



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

248764

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 M 1/12

(22) Přihlášeno 21 03 85

(21) PV 2004-85

(40) Zveřejněno 17 07 86

(45) Vydáno 15 12 87

(75)

Autor vynálezu

HNÁTKOVÁ ZUZANA MVDr., HNÁTEK JOSEF MVDr., JEVANY,
LETTL ALEŠ RNDr. PhMr. CSc., PRAHA

(54) Způsob výroby dialyzovaných toxických kultur mikroorganismu *Clostridium septicum*

Je popsán způsob výroby diazylovaných toxických kultur *Clostridium septicum* pro přípravu filtrátů k hyperimunizaci produkčních zvířat pro získávání antitoxických sér; příslušný mikroorganismus se kultivuje v kapalném živném médiu, které se naplní do dialyzační trubice, na obou koncích uzavřené a svými protilehlými konci upevněné ke stěnám nádoby, do níž se naplní totéž kapalně živné médium.

Vynález se týká způsobu výroby dialyzovaných toxických kultur mikroorganismu *Clostridium septicum* pro přípravu filtrátů, sloužících k hyperimunizaci produkčních zvířat, zejména koní, pro získávání antitoxického séra.

Anaerobní mikroorganismus *Clostridium septicum* je jedním z původců anaerobních traumat. V průběhu kultivace produkuje řadu toxických proteinů do kultivačního média. Tohoto média se po sterilizační filtraci, případně po dalších úpravách, používá k hyperimunizaci koní za účelem získání antitoxického léčebného séra. Protože tvorba protilátek u imunizovaných zvířat je výraznější po aplikaci účinnějších toxických filtrátů, trvá zájem na vypracování kultivačních metod, které by umožnily produkci toxických proteinů mikroba v co nejvyšším titru.

Dosud se získávaly toxické filtráty kultur mikroba *Clostridium septicum* kultivací na tekutých živných půdách, rozplněných do lahví (Lettl A., Blasko B., Háza J., J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 6, 343, 1962).

Jiný způsob představovala kultivace v celofánovém váčku, ponořeném do sterilního živného média. Dialyzační membrána ve tvaru váčku byla vyplněna fyziologickým roztokem chloridu sodného, a pouze v tomto roztoku se prováděla vlastní kultivace (Schaafsma A. W., Ann. Rep. A. Afr. Inst. 24, 1949; 31, 1950), zatímco okolní sterilní živné médium sloužilo jako rezervoár živin, difundujících membránou do kultivačního roztoku.

Nevýhoda prvního postupu spočívá v produkci jen nízkých koncentrací toxického proteinu, nedostatečných pro účinnou hyperimunizaci zvířat. Nevýhoda druhého postupu spočívá ve skutečnosti, že růst bakterií ve fyziologickém roztoku v celofánovém váčku neprobíhá uspokojivým způsobem, protože je brzděn pomalou difúzí živin přes malou plochu váčku, nedostatkem látek s větší molekulou, které membránou neprojdou, i nižší koncentrací živin v důsledku jejich naředění ve fyziologickém roztoku. Dosahované titry toxického proteinu jsou velmi nízké. Navíc poměr mezi kultivačním a nutričním objemem je zhruba 1:8 až 1:10, takže dochází k plýtvání živného média, kterého je při krátkodobé kultivaci v dialyzačním váčku o malé ploše velmi špatně využito.

Uvedené nevýhody popsaných postupů jsou odstraněny vynálezem způsobu výroby dialyzovaných toxických kultur mikroorganismu *Clostridium septicum* pro přípravu filtrátů, sloužících k hyperimunizaci produkčních zvířat, zejména koní, pro získávání antitoxického séra.

Podstata vynálezu spočívá v tom, že mikroorganismus se kultivuje v kapalném živném médiu, které se naplní do dialyzační trubice na obou koncích uzavřené a upevněné svými protilehlými konci ke stěnám nádoby, do které se naplní totéž kapalně živné médium. Vynález je tedy založen na zjištění, že při vyplnění nejen nutričního, ale i kultivačního prostoru uvnitř dialyzační membrány živným médiem namísto fyziologického roztoku chloridu sodného je pro *Clostridium septicum* zajištěna dostatečná koncentrace živin.

Vynález dále spočívá na zjištění, že při použití dialyzační membrány ve tvaru přímé trubice (Fredette V., Vinet G., Can. J. Med. Sci. 30, 155, 1952) je k dispozici velká dialyzační plocha, která umožňuje rychlou difúzi živin z nutričního objemu média do objemu kultivačního i difúzi nežádoucích metabolitů opačným směrem. Tato aparatura dosud nebyla pro kultivaci mikroorganismu *Clostridium septicum* použita.

Přednost navrženého postupu spočívá v tom, že *Clostridium septicum* se v uvedené aparatuře pomnožuje. Poměr mezi kultivačním a nutričním objemem je přibližně 1:2, takže při užití přímé dialyzační trubice o velké ploše je média dobře využito i při krátkodobé kultivaci.

Další předností navrženého postupu je skutečnost, že při přiměřené spotřebě kapalného živného média je toxický protein produkován kulturou mikroba *Clostridium septicum* téměř v dvojnásobném titru ve srovnání s kultivací v živném médiu, plněném do lahví. V důsledku vyššího titru takto připraveného toxického filtrátu odpadá nutnost jeho další chemické koncentrace a purifikace pro účely hyperimunizace.

Výhodou takto připravených toxických filtrátů kultur mikroorganismu *Clostridium septicum* je skutečnost, že po aplikaci těchto filtrátů produkčním koním dojde k výraznějšímu zvýšení titru protilátek v krvi než po aplikaci filtrátů, připravených dřívějším způsobem.

V následujících příkladech provedení je způsob podle vynálezu popsán a porovnán se známými způsoby tak, aby byly zároveň ilustrovány jeho výhody.

P ř í k l a d 1

Trypticky trávená masová živná půda byla plněna do dvoulitrové lahve v množství 1 800 ml (známý způsob; Lettl A., Blasko B., Háza J., J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 6, 343, 1962). V druhém případě (způsob podle vynálezu) bylo 1 200 ml téhož média vpraveno do skleněné trubice o průměru 70 mm a délce 600 mm, na obou koncích zúžené. Skleněnou trubicí po celé délce procházela dialyzační trubice o průměru 45 mm. Do ní bylo vpraveno 600 ml téhož média.

Po sterilizaci a aseptickém přidání 0,5 % glukózy byly obě nádoby naočkovány 1 % kulturou mikroba *Clostridium septicum*; u nádoby s dialyzační trubicí (způsob podle vynálezu) bylo inokulum vpraveno pouze do vnitřního prostoru dialyzační trubice. Po 18 hodinách inkubace při 37 °C byly narostlé kultury vypuštěny a buňky z kultur byly odstraněny sterilizační filtrací. Filtrát z lahve (připravený známým způsobem) měl titr toxického proteinu pouze 1,6+.ml⁻¹ a 100 DLM.ml⁻¹, zatímco filtrát z dialyzační trubice (způsob podle vynálezu) měl titr 3,0L+.ml⁻¹ a 300 DLM.ml⁻¹. Tento filtrát byl aplikován koni, jehož titr protilátek v krevním séru byl v době aplikace 200 UI.ml⁻¹. Titr protilátek se zvýšil na 300 UI.ml⁻¹. U jiného koně, jemuž byl aplikován filtrát z kultury v lahvi (připravený známým způsobem), nedošlo ke změně titru protilátek v krevním séru.

P ř í k l a d 2

Masové živné médium (jako v příkladu 1) bylo plněno do dvoulitrové lahve v množství 1 600 ml. Do média byl ponořen celofánový váček, obsahující 200 ml fyziologického roztoku chloridu sodného (známý způsob; Schaafsma A. W., Ann. Rep. S. Afr. Inst. 24, 1949; 31, 1950). V druhém případě (způsob podle vynálezu) bylo 1 200 ml média vpraveno do skleněné trubice na obou koncích zúžené a 600 ml média do dialyzační trubice, která procházela po celé délce touto skleněnou trubicí jako v příkladu 1.

Po sterilizaci a aseptickém přidání 0,5 % glukózy byly vnitřní objemy dialyzačních membrán naočkovány 1 % kulturou mikroba *Clostridium septicum*. Po 18 hodinách kultivace při 37 °C byly narostlé kultury vypuštěny a buňky z kultur byly odstraněny sterilizační filtrací. Filtrát z celofánového váčku (připravený známým způsobem) měl titr 0,3L+.ml⁻¹ a byl vyřazen jako nepoužitelný pro hyperimunizaci. Filtrát kultury z dialyzační trubice (způsob podle vynálezu) měl titr 3,6L+.ml⁻¹ a 500 DLM.ml⁻¹. Byl aplikován koni, u něhož vyvolal zvýšení titru antitoxinu v krevním séru z 250 na 350 UI.ml⁻¹.

P ř í k l a d 3

Byl připraven sterilní filtrát kultury z aparatury s přímo vedenou dialyzační trubicí podle příkladu 1 (způsob podle vynálezu). Filtrát měl titr 5,0L+.ml⁻¹ a 400 DLM.ml⁻¹. Byl aplikován koni, u kterého vyvolal zvýšení titru antitoxinu v krevním séru z 225 na 300 UI.ml⁻¹.

P Ř E D M Ě T V Y N Ā L E Z U

Způsob výroby dialyzovaných toxických kultur mikroorganismu *Clostridium septicum* pro přípravu filtrátů, sloužících k hyperimunizaci produkčních zvířat, zejména koní, pro získávání antitoxického séra, vyznačující se tím, že mikroorganismus se kultivuje v kapalném živném médiu, které se naplní do dialyzační trubice na obou koncích uzavřené a upevněné svými protilehlými konci ke stěnám nádoby, do které se naplní totéž kapalně živné médium.