



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

252537

(11)

(B1)

[51] Int. Cl.⁴
A 61 K 39/108

[22] Prihlášené 13 12 85

[21] (PV 9250-85)

[40] Zverejnené 15 01 87

[45] Vydané 15 10 88

[75]

Autor vynálezu

MIKULA IVAN doc. MVDr. CSc., PREŠOV, TKÁČIK JURAJ MVDr., KOŠICE,
ŠNIRC JÚLIUS MVDr. CSc., NITRA

[54] Inaktivovaná vakcína proti neonatálnej koli hnačke teliat

1

Riešenie sa týka technologickej prípravy inaktivovanej vakcíny proti neonatálnej koli hnačke teliat v rannom postnatálnom období. U ošetrovaných teliat ihneď po narodení vyvolá stav špecifickej chránenosti s využitím kompetitívnej a lokálnej imunity. Vakcína obsahuje 4 enteropatogénne technologicky za definovaných podmienok stabilné kmene *Escherichia coli* CCM 3908, CCM 3909, CCM 3910 a CCM 3911, chemicky inaktivované a egalizované v rovnakom objemovom množstve 1×10^{10} až 3×10^{10} v 1 ml vakcíny.

Inaktivovaná vakcína je použiteľná v imunoprophylaxii koli hlačky teliat, kde signifikantne znižuje morbiditu a mortalitu teliat z titulu tohto infekčného ochorenia.

2

Vynález sa týka spôsobu výroby inaktívanej vakcíny proti neonatálnej koli hnačke teliat, ktorá je technologicky pripravovaná z kmeňov *Escherichia coli* K99⁺, u ktorých počas submerznej kultivácie je optimalizovaná kvantitatívna expresia adhezínu testovania na konských a baraních erytrocytoch, pomocou manózoerezistentnej hemaglutinácie, ktorú je možné použiť pre špecifickú prevenciu kolienteritíd teliat.

Kmene *E. coli* izolované z teliat s diagnózou „neonatálna kolienteritída“ produkujú adherenčné antigény K99⁺, ktoré realizujú kolonizáciu tenkého čreva teliat. Expressia kolonizujúcich faktorov je proces regulovaný genetickým materiálom bunky. Mikrobiálne bunky počas rastu in vivo a in vitro vykazujú kvalitatívnu a kvantitatívnu fázovú variáciu — ISAACSON a RICHTER: *Escherichia coli* 987P pilus: Purification and partial characterization, J. Bacteriol. 146, s. 874—889; JONES G. W., ISAACSON R. E.: Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. Brit. Rev. Microbiol. 10, 1983, s. 229—260.

Pre technologickú produkciu efektívnych imunogénov proti uvedenému ochoreniu je zvlášť dôležitá kvantitatívna fázová variácia produkčných kmeňov *E. coli*. Tento fenomén in vitro je regulovaný za podmienok submerznej kultivácie, ktoré sú odlišné od podmienok pre kvalitatívnu fázovú variáciu. Kvantitatívna fázová variácia, ktorá podmieňuje maximálnu produkciu adhezínov, je primárnou podmienkou pre technologickú produkciu efektívnych imunogénov použitelných k špecifickej profylaxii hnačkových ochorení teliat.

Doterajší stav poznatkov v oblasti bakteriálnej genetiky a etiopatogenity *E. coli* nevyužíval fenomén kvantitatívnej fázovej variácie v produkcii efektívnych látok použitelných v imunoprofylaxii tohto ochorenia. Využitím tohto fenoménu v predmetnej oblasti zabezpečí synchronizáciu expresie adherenčného antigénu počas celej submerznej produkčnej kultivácie *E. coli* K99⁺.

Všeobecným trendom pro produkciu K99⁺ *E. coli* vakcín je kultivácia produkčných kmeňov v produkčnom médiu, ktorého základnou zložkou je Casamino acids (DIFCO).

Casamino acids	1,0	g
Dihydrogénfosforečnan draselný	1,36	g
Hydrogenfosforečnan sodný	10,10	g
Glukóza	1,0	g
Chlorid vápenatý dihydrát	0,0004	g
Síran horečnatý heptahydrát	0,010	g
Chlorid železitý tetrahydrát	0,000135	g
Chlorid horečnatý	0,001	g
Destilovaná voda do 1 000 ml		

Autori experimentálne overovali rôzne druhy produkčných živných médií, ktoré by zabezpečili maximálnu expresiu adherenčného antigénu. Z hľadiska efektívnosti kvan-

titatívnej expresie adherenčných antigénov bolo experimentálne dokázané, že autormi vyvinuté nové produkčné médium zaisťuje kvantitatívne vyššiu produkciu adhezínu a jeho primárnou zložkou je kyslý kazeinový hydrolyzáť.

Autori vynálezu izolovali a na základe fenotypového prejavu stanovili adherenčné vlastnosti mnohých kmeňov *E. coli*, ktoré pochádzali z teliat s akútnym výskytom neonatálnej kolienteritídy. Selekciou cieľených vlastností izolovaných kmeňov a testovaním týchto kmeňov v submerznej kultivácii bo i vybraté štyri kmene, uložené do čs. zbierky mikroorganizmov Univerzita JEP Brno, tl. Obránců míru 10 pod číslami CCM 3908, CCM 3909, CCM 3910 a CCM 3911. Uvedené kmene za autormi definovaných kultivačných podmienok vyhovovali požadovaným parametrom, ktoré boli stanovené pre technologickú produkciu efektívnej vakcíny.

Pre testovanie kvantitatívnej fázy rastu kultúry čo do produkcie adherenčných antigénov bola použitá manózoerezistentná hemaglutinácia. Pre charakteristiku kvalitatívnej fázy rastu bola autormi použitá sklíčková aglutinácia BRUSH BORDER test a rast na Simons-citrátovom agare s adonitom.

Pre zaistenie pozitivity v týchto reakciách autori vyvinuli nový druh produkčného média nasledujúceho zloženia:

Kyslý kazeinový hydrolyzáť	3—15	g
Dihydrogénfosforečnan draselný	1,36	g
Hydrogenfosforečnan sodný	10,10	g
Glukóza	0,0—1,0	g
Chlorid vápenatý dihydrát	0,004	g
Síran horečnatý heptahydrát	0,10	g
Chlorid železitý sextahydrát	0,000135	g
Chlorid horečnatý tetrahydrát	0,001	g
Destilovaná voda do 1 000 ml		

Po ukončení laboratórnych overovacích experimentov bola pripravená perorálna, chemicky inaktivovaná *E. coli* K99⁺ vakcína, ktorú autori testovali v praktických chovateľských podmienkach. Vakcinácia bola vykonaná v mesiacoch február, marec a apríl 1985. Celkove bolo vakcinovaných 294 teliat. Ako kontrola slúžila štatistika z mesiacov december 1984 a január 1985. Úhyn teliat po započatí vakcinácie bol znížený o 19,5 %, počet diagnostikovanej hnačky klesol o 50,2 %, pričom nebola diagnostikovaná koli hnačka a pokles mortality bol 71,8 perc.

Z uvedeného vyplýva, že vynález najde široké uplatnenie v chovoch hovädzieho dobytku pri znižovaní výskytu neonatálnych kolienteritíd. Aplikácia tohto preparátu je jednoduchá, nakoľko je možné vakcínu podávať v kolostre, prípadne v mlieku.

Príklad 1

Enteropatogénny kmeň *Escherichia coli* CCM 3908 sa kultivuje v 300 ml Erlenmayerových bankách s obsahom 20 ml sterilného média, ktorého zloženie je na str. 2 a ktoré obsahuje 0,5 % kyslého kazeínového hydrolyzátu a je bez glukózy. Následná inkubácia prebieha 4 hod. pri 37 °C za intenzívneho miešania. Po tejto inkubácii objem 20 ml kultúry preniesieme do 4 000 ml Erlenmayerovej banky s obsahom 300 ml sterilného média a inkubujeme 3 hod. pri 37 °C za intenzívneho miešania. Takto pripravenú subkultúru použijeme na inokuláciu fermentora v pomere 300 ml subkultúry na 7 litrov sterilného média vyššie uvedeného. Submerzná kultivácia prebieha pri 37 °C za stáleho miešania 600 ot/min. a aretácie sterilným vzduchom 8 l/min. Počas 8-hodinovej kultivácie sú odoberané vzorky kultúry pre testáciu bakteriálnej sterility, pH hodnoty, denzity a detekcie adherečného antigénu. Výsledná bakteriálna masa nesmie obsahovať žiadne kontaminujúce mikroorganizmy, s výslednou denzitou 1,0 meranou na Spekle oproti referenčnej vzorke 540 nm s pozitívnu aglutinačnou reakciou s monošpecifickým K99⁺ antisérom.

Bakteriálnu kultúru chemicky inaktivujeme pridaním 5 % vodného roztoku formaldehydu tak, aby výsledná koncentrácia bola 0,050 až 0,090 g na 100 ml. Inaktivovanú kultúru egalizujeme tak, aby vo vakcína bol zastúpený každý kmeň v rovnakom objeme. Výsledná koncentrácia inaktivovaných mikroorganizmov v egalizovanej bakteriálnej kultúre je $1-3 \times 10^{10}$.

Výsledná vakcína nesmie obsahovať cudziu bakteriálnu a plesňovú mikroflóru a je neškodná pre myš po perorálnej vakci-

nácii 0,5 ml vakcíny. 20-násobné riedenie vakcíny musí vykazovať pozitívnu aglutinačnú reakciu s monošpecifickým K99⁺ antisérom.

Príklad 2

Enteropatogénny kmeň *Escherichia coli* CCM 3911 bol kultivovaný v 300 ml Erlenmayerových bankách s obsahom 20 ml sterilného média, ktorého zloženie je na str. 2 a ktoré obsahuje 1,5 % kyslého kazeínového hydrolyzátu a 0,1 % glukózy. Ďalšia technologická príprava a spracovanie biomasy uvedeného kmeňa je analogické ako sa udáva v príklade 1.

Príklad 3

Enteropatogénny kmeň *Escherichia coli* CCM 3910 bol kultivovaný v 300 ml Erlenmayerových bankách s obsahom 20 ml sterilného média, ktorého zloženie je na strane 2 a ktoré obsahuje 0,5 % kyslého kazeínového hydrolyzátu a 0,1 % glukózy. Ďalšia technologická príprava a spracovanie biomasy uvedeného kmeňa je analogické ako sa udáva v príklade 1.

Príklad 4

Enteropatogénny kmeň *Escherichia coli* CCM 3909 bol kultivovaný v 300 ml Erlenmayerových bankách s obsahom 20 ml sterilného média, ktorého zloženie je na strane 2 a ktoré obsahuje 0,3 % kyslého kazeínového hydrolyzátu a 0,1 % glukózy. Ďalšia technologická príprava a spracovanie biomasy uvedeného kmeňa je analogické ako sa udáva v príklade 1.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Inaktivovaná vakcína proti neonatálnej koli hnačke teliat, vyznačujúca sa tým, že obsahuje 1×10^{10} až 3×10^{10} inaktivovaných kmeňov mikroorganizmov *Escherichia coli* CCM 3908, CCM 3909, CCM 3910, CCM 3911 v 1 ml vakcíny.

2. Inaktivovaná vakcína podľa bodu 1, sa

vyznačuje tým, že kmene mikroorganizmov vo vakcína sú minimálne z 90 % opílusované.

3. Inaktivovaná vakcína podľa bodov 1 a 2, vyznačujúca sa tým, že jednotlivé kmene *Escherichia coli* sú vo vakcína zastúpené v rovnakom objemovom pomere.