

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

207931

(11) B1

(61)

(23) Výstavní příprava 25 07 79
(22) Přihlášeno PV 5168-79
(21)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/10
// A 61 K 39/39

(40) Zveřejněno 28 11 80
(45) Vydáno 02 08 83

(75)

Autor vynálezu

PEKÁREK JAN MUDr CSc., PRAHA

VEPŘEKOVÁ ALENA RNDr CSc., PRAHA

(54)

Způsob pomnožování parazitů pro přípravu antigenů z produkčních zvířat

Vynález řeší problém zvýšení výtěžku a čistoty parazitární suspense. Podstatou vynálezu je aplikace imunosupresivního zásahu, kterým se sníží přirozená rezistence produkčního zvířete a tím se umožní pomnožení většího množství parazitů. Tento vynález je možné využít v mikrobiologii, imunologii a parazitologii jak pro přípravu vakcín, tak i diagnostických preparátů i k výzkumným účelům.

Vynález se týká způsobu pomnožování parazitů na produkčních zvířatech při přípravě parazitárních antigenů, určených pro vakcinaci nebo pro diagnostické účely. Způsobem podle vynálezu se docílí zvýšení výtěžku parazitů i zvýšení čistoty parazitární suspence.

Pomnožování parazitů na laboratorních zvířatech se obvykle provádí tak, že se těmto zvířatům injikuje živá suspence parazitů a po určité době se zvířata usmrtí a odebírá se jim buď orgán, nebo tělní tekutina, ve které se paraziti pomnožili. Na př. při kultivaci prvoků *Toxoplasma gondii* se bílým myškám intraperitoneálně naočkují živé toxoplasmy, třetí den se myši usmrtí, pitvají a sterilně se jim odebírá peritoneální exsudát, obsahující pomnožené parazity, který obsahuje také myší leukocyty. Tímto způsobem dostaneme suspensi prvoků, jejichž množství je omezeno vlivem působení ochranného mechanismu hostitelského zvířete a tato suspence obsahuje i značné množství leukocytů.

Vynález byl učiněn na základě znalostí z odborné literatury o imunosupresivním účinku různých látek a skutečností, že v imunosuprimovaném organismu dochází k častým infekcím. Na př. Mayer V. (Acta virol. 16, 323, 1972) prokázal zvýšené pomnožení virů v imunosuprimovaných zvířatech. Snížení resistance imunosupresivními látkami se běžně využívá na klinikách při transplantacích orgánů.

Způsobem podle vynálezu se kultura parazitů injikuje produkčním zvířatům, na které bylo před infikováním působeno imunosupresivně. Při pomnožování *Toxoplasma gondii* na imunosuprimovaných myších se potřeba zvířat i pracnost snižuje na méně než polovinu při zvýšení kvality suspence. Myším se podá imunosupresivní látka a potom se provede inokulace živých toxoplazem. Toxoplasmy se v takto ovlivněných myších pomnoží podstatně více, než v myších neovlivněných. Získá se tak v průměru z jedné myši nejméně dvojnásobek toxoplazem, jak ukazuje tabulka z pokusů, provedených vždy na 100 myších:

Pokus č.	Počet toxoplazem z myší, ovlivněných imunosupresivní látkou	Počet toxoplazem z myší neovlivněných (kontrola)
1/79	Ø 113 miliard	Ø 36 miliard
2/79	298 "	32 "
3/79	295 "	130 "
4/79	146 "	63 "
5/79	143 "	75 "
6/79	288 "	196 "
Průměr z pokusů	214 miliard	88 miliard

Kultivací podle vynálezu se v porovnání se známým postupem přípravy parazitárních antigenů zvýší také jejich kvalita. Suspence těchto toxoplazem, připravených podle vynálezu, obsahuje větší množství prvoků v poměru k přibližně konstantnímu množství myších leukocytů, obsažených v peritoneálním exsudátu myší. Proto antigeny, vyráběné podle vynálezu, nepotřebují další purifikaci, která je spojena se značnými ztrátami, viz K.N. Masihi: *Toxoplasma gondii*: Large scale purification by zonal density gradient

centrifugation, Exp. Parasitol. 39, 81-87, 1976, K.N. Masihi: Studies of purification of *Toxoplasma gondii* zoites by sintered glass filters, Acta parasitol., 23, 653-658, 1975, A. Valkoun: Příprava čištěných suspensí *Toxoplasma gondii* z myšního peritoneálního exsudátu a tkáňových kultur, Zprávy Čs. spol. parasitol. 18, 3-4, 20-22, 1978.

Celkový zisk parazitů u normálního, neovlivněného zvířete je limitován působením ochranného mechanismu hostitelského organismu. Tento důvod je také příčinou nestandardního zisku parazitů z jednotlivých zvířat.

Snížením resistance produkčního zvířete imunosupresivním zásahem, t.j. aplikací imunosupresivně působící látky (na př. cyklofosfamidu, azathioprinu, 6-merkaptopurinu, cortizonu), antilymfocytárním sérem (antimakrofágové, antithymové sérum) nebo ozáření Rtg paprsky se sníží brzdicí účinek imunitního mechanismu a tím se vytvoří lepší podmínky pro pomnožení parazitů, dosáhne se vyššího výtěžku a kvalitnějšího antigenu.

Příklady provedení:

Příklad 1):

100 bílým myškám o hmotnosti 20-24 g bylo aplikováno intramuskulárně 3 mg cyklofosfamidu do obou stehů. Druhý den podána týž způsobem stejná dávka. Čtvrtý den byly myšky naočkovány intraperitoneálně inokulem, obsahujícím živé toxoplasmy. Třetí den po infekci byly myši usmrceny stržením vazů, pitvány a sterilně odebrán exsudát, obsahující toxoplasmy.

Exsudát byl vyšetřen mikroskopicky, provedeny zkoušky sterility a nato byl odstředěn. Průměrná výtěžnost na 1 myš byla 113 miliard toxoplazem (kontrola bez podání imunosupresivního prostředku 36 miliard toxoplazem). Sedimentované toxoplasmy byly dále zpracovány na Toxoplasmin a diagn. antigen IFR.

Příklad 2):

Bílým myškám (100 ks) o hmotnosti 20-24 g se aplikovalo 0,8 mg azathioprinu (Imurenu) intramuskulárně. Druhý den podána stejná dávka a dále postupováno jako v příkladě 1). Průměrný výtěžek na 1 myš činil 146 mld toxoplazem.

Příklad 3):

100 bílým myškám o hmotnosti 20-24 g se subkutánně naočkovalo 0,2 ml antithymového séra, druhý den podána stejná dávka. Dále postupováno jako v příkladě 1). Průměrný výtěžek byl 143 mld toxoplazem na 1 myš.

Příklad 4):

Bílé myšky (100 ks) o hmotnosti 20-24 g byly ozářeny dávkou $14,19 \cdot 10^6 \text{ C.kg}^{-1}$ (550 R-250 R/10 g hmotnosti) Rtg paprsků. Dva dny po ozáření byly myšky naočkovány intraperitoneálně inokulem, obsahujícím živé toxoplasmy. Dále bylo postupováno jako v příkladě 1), výtěžnost činila 288 mld toxoplazem/1 myš.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

- 1) Způsob pomnožování parazitů pro přípravu antigenů z produkčních zvířat, spočívající v tom, že se kultura parazitů injikuje produkčním zvířatům, vyznačující se tím, že před infikováním se na produkční zvířata působí imunosupresivně.
- 2) Způsob podle bodu 1), vyznačující se tím, že imunosupresivní působení na produkční zvířata se provádí podáváním imunosupresivních látek, jako cyklofosfamidů, azathioprinu, 6-merkaptopurinu nebo cortizonu.
- 3) Způsob podle bodu 1), vyznačující se tím, že imunosupresivní působení na produkční zvířata se provádí injikováním antilymfocytárního séra, jako antimakrofágového nebo antithymového séra.
- 4) Způsob podle bodu 1), vyznačující se tím, že imunosupresivní působení na produkční zvířata se provádí ozářením Röntgenovými paprsky.