



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

200 048

(11) (B 1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlášené 19 07 78
(21) PV 4806-78

(51) Int. Cl.³

C 12 N 1/20

A 61 K 35/74

A 61 K 31/415

(40) Zverejnené 30 11 79

(45) Vydané 15 10 82

(75)

Autor vynálezu DUBAJ JÚLIUS RNDr., NITRA SZÉCHENYI ŠTEFAN RNDr., NITRA
HRUŠOVSKÁ ZUZANA RNDr., NITRA DUBAJOVÁ JUSTÍNA RNDr., NITRA
SPIŠÁK MICHAL MVDr., NITRA KRAVÁRIK DUŠAN MVDr., NITRA
RAJTÁR VOJTECH MVDr. CSc., NITRA FIŠERA JOZEF MVDr. PhMr., BRATISLAVA

(54) Prípravok na prevenciu dyzentérie a rastových porúch u ošípaných a spôsob jeho výroby

1

Vynález sa týka zloženia a prípravy výrobku, určeného na prevenciu dyzentérie a rastových porúch u ošípaných v období mliečnej výživy a v predvýkrme, s pracovným názvom Lazol.

Dyzentéria ošípaných je ochorenie, ktoré vo všetkých krajinách s významným chovom ošípaných spôsobuje značné problémy. Vzhľadom k tomu, že dyzentéria ošípaných sa vyskytuje predovšetkým ve veľkochovoch a mortalita a morbidita je vysoká, je nutné venovať jej tlmeniu zvýšenú pozornosť /Harris D.L., Kinyon J.M.: Swine dysentery: History, recent discoveries and concepts. Proceedings 23-rd Annual Pfizer Research Conference, May 11, 9-25, 1975; Urban V.P., Šnur V.I.: 20-th World Veterinary Congress Summaries, Vol. 2, Thessaloniki, Greece, 1975/.

Dyzentéria ošípaných sa najčastejšie vyskytuje vo váhovej kategórii 15 až 70 kg, ale môže sa objaviť aj u cicajúcich prasiatok a výkrmových ošípaných. Prenos ochorenia sa deje najčastejšie ingesciou fekálií, alebo prenosom z nosičov, ktoré nejavia klinické príznaky. V prevádzkových podmienkach je morbidita okolo 90 % a mortalita v závislosti od účinnosti liečby môže dosiahnuť až 30 %. Za experimentálnych podmienok, ak zvieratá nie sú liečené, mortalita dosahuje až 50 % /Harris D.L., Glock R.D.: Swine dysentery. In: Diseases of swine. Fourth Edition, The Iowa State University Press, 1975/.

Na prevenciu a terapiu dyzentérie ošípaných bol do dnešného dňa navrhnutý celý rad liečiv, ktoré sa v praxi používali s rôznym úspechom rôzne dlhú dobu.

V tejto indikácii boli zo skupiny antibiotík vyskúšané streptomycín, bacitracín, chloramfenikol, erytromycín, tylozín, gentamycín, linkomycín, neomycín, spiramycín a virginiamycín. Vzhľadom na pomerne rýchlo narastajúcu rezistenciu zárodkov na tieto antibiotiká, začala sa v rôznych krajinách upriamovať pozornosť na aromatické arzénové zlúčeniny /kyselina arzanilová, kyselina 3-nitro-4-fenylarazónová a pod./, karbadox a najmä na deriváty 5-nitroimidazolu, z ktorých najširšie uplatnenie nachádza v súčasnosti dimetridazol a ronidazol/ napr. Griffin R.M.: Therapeutic and prophylactic activity of dimetridazole against experimentally transmitted swine dysentery, *Vet. Rec.* 91/5/, 349-353, 1972; Cotte-reau P.: Traitement du syndrome entéritique hémorragique du porc par la dimetridazole. *Revue de médecine vétérinaire* 122, 361-369, 1971; Messersmith R.E.: Effect of ipronidazol on swine dysentery. *Vet. Med. small Anim. Clin.* 68/9/, 1021-1033, 1973; Taylor D.J.: Ronidazole in the treatment of experimental swine dysentery. *Vet. Rec.* 95/10/, 215-216, 1974; Williams B.J., Shively J.E.: In vitro antitreponemal activities of carbadox, virginiamycin, alaquindox and tylosin as indices of their effectiveness for preventing swine dysentery. *Vet. Med. small Anim. Clin.* 73, 349-351, 1978/.

Ronidazol /1-methyl-2- [karbamoyloxy/-methyl] -5-nitroimidazol/ spolu s ďalšími liečivami zo skupiny derivátov 5-nitroimidazolu, ako sú: metronidazol, dimetridazol, ipronidazol, ornidazol a tinidazol, patrí k moderným vysokoúčinným chemoterapeutikám s rozsiahlou antiprotozoárnou aktivitou. Je účinný aj voči mykoplazmám. Popri účinku proti mykoplazmám a protozám má ronidazol aj význačné antibakteriálne vlastnosti, ktoré boli demonštrované in vitro ale aj in vivo v experimente na myšiach /Miller A.K.: Antibacterial activity of ronidazole. *Appl. Microbiol.* 22/3/, 480-481, 1971. In vitro je ronidazol najúčinnnejší proti *Treponema hyodysenteriae*, *Campylobacter coli* a *Clostridium perfringens*. Vysoká účinnosť ronidazolu voči zárodkom *T. hyodysenteriae* vysvetľuje rýchle vymiznutie zárodkov z výkalov ošipaných liečených ronidazolom /Taylor D.J.: Ronidazole in the treatment and prophylaxis of experimental swine dysentery. *Vet. Rec.* 99, 453-456, 1976/.

Na stimuláciu rastu ošipaných vo výkrme použil ronidazol Eox J.R. a kol. /Performance of pigs feed graded levels of ronidazole. *J. Anim. Sci.* 34/3/, 470-472, 1970/ a pri liečbe experimentálnej dyzentérie v roku 1974 Taylor D.J. /Ronidazole in the treatment of experimental swine dysentery. *Vet. Rec.* 95/10/, 215-216/. Od toho času sa s ronidazolom urobili viaceré štúdie, ktoré sa snažili optimalizovať dávkovanie účinnej látky v pitnej vode a v krmive pri experimentálne vyvolanom ochorení, ale aj v klinických podmienkach. Na základe dosiahnutých výsledkov autori odporúčajú voľiť 0,006 % koncentráciu, pretože a/ recidíva ochorenia je minimálna, b/ použitá koncentrácia dokáže eliminovať najviac spirochet z kolonu prasiat, c/ použije sa menej liečiva ako pri koncentrácii 0,012 %, d/ koncentrácia 0,006 % ronidazolu mezníži príjem vody u ošipaných.

V posledných rokoch sa venuje značná pozornosť aj tzv. mikrobiotickým /probiotickým/ prípravkom, obsahujúcim stabilizované živé zárodky baktérií mliečneho kvasenia, laktobacilov a streptokokov. Perorálna aplikácia týchto konštruktívnych črevných zárodkov vyvoláva primárne pozitívne kvalitatívne zmeny črevnej bakteriálnej biocenózy /kvalitatívny pokles podmienene patogénnych a metabolicky deštruktívnych kmeňov/, ktoré sa sekundárne prejavja

zlepšením celkového zdravotného stavu, zvýšením odolnosti, zlepšením rastovej aktivity a výrazným zvýhodnením živín /Mičan P., Boučka J.: Výsledky pokusů s použitím mikrobiotík ve výžive hospodářských zvířat. Veterinářství 26/8/, 363-367, 1976/.

Hlavná idea tzv. laktobacilovej terapie spočíva v tom, že laktobacily a iné nepatogénne črevné zárodky rôznych druhov/najmä streptokoky/ pôsobia na patogénne druhy, hlavne *E. coli*, nepriaznivo. Tvorbou kyseliny mliečnej nastáva posun pH zažívacieho traktu na kyslú stranu, a tým sa čiastočne inhibuje ich rast a aj tvorba toxínov.

Pre potreby humánnej medicíny sa v zahraničí vyrába celá paleta účinných mikrobiotických prípravkov, ktoré sú indikované na liečbu gastronintestinálnych porúch a infekčných enteritíd u kojenčov. V oblasti veterinárnej medicíny má využitie mikrobiotických prípravkov kratšiu tradíciu. Prvé pokusy s mikrobiotikami v terapii a výžive zvierat spadajú až do polovice šesťdesiatych rokov predovšetkým na tlmenie enteritíd, liečbu kolibacilózy a stimuláciu rastu /Kohler E.M., Bohl E.M.: Prophylaxis of diarrhea in newborn pigs. J. Am. med. Ass. 144, 1294-1297, 1964; Redmond H.E., Moore R.W.: Biological effect of introducing *Lbc. acidophilus* into a large swine herd experiencing enteritis. Svest. Vet. 18, 287-288, 1965; King J.O.L.: *Lactobacillus acidophilus* as growth stimulants for pigs. Veterinaria, London, 5/4/, 273-280, 1968; Varga J., Mészáros J.: Kísérlet a szopos malacok és borjak bélfőregének befolyásolása laktobacilusokat tartalmazó készítménnyel, Magy. Állatorv. Lap. 5, 301-303, 1974/.

Rozsiahlejšie zavedenie mikrobiotík do veterinárnej praxe bolo až do nedávna viazané na zavedenie moderných konzervačných mikrobiologických techník, umožňujúcich výrobu stabilizovaných koncentrovaných mikrobiálnych kultúr. S novou technológiou výroby mikrobiotík pre veterinárske účely prichádza švédka firma Medipharm. Základnou zložkou prípravku Lactiferm tejto firmy je stabilizovaná kultúra zárodkov *Streptococcus faecium*. V exaktných testoch, robených s týmto prípravkom, sa zistilo výrazné zníženie frekvencie gastrointestinálnych porúch, zlepšenie priemerných prírastkov hmotnosti, zvýhodnenie konverzie krmiva a zlepšenie adaptability na nové podmienky /Mičan P. a kol.: Použití mikrobiotík při odchovu a výkrm prasat. Krmivářství 8, 180-183, 1976/.

Nevýhodou uvedeného spôsobu podávania mikrobiotík je, že v oblastiach s výskytom dyzentérie ošipaných nie je možné plne využívať stimulačný rastový efekt uvedeného mikrobiotika, pretože samotný nepostačuje na terapiu ani na prevenciu dyzentérie. Preto predmet vynálezu navrhuje kombináciu mikrobiotika *Streptococcus faecium* s chemoterapeutikom 1-methyl-2- [/karbamoyloxy/-methyl] -5-nitroimidazol, voči ktorému je tento kmeň odolný. Možnosť kombinácie *Streptococcus faecium* s ronidazolom z hľadiska prežívania a schopnosti rozmnožovania zárodkov *Streptococcus faecium* sa laboratórne testovala. Ronidazol neinhibuje množenie zárodkov tohoto kmeňa. Schopnosť rýchlej kolonizácie zárodkov *Streptococcus faecium* v zažívacom trakte zostáva zachovaná pri súčasnej preventívnej ochrane ošipaných proti dyzentérii a iným gastroenteritídám. Výhodou kombinácie 1-methyl-2- [/karbamoyloxy/-methyl] -5-nitroimidazolu /ronidazolu/ s bakteriálnym kmeňom *Streptococcus faecium* v prípravku Lasol je veľmi dobrá preventívna ochrana ošipaných proti dyzentérii za súčasnej preukaznej rastovej stimulácii a zlepšenej konverzii krmiva.

Kmeň *Streptococcus faecium* bol deponovaný do československej zbierky kultúr pri Výskumnom ústave veterinárneho lekárstva v Brne pod číslom CCM 6142.

Prípravok podľa vynálezu obsahuje v 1 g 12 až 18 mg 1-methyl-2- [/karbamoyloxy/-methyl] -5-nitroimidazolu, minimálne 1.10^6 živých zárodkov kmeňa *Streptococcus faecium* a 6 až 10 mg kysličníka zinočnatého. Prípravok sa aplikuje v 0,5 % koncentrácii v príslušnej krmnej zmesi, dobre homogenizovaný. Používa sa preventívne v krmných štartérových mliečnych zmesiach a v predvýkrme nepretržite, alebo prerušovane v desaťdňových intervaloch.

Príklad 1

Primárna bakteriálna kultúra kmeňa *Streptococcus faecium*, CCM 6142, ktorého rezistencia na ronidazol bola získaná pasážovaním cez toto chemoterapeutikum, sa pomnožuje na sójovom živnom médiu v termostate pri teplote 37 °C po dobu 16 hodín, pričom vytvára bohatý sediment. Rozmnoženou bakteriálnou kultúrou sa očkuje pripravená sterilné modifikované mliečne médium vo fermentori, obsahujúce 20 hmotových percent sušeného odtučneného mlieka a 0,3 hmotových percent sušeného kvasnicového autolyzáta. Inokulované médium sa kultivuje za prevzdušňovania a miešania pri teplote 37 °C až 45 °C po dobu 16 až 18 hodín. Takto pripravená bakteriálna kultúra, obsahujúca 10^{12} až 10^{15} živých zárodkov na 1 ml sa fixuje sušením /lyofilizácia, fluidné sušenie, rozprašovacie sušenie/.

Na zvýšenie stability a odolnosti voči ostatným zložkám prípravku a vplyvom prostredia sa sušená bakteriálna kultúra stabilizuje fluidnou obdukciou /napr. na fluidnom granulátore WSG Glatt/ 3%-ným vodným alebo etanolickým roztokom polyvinylpyrolidónu /Kollidon 30/. Fluidná obdukcia prebieha pri teplote 35 až 40 °C.

Stabilizovaná bakteriálna kultúra kmeňa *Streptococcus faecium*, obsahujúca minimálne 1.10^9 živých zárodkov /1 g sa zmieša s ronidazolom v takom pomere, aby hotový výrobok obsahoval v 1 grame 12 mg ronidazolu /1-methyl-2- [/karbamoyloxy/-methyl] -5-nitroimidazol/, minimálne 1.10^6 živých zárodkov kmeňa *Streptococcus faecium* a 8 mg kysličníka zinočnatého. Pred homogenizáciou sa uvedené množstvá technologicky upravujú a doplnia na 1 g mikrobiálne nezávadným vehikulom modifikovaným škrobom /tepelne a enzymaticky upravený škrob, ktorý sa u nás vyrába pod názvom Solvarin M 20, Amylin/. Ako vehikulum sa môže použiť aj sacharóza a kaolín.

Príklad 2

Primárna bakteriálna kultúra kmeňa *Streptococcus faecium*, rezistentného na ronidazol, sa pomnožuje na sojovom živnom médiu v termostate pri teplote 37 °C po dobu 16 hodín. Pomnoženú bakteriálnou kultúrou sa očkuje pripravené vysterilizované modifikované mliečne médium vo fermentori. Modifikované mliečne médium obsahuje 20 hmotových percent sušeného odtučneného mlieka, 0,1 hmotových percent sušeného kvasnicového autolyzáta a 1 % síranu amónneho. Inokulované médium sa kultivuje za prevzdušňovania a miešania pri teplote 37 až 45 °C po dobu 16 až 18 hodín. Takto pripravená bakteriálna kultúra sa fixuje sušením a stabilizuje fluidnou obdukciou ako je uvedené v bode 1.

Stabilizovaná bakteriálna kultúra kmeňa *Streptococcus faecium* sa zmieša s ronidazolom a kysličníkom zinočnatým v takom pomere aby hotový prípravok obsahoval v 1 grame 14 mg 1-methyl-2- [/karbamoyloxy/-methyl] -5-nitroimidazolu /ronidazolu/ a 10 mg kysličníka

zinočnatého a minimálne 1.10^6 živých zárodkov *Streptococcus faecium*. ďalej sa spracuje tak, ako bolo popísané v príklade 1.

Príklad 3

Primárna bakteriálna kultúra kmeňa *Streptococcus faecium* sa pomnožuje na mäsopeptonovom bujóne v termostate pri teplote 37°C po dobu 16 hodín. Ďalej sa spracuje ako je popísané v príklade 1 s výnimkou, že stabilizovaná bakteriálna kultúra kmeňa *Streptococcus faecium* sa zmieša s ronidazolom a kyslíčnikom zinočnatým v takom pomere, aby hotový prípravok obsahoval v 1 grame 18 mg 1-methyl-2[-karbamoyloxy/-methyl]-5-nitroimidazolu, minimálne 1.10^6 živých zárodkov kmeňa *Streptococcus faecium* a 6 mg kyslíčnika zinočnatého.

Účinnosť prípravku na prevenciu dyzentérie a rastových porúch ošipáných je dokumentovaná nasledovnými tabuľkami:

Tabuľka č. 1: Pokus v období skrmovania krmnej zmesi ČOS 2 /Komplexná zmes pre skorý odchov ciciakov - štartér/.

Zloženie ČOS 2: rybia múčka, sušená toruľa, sušené odstr.mlieko, sušené zemiakové vločky, sojové pokrutiny, sladový kvet, technický cukor, obilné klíčky, pšenica, jačmeň, lúpaný ovos, dikalciumfosfát, krmna soľ, minerálna krmna prísada, vitamínový antibiotický doplnok.

	Pokusná skupina	Kontrolná skupina
Počet ošipáných v skupine /ks/	100	100
Priemerná živá hmotnosť/ž.h./na kus na začiatku pokusu	17,82	18,96
Počet krmných dní	93	93
Úhyn počas pokusu /ks/	1	2
Počet ošipáných na konci pokusu	99	98
Priemerná ž.h./ks na konci pokusu /kg/	61,51	55,50
Absolútny prírastok ž.h. na kus /kg/	43,69	36,54
Priemerný prírastok ž.h./ks a deň /kg/	0,473	0,393
Index zvýšenia ž.h./ks a deň/ %/	120,0	100,0
Spotreba krmiva na kg ž.h. /kg/	3,8	4,0
Index spotreby krmiva na kg ž.h. %/	95,0	100,0

Poznámka: Kontrolná skupina bola pozitívna s medikáciou krmnej zmesi prípravkom Ridzol P, t.j. prípravkom s obsahom 12 % ronidazolu. Pokusy boli realizované na ošipáných v dyzenterickej lokalite. V priebehu pokusu sa dyzentéria neprejavila ani v jednej skupine.

Tabuľka č. 2 : I. Pokus v období krmnej zmesi ČOS 2.

	Pokusná skupina	Kontrolná skupina
Počet ošípavých v skupine /ks/	321	321
Priemerná živá hmotnosť /ž.h./na kus na začiatku pokusu /kg/	9,0	7,0
Počet kŕmnych dní	18	36
Úhyn počas pokusu /ks/	1	0
Počet ošípavých na konci pokusu /ks/	321	321
Priemerná ž.h.na konci pokusu /kg/	20,90	19,96
Absolútny prírastok ž.h. na kus /kg/	11,50	12,96
Priemerný prírastok ž.h. na kus a deň /kg/	0,673	0,370
Index zvýšenia ž.h. na kus a deň /%/	181,8	100,0
Spotreba krmiva na kg ž.h. /kg/	1,36	1,44
Index spotreby krmiva na kg ž.h. /%/	94,44	100,00

II. Pokus v období kŕmnej zmesi A 1/ Kompletná zmes pre ošípavé do 35 kg/. Zloženie :
 bielkovinový koncentrát, vitamínová lucerková múčka, zemiakové vločky, pšenica, jačmeň,
 ovos, soľ, minerálna kŕmna prísada.

	Pokusná skupina	Kontrolná skupina
Počet ošípavých v skupine /ks/	320	321
Priemerná živá hmotnosť na kus na začiatku pokusu /kg/	20,90	29,96
Počet kŕmnych dní	91	92
Úhyn počas pokusu /ks/	1	4
Nutné porážky počas pokusu /ks/	1	17
Počet ošípavých na konci pokusu /ks/	318	300
Priemerná ž.h./ks na konci pokusu /kg/	63	59
Absolútny prírastok ž.h. na kus /kg/	42,10	39,04
Priemerný prírastok ž.h. na kus a deň /kg/	0,473	0,405
Index zvýšenia ž.h. na kus a deň /%/	116,79	100,00
Spotreba krmiva na kg ž.h. /kg/	2,90	3,70
Index spotreby krmiva na kg ž.h. /%/	78,38	100,00

Poznámka: Kontrolná skupina bola negatívna, bez medikácie kŕmnych zmesí, ale v prípade výskytu klinických príznakov dyzentérie bola liečená prípravkom Vibriogal, t.j. prípravkom s obsahom 11 % dimetridazolu, 6,5 % furazolidónu a 2 % kyslíčnika zinočnatého.

Tabulka č. 3: Pokus v období krmnej zmesi A 1/Kompletná zmes pre ošipané do 35 kg/.

	Pokusná skupina	Kontrolná skupina
Počet ošipaných v skupine /ks/	447	455
Priemerná ž.h. na kus na začiatku pokusu /kg/	20,91	20,91
Počet krmných dní	82	82
Úhyn počas pokusu /ks/	7	20
Percento úhynu počas pokusu %/	1,58	4,39
Počet ošipaných na konci pokusu /ks/	440	435
Priemerná ž.h. na konci pokusu /kg/	70,29	62,60
Absolútny prírastok ž.h. + ks /kg/	49,38	41,69
Priemerný prírastok ž.h. na kus a deň /kg/	0,519	0,441
Index zvýšenia ž.h. /ks a deň %/	117,95	100,0
Spotreba krmiva na kg ž.h. /kg/	3,08	3,21
Index spotreby krmiva na kg ž.h. %/	93,6	100,0

Poznámka: Pokusná skupina bola v tomto pokuse vyrovnaná a počas celého priebehu nebola zaznamenaná žiadna chorobnosť. Ošipané boli čulé, bez príznakov hnačky a aj u celej skupiny bol zaznamenaný znížený kašeľ. Príčiny úhynu v tejto skupine /1,58 %/ boli zväčša bronchopneumónia. Liečba ani žiadne zákroky sa v tejto skupine neprevádzali. V kontrolnej skupine uhynulo spolu 20 ks ošipaných. V tejto skupine pretrvávala Salmonellóza, dyzentéria a ochorenia respiratorného aparátu. Na liečbu sa použilo 76 kg prípravku Vibriogal, 1,5 l červienkového séra a 500 ml Chrocinu, tj. prípravku s obsahom 15 % D-chloramfenikolu.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Prípravok na prevenciu dyzentérie a rastových porúch ošipaných, vyznačujúci sa tým, že v 1 g obsahuje 12 až 18 mg 1-methyl-2[- /karbamoyloxy/-methyl]-5-nitroimidazolu, minimálne 1.10^6 živých zárodkov mikroorganizmov kmeňa *Streptococcus faecium*, 6 až 10 mg kysličníka zinočnatého a zvyšok do 1 g mikrobiálne nezávadné vehikulum.
2. Prípravok na prevenciu dyzentérie a rastových porúch podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že mikroorganizmus kmeňa *Streptococcus faecium* predstavuje kmeň *Streptococcus faecium* CCM 6142.
3. Spôsob výroby prípravku podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa pomnožená bakteriálna kultúra kmeňa *Streptococcus faecium* kultivuje na mliečnom médiu modifikovanom kvasnicovým autolýzátom v množstve 0,1 až 0,3 hmotových percent a síranom amónnym v množstve 1 až 3 hmotových percent pri teplote 37 °C až 45 °C po dobu 16 až 18 hodín a získaná bakteriálna kultúra, obsahujúca 10^{12} až 10^{15} živých zárodkov sa fixuje sušením a potom sa zmieša s 1-methyl-2[- /karbamoyloxy/-methyl]-5-nitroimidazolom, kysličníkom zinočnatým a mikrobiálne nezávadným vehikulom tak, aby 1 g prípravku obsahoval 12 až 18 mg 1-methyl-2[- /karbamoyloxy/-methyl]-5-nitroimidazolu, minimálne 1.10^6 živých zárodkov kmeňa *Streptococcus faecium* a 6 až 10 mg kysličníka zinočnatého.

4. Spôsob výroby prípravku podľa bodu 2, vyznačujúci sa tým, že mliečne médium je modifikované kvasnicovým autolýzátom v množstve 0,3 hmotových % a síranom amónnym v množstve 1 hmotového percenta, vzťahnuté na hmotnosť mliečného média.
5. Spôsob výroby podľa bodu 3, vyznačujúci sa tým, že sa sušená bakteriálna kultúra stabilizuje fluidnou obdukciou vodným alebo etanolickým roztokom polyvinylpyrolidonu pri teplote 35 až 45 °C.