



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 03.06.1972 (P. 155784)

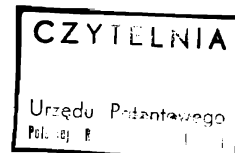
Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 30.05.1973

Opis patentowy opublikowano: 31.08.1976

MKP C12k 5/00

Int. Cl.² C12K 5/00



Twórcy wynalazku: Arutjun Khristoforovich Sarkisov, Svyatoslav
Vsevolodovich Petrovich, Lev Ivanovich Nikiforov,
Ljubov Markovna Yablochnik

Uprawniony z patentu: Vsesojuzny Ordena Lenina Institut
Experimentalnoi Veterinarii, Moskwa
(Związek Socjalistycznych Republik Radzieckich)

Sposób wytwarzania środka do profilaktyki trychofitozy rosłego bydła rogatego

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowego środka stosowanego do profilaktyki trychofitozy rosłego bydła rogatego.

Trychofitoza rosłego bydła rogatego prowadzi do ogromnych strat ekonomicznych w większości krajów o rozwiniętej przemysłowej hodowli bydła.

Masowa infekcja młodego rosłego bydła rogatego prowadzi do długotrwałej choroby, do konieczności zastosowania drogich, silnie działających środków leczniczych, do zahamowania rozwoju młodych, i do obniżenia przyrostu wagi. Zakłócone zostają terminy sprzedaży przez gospodarstwa (fermy) zwierząt rasowych, gwałtownie zmniejsza się jakość surowca garbarskiego. Ludność wiejska zaraża się od chorych zwierząt.

W literaturze brak jest danych o środkach, zapobiegających skutecznie tej chorobie.

Sposób wytwarzania środka do profilaktyki trychofitozy rosłego bydła rogatego według wynalazku polega na tym, że immunogenną kulturę *Trichophyton faviforme* hoduje się na stałej lub ciekłej pożywce w temperaturze 26—28°C w ciągu 12—15 dni, aż do optymalnego nagromadzenia mikrokonidii wyżej wymienionej kultury, po czym biomasę oddziela się, homogenizuje aż do uzyskania oddzielnych komórek mikroorganizmu, a następnie wydziela produkt końcowy. Wydzielenie produktu końcowego prowadzi się na drodze rozcieńczenia otrzymanej zawiesiny oddzielnych komórek mikroorganizmu za pomocą sterylnego roztworu fizjologicznego

2

go do stężenia 6—9 milionów w 1 mililitrze. Ewentualnie wydzielenie produktu końcowego prowadzi się na drodze liofilowego suszenia zawiesiny oddzielnych komórek mikroorganizmu.

5 W sposobie według wynalazku, dla zahamowania wzrostu ubocznej mikroflory, do roztworu fizjologicznego dodaje się penicylinę i streptomycynę w ilości 100 jednostek każdego z antybiotyków na 1 ml roztworu.

10 Środek, otrzymywany sposobem według wynalazku, stanowi ciecz koloru białego lekko opalizującego. Podczas przechowywania środka powstaje osad, który łatwo rozbija się przy wstrząsaniu. Flakony, zawierające nierozbijający się osad, mające uszkodzone zamknięcie, jak również odkryte, a nie wykorzystane w pełni w dniu immunizacji, nie nadają się do zastosowania i podlegają unieszkodliwieniu przez poddanie wrzeniu w ciągu jednej godziny.

20 Środek przechowuje się w temperaturze 4—8°C. Stosuje się go profilaktycznie do immunizacji młodych osobników rosłego bydła rogatego i dorosłych zwierząt w celu wytworzenia u nich niewrażliwości na zarażenie się trychofitozą (grzybicą strzygącą).

25 Środek ten jest nieszkodliwy w zastosowaniu i nie powoduje jakichkolwiek ubocznych reakcji. Pod koniec miesiąca od momentu immunizacji u zaszczepionych zwierząt tworzy się kierunkowa
30 odporność na rzeczywiste i doświadczalne zarażenie

Fermy tego rejonu zostały uwolnione w pełni od grzybicy strzygącej. Następnie stosowano środek w warunkach gospodarstw jednego okręgu jednostki administracyjnej, gdzie corocznie rodziło się do 400 tysięcy sztuk cieląt, a ilość chorujących na trychofitozę każdego roku sięgała 25—30 tysięcy sztuk cieląt. Wydzielono około 5000 litrów środka gospodarstwom tego okręgu i z początkiem roku 1970 przystąpiono do kolejnej immunizacji cieląt jednomiesięcznych. Środek wprowadzono domięśniowo po 5 ml środka dla każdego cielęcia dwukrotnie z przerwą 10—14 dniową. Pod koniec 1970 r. wszystkie fermy, pośród których było więcej niż 660 zakażonych grzybicą strzygącą, zostały uwolnione od tej infekcji i z gospodarstw zostały zdjęte ograniczenia sprzedaży zarodowej, a wydatki na leczenie chorych na trychofitozę zostały wyeliminowane.

Niżej podane przykłady ilustrują przedmiot wynalazku.

Przykład I. Przygotowanie 3—4 tysięcy dawek końcowego produktu. Posiew kultury, wytwarzanie i rozlew środka prowadzi się w boksach, z zachowaniem reguł ścisłej sterylności. Jako pożywkę dla hodowania kultury grzyba *Trichophyton faviforme* stosowano agar brzezczkowy (pH=6,4—6,8).

W celu otrzymania materiału posiewowego 12—15 dniową kulturę grzyba, hodowaną na agarze brzezczkowym w butlach Roux o objętości 1,3—1,5 litra, przemycza się 200 ml roztworu fizjologicznego. Otrzymaną zawiesinę posiewa się w nowych butlach Roux (po 5—7 ml). Po 4—5 dniach zauważa się wzrokowo wzrost kultury na agarze brzezczkowym. Z każdej z 4 butli Roux zdejmuję się masę grzybową i umieszcza się ją na wysterylizowanych płytkach Petriego. Z płytek kulturę przenosi się za pomocą łopatką do homogenizatora o objętości 1,5—2 litrów, zalewa się 500—700 ml roztworu fizjologicznego, zakrywa się korkiem i homogenizuje w ciągu 15—20 minut. Po homogenizacji zawiesinę kultury zlewa się do kolby. Do 15 litrowej sterylnej butli wlewa się, przez dwuwarstwowy filtr z gazy, 5 litrów sterylnego roztworu fizjologicznego. Następnie przez sterylny trójwarstwowy filtr przesącza się do tej samej butli zawiesinę kulturową, okresowo rozcieńczając ją roztworem fizjologicznym. W celu zapobieżenia zanieczyszczeń bakteryjnych dodaje się antybiotyki takie, jak penicylinę i streptomycynę w ilości 100 jednostek każdego antybiotyku na 1 ml środka. Określenie gęstości masy grzybowej prowadzi się według optycznego wzorca zmętnienia. Zawiesinę rozcieńcza się roztworem fizjologicznym według optycznego wzorca zmętnienia aż do stężenia 1—1,5 miliardów komórek na 1 ml sterylnego roztworu fizjologicznego, co odpowiada przy odczycie w kammerze pomiarowej 6—9 milionów komórek w 1 ml zawiesiny. Środek rozlewa się do butelek i zakrywa kółpaczkami. Z czterech butli Roux otrzymuje się 3—4 tysiące jednorazowych dawek (5 ml). Badanie na stwierdzenie braku utworzonej mikroflory prowadzi się na drodze wysiewu na pożywki z butli i wybiórczo z butelek.

W celu wykrycia ubocznej flory bakteryjnej jako pożywki stosuje się agar mięsno-peptonowy, bulion

mięsno-peptonowy, pożywkę Kitt-Tarozziego, a w celu wykrycia ubocznych pleśniaków stosuje się probówki z pożywką Čapka i agarem brzezczkowym. Okres badania wynosi 10 dni.

Nieszkodliwość środka bada się na drodze domięśniowego wprowadzenia trzem królikom w dawce 3 ml każdemu (ciężar królika 2,5—3 kg). Środki, w których stwierdzono zanieczyszczenia uboczną mikroflorą odrzuca się jako braki. Środki, które powodują zdechnięcie jednego z trzech królików lub powikłania w miejscu wprowadzenia (wrzód), bada się powtórnie na nieszkodliwość, biorąc do badania podwójną ilość zwierząt i wysiewów na pożywkach. W przypadku zdechnięcia jednego z królików lub stwierdzenia obecności ubocznej mikroflory, uważa się dany środek za nie nadający się do immunizacji. Równocześnie z wprowadzeniem środka królikom przeprowadza się badanie aktywności. Jako kryterium oceny aktywności środka przyjmuje się tworzenie u królików w miejscu wprowadzenia środka po 7—14 dniach ograniczonego gruzolka (6×6 mm), z następnym łuszczeniem i szybkim gojeniem się utworzonego ogniska.

Przykład II. Przygotowanie środka liofilizowanego. Jako pożywkę stosuje się agar brzezczkowy. Agar brzezczkowy sporządza się z nieochmielonej, uprzednio wysterylizowanej brzezki piwnej, rozcieńczając ją czystą wodą wodociągową do zawartości 7% wagowych węglowodanów według Balinga i doprowadzając przy tym jej pH do 6,8—7,0, a następnie dodając do niej 2% wagowych agar — agaru. Roztwór podgrzewa się do rozpuszczenia agar — agaru, rozlewa się po 300 ml w butle Roux (1,3—1,5) i sterylizuje się w ciągu 30 minut pod ciśnieniem 0,5 atm. Po sterylizacji pH agaru brzezczkowego wynosi 6,4—6,8. Otrzymywanie materiału posiewowego i wyjściowej kultury w butlach Roux prowadzi się sposobem, opisanym w przykładzie I.

W celu przygotowania 10 tysięcy dawek środka liofilizowanego bierze się 20—22 butli Roux z wyhodowaną immunogeniczną kulturą. Wszystkie operacje przeprowadza się w boksie w warunkach pełnej sterylności. Butle Roux z kulturą odkrywa się nad płonącymi palnikami spirytusowymi. Z powierzchni pożywki zdejmuję się biomasa i umieszcza na sterylnych płytkach Petriego. Następnie wprowadza się do wysterylizowanego homogenizatora o pojemności 1,5 litra, biomasa zebrana z czterech butli Roux i tam również wlewa się 500 ml sterylnego roztworu wodnego, zawierającego 10% wagowych sacharozy i 2% wagowych żelatyny. Homogenizator zakrywa się pokrywką i sterylną bibułą pergaminową. W celu uniknięcia zanieczyszczenia (skażenia) cały proces zbierania biomasy i umieszczenia jej w homogenizatorze prowadzi się przy zapalonym palniku spirytusowym. Homogenizator włącza się na 15—20 minut, w celu otrzymania zawiesiny odrębnych komórek mikroorganizmu. Shomogenizowaną biomasa grzybową zlewa się do kolby, doprowadzając stężenie komórek roztworem sacharozo-żelatynowym do 120—140 milionów mikrokonidii w 1 ml, przy czym antybiotyki nie dodaje się.

Przygotowaną zawiesinę rozlewa się do steryl-

zę tkanki), prowadzi się powtórne badanie na podwojonej liczbie zwierząt i próbę na obecność ubocznej mikroflory na drodze wysiewu z 5% butelek wypuszczonej serii. W przypadku zdechnięcia jednego z królików lub stwierdzenia obecności ubocznej mikroflory, daną serię uważa się za nieprzydatną do immunizacji. Przeznaczony do stosowania środek przechowuje się w chłodni w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ — $+8^{\circ}\text{C}$.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania środka do profilaktyki trychofitozy rosłego bydła rogatego, **znamienny tym**, że immunogenną kulturę *Trichophyton faviforme* hoduje się na stałej lub ciekłej pożywce w temperaturze 26 — 28°C w ciągu 12—15 dni, aż do optymalnego nagromadzenia się mikrokonidii wy-

mienionej powyżej kultury, po czym biomasę oddziela się i homogenizuje aż do uzyskania oddzielnych komórek mikroorganizmu, a następnie wydziela się produkt końcowy.

5 2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wydzielenie końcowego produktu prowadzi się na drodze rozcieńczenia zawiesiny oddzielnych komórek mikroorganizmu sterylnym roztworem fizjologicznym do stężenia 6—9 milionów w 1 ml.

10 3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wydzielenie końcowego produktu prowadzi się na drodze liofilowego suszenia zawiesiny oddzielnych komórek mikroorganizmu.

15 4. Sposób według zastrz. 1 i 2, **znamienny tym**, że dla zahamowania wzrostu ubocznej mikroflory do roztworu fizjologicznego dodaje się penicylinę i streptomycynę w ilości 100 jednostek każdego z antybiotyków na 1 ml roztworu.