou půdou byly umístěny do termostatu při 24 °C ve vodorovné poloze. Po 9 dnech byla kultivace ukončena. Narostlá kultura byla opatrně sejmuta s povrchu živného média tak, aby neobsahovala zbytky agarové půdy. Homogenizace byla prováděna kuchyňským mixérem ve fyziologickém roztoku

po dobu 4 minut. Vzniklá suspenze byla přelita přes řídkou gázu do skleněné láhve. K suspenzi výrobní kultury ve fyziologickém roztoku jsme přidali stejné množství protekčního lyofilizačního média složení 7,5 g sacharózy a 5 g želatiny na 100 cm³ destilované vody.

Koncentrát vakcíny byl důkladně promíchán a odebrali jsme vzorek pro mikroskopické a kultivační vyšetření. Odebraný vzorek byl ředěn fyziologickým roztokem v předpokládaném poměru rozplnění vakcíny a v počítací komůrce byl zjištěn počet konidií. Ředěný vzorek obsahoval 6 milionů konidií v 1 cm³.

Koncentrát vakcíny byl rozplněn ve stanoveném množství do penicilinových lékovek a lyofilizován v lyofilizačním zařízení. Po usušení vakcíny byly lékovky uzavřeny gumovými lyofilizačními zátkami ve vakuu.

Před použitím byla lyofilizovaná vakcína ředěna zředovačem A (složení: 8 g chloridu sodného, 0,2 g chloridu draselného, 2,38 g sekundárního fosforečnanu sodného, 0,2 g kyselého fosforečnanu draselného, 1 litr destilované vody).

S vakcínou byly prováděny následující kontrolní zkoušky:

1. Zkouška čistoty kultury a bakteriální sterility: inokulací 0,1 cm³ vakcíny na krevní agar, masopeptonový agar a bujon, glukózový agar, Sabouraudův agar a posouzením po 24 h, 48 h, 72 h a 7 d inkubace při 37 °C, po 10 dnech inkubace při 20 °C a po 12 d inkubace při 28 °C.
2. Zkouška neškodnosti: 2,5 cm³ vakcíny bylo aplikováno i.m. dvěma králíkům živé hmotnosti 2,5 kg. Zdravotní stav zvířat byl sledován po dobu 14 dnů, nedošlo ani k úhynu ani k celkovým nebo místním klinickým změnám.
3. Zkouška na vakuum: tlak byl menší než 2,66 Pa.
4. Stanovení koncentrace vodíkových iontů: pH vakcíny bylo 6,5.
5. Stanovení počtu životaschopných vegetativních forem vakcinačního kmene: zjistili jsme plotnovou diluční metodou na Sabouraudově agaru. Vakcína obsahovala v 1 cm³ 5,5 milionů životaschopných vegetativních forem vakcinačního kmene.

Příklad 2 - lyofilizace vakcíny po ukončení zkoušek čistoty
kultury a bakteriální sterility

Výroba vakcíny proběhla jako v příkladu 1 v podmínkách sterilního prostředí. Veškerý materiál a pomůcky, použité k výrobě vakcíny, byly sterilizovány v autoklávu při přetlaku 60 až 80 kPa. Sterilizace byla provedena dvakrát po dobu 30 minut.

K pomnožení vakcinačního kmene CCM F-787 jsme použili sladinkový agar složení: 20 litrů destilované vody, 2 litry kanditního sladového výtažku, 330 g agaru, 110 g peptonu. pH jsme upravili na 6,6. Inokulace byla provedena rozočkováním suspenze výrobního kmene po povrchu živného média v množství 450 tisíc konidií na 1 cm² povrchu. Po 17 dnech inkubace při teplotě 26 °C byla sporulující kultura homogenizována ve fyziologickém roztoku a homogenizát byl filtrován přes gázu do skleněné láhve. Ochranné lyofilizační médium jsme přidali v takovém množství, že výsledná koncentrace sacharózy byla 7,5 %. Získaný koncentrát vakcíny byl po odebrání vzorku umístěn do mrazničky při teplotě -28 °C po dobu 12 dnů. Po vyhodnocení zkoušky čistoty kultury a bakteriální sterility byl koncentrát rozmrazen a rozplněn do lékovek tak, že 1 cm³ zředěné vakcíny obsahoval 12 milionů konidií vakcinačního kmene.

Způsob lyofilizace vakcíny a provedení kontrolních zkoušek byly stejné jako v příkladu 1.

Doba expirace vakcíny je 1 rok, skladování je přípustné v temnu a suchu při teplotě 2 až 8 °C.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

261 460

1. Vakcína proti trichofytóze koní, vyznačující se tím, že obsahuje po naředění zředovačem 4 až 12 milionů životaschopných konidií kmene s nízkou virulencí *Trichophyton equinum* (Matruchoť et Dassonville) Gedoelst 1902 CCM F-787 v 1 cm³ vzniklé suspenze.
2. Způsob výroby vakcíny podle bodu 1, vyznačující se tím, že výrobní kmen *Trichophyton equinum* se inokuluje v množství 85.000 až 450.000 konidií na 1 cm² povrchu živné agarové půdy, kultivuje se po dobu 9 až 17 dnů při teplotě 24 až 26 °C, získaný porost se homogenizuje ve fyziologickém roztoku, přidá se protekční lyofilizační médium, vakcína se rozplní, zmrazí na -40 až -50 °C po dobu alespoň 6 hodin a suší v lyofilizačním zařízení.