



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

201 481

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 31 03 79
(21) PV 2175-79

(51) Int. Cl. A 61 K 35/70
C 12 N 1/14

(40) Zveřejněno 29 02 80
(45) Vydáno 01 03 83

(75)

Autor vynálezu ŠIŠÁK MIROSLAV MVDr., IVANOVIC NA HANÉ,
RYBNÍKÁŘ ALOIS RNDr., BRNO a
ŠIŠÁKOVÁ EVA PhMr., IVANOVIC NA HANÉ

(54) Vakcína proti trichofytóze skotu živě lyofilizovaná a způsob její výroby

1

Vynález se týká vakcíny proti trichofytóze skotu živě lyofilizované a způsobu její přípravy z živé virulentní kultury *Trichophyton verrucosum* Bodin 1902 /kmene Bi-036-Š "Strážnice"/ a která je určena k profylaxi a terapii trichofytózy skotu.

Trichofytóza skotu je velmi závažné infekční onemocnění - anthroponóza, která se rozšířila u nás zejména se zvyšováním koncentrace skotu ve velkokapacitních teletnicích a u velkých stád skotu. Onemocnění trichofytózou je přenosné na člověka, přičemž léčení jedné infikované osoby je značně nákladné. Onemocnění způsobuje vedle rozsáhlých škod v kožedělném průmyslu /nepoužitelné kůže ke kožedělnému zpracování/ i další ekonomické ztráty hlavně v zemědělství - znemožněním moderního způsobu odchovu a možnost přesunů zvířat v rámci velkých zemědělských závodů.

V literatuře je popsána celá řada terapeutických prostředků proti tomuto onemocnění. Tyto přípravky jsou však většinou nedostatečně účinné, značně finančně nákladné a jejich aplikace je náročná na práci a čas. Celá řada pokusů o vyvinutí vakcíny proti trichofytóze skotu byla neúspěšná, připravené vakcíny byly nedostatečně efektivní. Teprve v SSSR byla připravena v poslední době účinná vakcína k profylaxi trichofytózy hovězího dobytka. Jde o suspenzi mikrokonidií imunogenního kmene *Trichophyton faviforme* ve fyziologickém roztoku

v koncentraci od 6 do 9 milionů v 1 cm³. Vakcína byla získána pomnožením sovětského výrobního kmene č. 130 na sladinkovém agaru, homogenizací narostlé kultury v prostředí fyziologického roztoku a zředěním suspenze buněk na výše uvedenou koncentraci mikrokonidií. Přípravek je aplikován zvířatům v intervalu 10 až 14 dnů v dávkách od 5 do 10 cm³ /Sarkisov: Prophylaxie spécifique de la Trichophyton des jeunes bovidés. Bull. OIE, 85, 1976 : 481 až 488 a čs. autorské osvědčení č. 160324/.

Podstatou našeho vynálezu je výroba živé lyofilizované vakcíny proti trichofytóze skotu z kmene *Trichophyton verrucosum*, získaného na území ČSSR. Výroba vakcíny je realizována podle našeho technologického postupu tak, že výrobní kmen se pomnoží na tekuté Sabouraudově půdě, tekuté sladinkové půdě nebo na pevných půdách Sabouraudově glukozovém agaru a sladinkovém agaru /půdy jsou obohaceny proti běžným předpisům o thiamin a kyselinu glutamovou/, provede se homogenizace narostlé kultury v prostředí pufovaného fyziologického roztoku, přidá se pufované lyofilizační médium s neomycinem a mikroskopicky se stanoví počet mikrokonidií v jednotce vakcíny a na základě koncentrace mikrokonidií se provede rozplnění vakcíny tak, že jejich počet v 1 cm³ vakcíny je 10 až 20 milionů. Rozplněná vakcína je zamrazena na -40 °C a usušena v lyofilizačním zařízení.

Lyofilizací stabilizovaný imunogenní kmen *Trichophyton verrucosum* se stává součástí tohoto vynálezu a je uložen v Čs. sbírce mikroorganismů - sbírce zoopatogenních mikroorganismů - Brno, třída Obránců míru 10, a to kultura *Trichophyton verrucosum*, kmen Bi-036-Š /CCM-E-650/ používaná k výrobě československé vakcíny proti trichofytóze skotu, která byla izolována z telat postižených trichofytózou v JZD Strážnice okres Hodonín/. Kultivací na sladinkovém agaru se objevuje růst již 2. až 3. den po inokulaci. Povrch kultury je jasně bílý, bez pigmentů, střed kolonií je vyvýšený, okraje široce hvězdovitě rozlézavé. Porost kultury určený k výrobě vakcíny /stárí 14 až 21 dnů/ pokrývá souvisle kultivační médium, je bílý, povrch je jemný, vláknitý, mírně rozrýhovaný. Při mikroskopickém vyšetřování zjišťujeme mikrokonidie /téměř kulaté, hruškovité nebo kyjovité, 1,5 až 2 x 2 až 5 μm velké/, makrokonidie /tenkostěnné kyjovité spory s četnými přepážkami, 4 až 6 x 10 až 50 μm velké/, mycelium a chlamydo-spory. Optimální pH pro růst a sporulaci je 6,0 až 6,9.

Při pokusném ověřování účinnosti vakcíny proti trichofytóze skotu československého původu bylo dosaženo velmi dobrých výsledků /Komárek " Surveillance dermatomykóz domácích zvířat 1976, 102 až 112, Ústav vet. osvěty Pardubice/. Při použití vakcíny ve velkokapacitních teletnicích dosahoval léčebný efekt 98%, profylaktický 97,5% /Jaroš : Zkušenosti s tlumením trichofytózy ve Velkokapacitním teletníku Trutnov, Veterinářství 26, 1976, 256, Telata vakcinovaná profylaktickými dávkami a umístěná do zamořeného prostředí mezi skot postižený trichofytózou, touto chorobou neonemocněla. Při vakcinaci nemocných kusů došlo k jejich uzdravení. Vakcína je neškodná, při její aplikaci nedošlo u zdravých zvířat k onemocnění trichofytózou.

Použití vakcíny proti trichofytóze skotu přináší značný ekonomický přínos, usnadnění práce veterinární služby a příznivý dopad má i na oblast zdravotnictví. Použití této vakcíny v chovech skotu vedlo již ke snížení zamořenosti okresů, obcí a ohnisek v ČSR při porovnání epizootologické situace v roce 1977 a v roce 1978, jak je zřejmé z tabulky:

Zamořených okresů	Rozdíl 1977/1978	
	absolutně	v %
	-9	-14,6
obcí	-156	-38,1
ohnisek	-168	-38,7

Podstata technologického postupu vynálezu spočívá v tom, že čs. výrobní kmen *Trichophyton verrucosum* pomnožený na vhodném kultivačním médiu se homogenizuje v prostředí pufovaného fyziologického roztoku po dobu 5 až 10 minut, přidá se pufované lyofilizační médium s neomycinem v koncentraci 0,2 g/l, mikroskopicky se stanoví počet zárodků, určí se množství koncentráту k rozplnění tak, aby počet mikrokonidií v 1 cm³ vakcíny byl 15 ± 5 milionů, provede se rozplnění do lékovek a lyofilizace vakcíny. Vakcína je rozplněna do lékovek o obsahu 50 nebo 100 cm³ a ke každé lékovce je přibalen jako zředovač pufovaný fyziologický roztok.

Dávkování vakcíny je následující :

a/ profylaktické dávky : 2 x 2,5 cm³ telatům 1 až 2 měsíčním

2 x 5 cm³ skotu nad 2 měsíce

b/ léčebné dávky : dvojnásobné dávky profylaktické podle stáří a kategorie zvířat.

U zvířat silně postižených je možno použít bez obav ještě další revakcinační dávku.

Vakcína se aplikuje hluboko intramuskulárně v krajině bederní, křížové nebo stehenní, vakcinační dávka v levé, revakcinační dávka v pravé polovině těla zvířete. Mezi vakcinací a revakcinací je rozmezí 10 až 14 dnů.

Příklady provedení

Příklad 1 - pomnožení výrobní kultury *Trichophyton verrucosum* na Sabouraudově půdě - výroba 20.000 dávek vakcíny.

Jako pomnožovací půda se použije Sabouraudův roztok složení : 10 litrů destilované vody, 400 g maltózy, 100 g peptonu. PH se upraví na 6,6 až 6,9. Půda se autoklávuje po dobu 30 minut při tlaku 0,05 MPa. Potom se provede rozplnění půdy do Roux lahví obsahu 2 l po 150 až 200 cm³ na láhev a další autoklárování při stejných poměrech. Po vychladnutí půdy se provede její inokulace kulturou *Trichophyton verrucosum*. Inokulum bylo připraveno ze 14 až 35 denní kultury *Trichophyton verrucosum* /výrobní kmen Bi-036-Š/ pomnožené na pevné půdě. Porost kultury v celkovém množství asi 3 až 6 x 10¹⁰ mikrokonidií byl homogenizován v 1000 cm³ pufovaného fyziologického roztoku v mixéru po dobu 5 až 10 minut. Do takto připraveného inokula bylo přidáno 0,2 g neomycinu. Inokulace byla prováděna injekční stříkačkou tak, že na 1 kultivační láhev bylo použito 10 cm³ inokula /asi 3 až 6 x 10⁸ mikro-

201 481

konidií této houby/. Po 14 až 21 dnech růstu v temnu při teplotě 28 až 30 °C byla narostlá kultura z 5 až 6 lahví přemístěna do mixéru, přidáno 0,5 litru pufovaného fyziologického roztoku a byla provedena homogenizace kultury po dobu 5 až 10 minut. Homogenní kultura byla filtrována přes gázu do zásobní láhve objemu 20 litrů, kam bylo přidáno pufované lyofilizační médium ve stejném množství jako u pufovaného fyziologického roztoku.

Složení pufovaného fyziologického roztoku :

destilovaná voda	1000 cm ³
chlorid sodný p.a.	3 g
chlorid draselný p.a.	0,2 g
sekundární fosforečnan sodný p.a. /12 H ₂ O/	2,38 g
kyselý fosforečnan draselný p.a.	0,2 g

Složení pufovaného lyofilizačního média :

redestilovaná voda	1000 cm ³
želatina pro bakt.	50 g
sacharóza	75 g
sekundární fosforečnan sodný p.a. /12 H ₂ O/	3,82 g
kyselý fosforečnan draselný p.a.	0,36 g

Do takto připraveného homogenizátu se přidává neomycin v koncentraci 0,2 g/l.

Veškeré práce při výrobě vakcíny je nutno provádět za podmínek sterilního prostředí, materiál a potřeby použité k přípravě vakcíny musí být autoklávovány a před použitím opalovány nad plynovým kahanem. Ze zásobní láhve s homogenizátem vakcíny se odebere vzorek v množství asi 5 cm³ pro provedení kontrolních zkoušek. Ve vzorku vakcíny je mikroskopicky stanoven počet mikrokonidií pomocí počítací komůrky dle Bürkera. Na základě dosaženého výsledku je vypočten poměr rozplnění vakcíny tak, aby její koncentrace konečná byla 15 ± 5 milionů mikrokonidií na 1 cm³ vakcíny.

Vakcína je rozplněna do lékovek obsahu 50 nebo 100 cm³. Následuje zamražení na -40 °C nejméně po dobu 4 až 5 hodin a sušení v lyofilizačním zařízení po dobu 24 až 48 hodin s přihříváním do 25 °C. Lyofilizace je ukončena tehdy, když teplota produktu dosáhne teploty sušicího kotle a nejméně 4 hodiny se nemění. Po ukončení sušení se vakuum v zařízení ruší dusíkem. Lékovky s usušenou vakcínou se uzavírají gumovými zátkami ve vakuu.

Před upotřebením se lyofilizovaná vakcína ředí zředovačem. U lyofilizované vakcíny jsou prováděny následující kontrolní zkoušky : zkouška čistoty a bakteriální sterility je prováděna výsevem vakcíny na krevní agar, masopeptonový agar, masopeptonový bujon, glukozový agar a Sabouraudův agar. Zjišťování bakteriální sterility při 37 °C trvalo po dobu 72 hodin a 7 dnů a při teplotě 20 °C 9 dnů. Sledování nepřítomnosti cizích plísní na Sabouraudově agaru probíhalo po dobu 12 dní při teplotě 28 až 30 °C. Stanovení koncentrace vodíkových iontů se provádí na pH metru. Přípustné pH zředěné vakcíny je 6,0 až 7,5. Zkouška účinnosti se provádí stanovením počtu živých zárodků. Zjišťuje se plotnovou metodou na Sabouraudově agaru. Vakcína musí obsahovat nejméně 10 až 20 milionů zárodků, živých zárod-

ků *Trichophyton verrucosum* v 1 cm³. Zkouška na vakuum se provádí pomocí vysokofrekvenčního elektrického zkoušeče vakua. Zkouška neškodnosti se provádí na 2 králících váhy kolem 3 kg. Králíkům se aplikuje hluboko intramuskulárně 2,5 cm³ vakcíny do svaloviny zadní končetiny. Šarže s nevyhovujícími parametry nejsou vhodné k imunizaci a je nutno je inaktivovat autoklávováním.

Příklad 2 - pomnožení výrobní kultury *Trichophyton verrucosum* na tekuté sladinkové půdě obohacené thiaminem.

Ke kultivaci kultury *Trichophyton verrucosum* je možno použít tekuté sladinkové půdy následujícího složení: 10 litrů destilované vody, 1 kg pevné sladinky získané sušením tekuté pivovarské sladinky v atomizéru, 50 g peptonu, 0,2 g thiaminu.

Tato půda je autoklávována při tlaku 0,05 MPa po dobu 30 minut v autoklávu, pH je upraveno na 6,0 až 6,6 a je provedeno rozplnění půdy do Roux lahví objemu 2 litry po 150 až 200 cm³ na láhev. Po uzavření kultivačních lahví vatovými zátkami je provedeno autoklávování při stejných poměrech. Inokulace půdy se provede pomocí injekční stříkačky, na jednu kultivační láhev připadá asi 3 až 6 x 10⁸ zárodků *Trichophyton verrucosum*. Kultivace probíhá v temné komoře při teplotě 28 až 30 °C. Po 14 až 21 dnech růstu je kultura přenesena do mixéru, kde je po dobu 5 až 10 minut homogenizována v prostředí pufrovaného fyziologického roztoku. Na 500 cm³ pufrovaného fyziologického roztoku připadá porost z 5 až 6 kultivačních lahví. Po ukončení homogenizace kultury je mixér propláchnut pufrovaným lyofilizačním médiem s neomycinem v koncentraci 0,2 g/l. Množství lyofilizačního média bylo stejné jako množství fyziologického roztoku. Počítání zárodků v homogenizátu je prováděno mikroskopicky. Rozplnění vakcíny je prováděno na základě výpočtu tak, aby v 1 cm³ vakcíny bylo 15 ± 5 milionů mikrokonidií *Trichophyton verrucosum*.

Zamražení a lyofilizace rozplněného přípravku, jakož i kontrolní zkoušky byly prováděny stejně, jak je uvedeno v příkladě 1. Celkově bylo získáno 20000 dávek vakcíny proti trichofytóze skotu lyof.

Příklad 3 - pomnožení výrobní kultury *Trichophyton verrucosum* na ředěném sladinkovém agaru obohaceném o thiamin a kyselinu glutamovou.

Jako živné médium byl použit sladinkový agar ředěný a obohacený o thiamin a kyselinu glutamovou v tomto složení: 10 litrů tekuté pivovarské sladinky, 5 litrů destilované vody, 225 g agaru, 75 g peptonu, 0,3 g thiaminu a 0,3 g kyseliny glutamové.

Médium bylo autoklávováno 30 minut při tlaku 0,05 MPa, pH upraveno na 6,0 až 6,6 a půda byla rozplněna asi po 400 cm³ do Roux lahví objemu 2 litry. Láhve byly uzavřeny vatovými zátkami a autoklávovány znovu při stejných poměrech. Po ztuhnutí média byly láhve

201 481

přemístěny do komory s teplotou 28 až 30 °C, kde byly ponechány po dobu 5 až 9 dnů pro zjištění sterility média. Inokulace byla provedena injekční stříkačkou, na 1 kultivační láhev připadlo asi 3 až 6 x 10⁸ mikrokonidií *Trichophyton verrucosum*. Po inokulaci byly láhve umístěny do temné komory s teplotou 28 až 30 °C kultivačním médiem dolů. Po 1 až 2 dnech po uchycení kultury k živému médiu byly láhve obráceny kultivačním médiem vzhůru. Kultura byla každodenně makroskopicky prohlížena na nepřítomnost cizí flory. Po 14 až 21 dnech růstu byla narostlá kultura oddělena pomocí kovové kličky od kultivačního média a pomocí kovových motýček přemístěna do mixéru. Na 500 cm³ pufovaného fyziologického roztoku byl použit porost ze 4 kultivačních lahví, doba homogenizace tohoto množství byla 5 až 10 minut. Homogenizát byl filtrován přes gázu do skleněné zásobní láhve objemu 20 litrů a proplachován pufovaným lyofilizačním médiem s neomycinem v koncentraci 0,2 g/l. Celkové množství pufovaného lyofilizačního média bylo stejné jako celkové množství pufovaného fyziologického roztoku. V získaném homogenizátu byl mikroskopicky v počítací komůrce dle Bürkera stanoven počet mikrokonidií. Na základě zjištěné hodnoty byl proveden výpočet poměru rozplnění vakcíny do lékovek obsahu 50 nebo 100 cm³ tak, aby hotový výrobek obsahoval 15 ± 5 milionů mikrokonidií v 1 cm³.

Provedení zamražení a lyofilizace výrobku a kontrolních zkoušek je stejné, jak je uvedeno v příkladě 1.

Výše popsaným způsobem se získá asi 16 000 dávek vakcíny proti trichofytóze skotu.

Veškeré práce při přípravě inokula, při inokulaci, výrobě vakcíny, při jejím rozplňování a lyofilizaci, jakož i při uzavírání lékovek, je nutno provádět sterilně. Sterilizace laboratoří je prováděna UV zářením a desinfekčními prostředky, roztoky a pomůcky potřebné k přípravě výrobku je nutno autoklávovat dvakrát po dobu 30 minut při tlaku 0,05 MPa. Rozplňování koncentráту do lékovek před lyofilizací se děje v proudu laminárního sterilního vzduchu. Pracovníci jsou povinni při práci s kulturou *Trichophyton verrucosum* používat ochranné oděvy, gumové rukavice, obličejovou roušku a pokrývku hlavy. Použité kultivační půdy a ostatní pomůcky kontaminované kulturou *Trichophyton verrucosum* je nutno autoklávovat po dobu 1 hodiny při tlaku 0,2 MPa. Podobně se inaktivují nevyhovující šarže vakcíny, popřípadě prázdné lékovky po provedené vakcinaci v terénu.

Přípravek má expirační dobu 1 rok. Skladování přípravku je přípustné pouze při teplotě 4 °C a v temnu.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Vakcína proti trichofytóze skotu živá lyofilizovaná určená k profylaxi a terapii trichofytózy skotu, vyznačující se tím, že obsahuje lyofilizovaný pomnožený kmen *Trichophyton verrucosum* Bodin /Bi-036-Š/ CCM E-650 v množství 10 až 20 x 10⁶ mikrokonidií v 1 cm³ vakcíny a zředovač.

2. Vakcína podle bodu 1, vyznačující se tím, že zředovač je pufovaný fyziologický roztok obsahující 8 g chloridu sodného, 0,2 g chloridu draselného, 2,38 g sekundárního fosforečnanu sodného, 0,2 g kyselého fosforečnanu draselného a 1 litr destilované vody.
3. Způsob výroby vakcíny podle bodu 1, vyznačující se tím, že se kmen *Trichophyton verrucosum* Bodin CCM E-650 kultivuje v živném prostředí po dobu 14 až 21 dní, získaný porost se homogenizuje po dobu 5 až 10 minut v prostředí pufovaného fyziologického roztoku, přidá se pufované lyofilizační médium, mikroskopicky se určí koncentrace mikrokonidií a provede se rozplnění tak, aby 1 cm³ vakcíny obsahoval 10 až 20 x 10⁶ mikrokonidií.
4. Způsob výroby vakcíny podle bodu 3, vyznačující se tím, že množství pufovaného lyofilizačního média je stejné jako množství pufovaného fyziologického roztoku.
5. Způsob výroby vakcíny podle bodů 3 a 4, vyznačující se tím, že se rozplněná vakcína zamrazuje při -40 °C nejméně po dobu 4 až 5 hodin, suší se v lyofilizačním zařízení po dobu 25 až 48 hodin při teplotě do 25 °C.
6. Způsob výroby vakcíny podle bodů 3 a 4, vyznačující se tím, že do připraveného homogenizátu se přidává před rozplněním neomycin v koncentraci 0,2 g/l homogenizátu.