



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

201 369

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 21 11 78
(21) PV 7566-78

(51) Int. Cl.³ A 61 K 35/20
// A 61 K 39/395

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

(75)
Autor vynálezu ULMANN LEOPOLD MVDr., SALAJKA EDUARD MVDr., SALAJKOVÁ ZDENKA RNDr.,
DRESSLER JIŘÍ ing., BRNO

(54) Biopreparát na ochranu mláďat hospodářských zvířat proti střevním infekcím

1

Vynález se týká biopreparátu použitelného k prevenci a léčbě střevních infekcí mláďat.

Enteropatogenní bakterie a viry způsobují u mláďat hospodářských zvířat a u dětí střevní infekce projevující se průjmy, často smrtelnými. Organismus dospělých jedinců se poměrně rychle ubrání těmto infekcím produkcí protilátek vylučovaných na povrch střevní sliznice. Mláďata v časném věku nejsou schopna vytvářet protilátky tak rychle, aby se infekci ubránila. Infekce březích matek původci střevních infekcí má za následek produkci protilátek nejen ve střevě, ale i v mléčné žláze. Přítomností specifických protilátek v sekretu mléčné žlázy lze dosáhnout i imunizací březích matek. Protilátky obsažené v kolostru a mléce takových matek chrání sající mláďata před infekcí. Mláďata, která sají u matek neimunních a hlavně mláďata odchovávaná bez matek často smrtelně onemocní při styku s původci enterálních infekcí. Doposud používaná léčba střevních infekcí spočívá v potlačení střevní infekce různými léky, nejčastěji antibiotiky, sulfonamidy nebo jejich kombinací s řadou chemoterapeutik. Tato léčba, kromě potlačení běžné střevní mikroflóry nutné k fyziologické funkci střeva, má často za následek potlačení běžné střevní mikroflóry nutné k fyziologické funkci střeva, má často za následek i poškození makroorganismu.

Mláďata však lze před střevními infekcemi chránit a z onemocnění vyléčit i bez

zmíněných nepříznivých důsledků, a to využitím imunitních mechanismů, které představují normální fyziologický proces. Pro prevenci střevních infekcí u sajících mláďat lze využít umělé imunizace březích matek, které potom ochrání mláďata protilátkami v sekretu mléčné žlázy. K léčbě mláďat stížených infekčními průjmy lze použít krevní sérum získané ze zvířat imunizovaných vyvolavateli těchto onemocnění. Toto sérum lze použít i k prevenci onemocnění u mláďat chovaných bez matek v období, kdy se ještě sama infekcí neubrání. Séra proti střevním infekcím se podávají perorálně, a proto mohou být heterologní. Podávání musí být opakované, aby byl zabezpečen jejich stálý přísun do střeva. K tomu je třeba zajistit poměrně velké množství specifických sér. Pro poměrně vysokou cenu sér se této možnosti využívá jen omezeně a pro prevenci průjmu u velkého počtu ohrožených mláďat je tento způsob ekonomicky neúnosný. K odstranění shora uvedeného nedostatku směřuje vynález, jehož podstata spočívá v tom, že se k prevenci nebo léčbě enterálních infekcí použije kravského kolostra od zvířat, imunizovaných v období jejich březosti vakcínami, které obsahují původce infekčních průjmů.

Na základě vlastních pokusů autoři zjistili, že u neimunizovaných krav jsou prokazatelné hladiny jen proti somatickým antigenům kmenů *E. coli*, které jsou vyvolavatelé střevních infekcí, v různém titru při vyšetření pomalou aglutinací, a to v ředění 1:20 až 1:320. Nejsou však u nich prokazovány protilátky proti kapsulárním antigenům. Ty se objevují až po infekci nebo imunizaci. Jednorázová aplikace vakcíny zpravidla nestačí k vytvoření prokazatelných titrů protilátek. Teprve druhá a třetí aplikace vyvolá vzestup titru specifických protilátek proti kapsulárním (povrchovým) antigenům, které byly prokázány v množství 1:20 až 1:160.

Je prokázáno, že kolostrální imunoglobuliny lépe odolávají enzymatické degradaci ve střevě, než imunoglobuliny krevního séra, a proto je také zaručena delší biologická účinnost během jejich pasážování střevem. Kravské kolostrum získané od imunizovaných zvířat je tedy nejpřirozenějším zdrojem ochranných látek k navození pasivní imunity pro všechny druhy mláďat hospodářských zvířat a může být využito i k ochraně dětí. Děti stejně jako ostatní mláďata jsou chráněny pasivně protilátkami matky obsaženými v mateřském mléce. U dětí, které nejsou kojeny matkou z nejrůznějších příčin dochází velmi často k průjmovým onemocněním infekčního původu. Mateřské protilátky lze velmi výhodně nahradit protilátkami obsaženými v kravském kolostru. Dosavadní ověřování bylo provedeno s aplikací hyperimunních hovězích sér při kolinfekcích u dětí, avšak aplikace kravského kolostra byla výhodnější.

Výše uvedené vlastnosti kravského kolostra lze výhodně využít jako dostupného zdroje pro výrobu biopreparátu. Kravské kolostrum podle vynálezu lze použít především jako biopreparát na ochranu mláďat hospodářských zvířat proti střevním infekcím. Použije se kolostra krav, které byly v poslední třetině březosti imunizovány vakcínou připravenou z původců vyvolávajících střevní onemocnění. Lze použít buď celé kolostrum, nebo z něj získanou kolostrální syrovátku. Biopreparát může být v tekuté, nativní formě nebo ve formě prášku získaného sprayovým sušením.

Kravské kolostrum získané v prvním dnu po porodu má vysoký obsah imunoglobulinů. Námi zjištěné hodnoty ukazují, že množství u jednotlivých krav je značně rozdílné, a to v rozmezí 6 až 12 g imunoglobulinů ve 100 ml kolostrální syrovátky. Toto vysoké množství kolostrálních imunoglobulinů v mléčné žláze je odvislé od zatím ne zcela jasného mechanismu, umožňujícího zvýšený prostup sérových imunoglobulinů v období těsně před porodem a ještě během 2 až 3 dnů po porodu přes biologickou membránu do mléčné žlázy z krevního řečiště. Množství imunoglobulinů v kolostru ovšem během prvních dnů po porodu u krav rychle klesá a čtvrtého dne dosahuje již hodnot, které se běžně zjišťují v normálním kravském mléce, kdy hodnoty jsou zpravidla 0,5 g ve 100 ml mléčné syrovátky. Během prvního dne klesá množství na 40 % a během druhého dne již na hodnoty kolem 20 % původního množství. Pokles imunoglobulinů v prvních 4 dnech je úměrný poklesu celkové bílkoviny kolostrální syrovátky. Celková bílkovina v kolostrální syrovátce dosahuje podle našich zjištění v prvním dnu průměrné hodnoty 10 až 12 g na 100 ml. Imunoglobuliny tvoří v době porodu 70 až 80 % obsahu z celkové bílkoviny kolostrální syrovátky. Je to tedy nesporně nejvyšší koncentrace imunoglobulinů jako se v žádném jiném sekretu krav nevyskytuje. V krevním séru je poměr imunoglobulinů u krav dosti stabilní a dosahuje průměrných hodnot 1,5 g na 100 ml krevního séra.

Je dokázáno, že převážná část imunoglobulinů v kolostru pochází z krevního séra a jen malá část je syntetizována lokálně přímo mléčnou žlázou. Z těchto důvodů je poměr specifických protilátek v kolostru proti vyvolavatelům průjemových onemocnění obdobný jako v krevním séru. Toto je možno ovlivnit imunizací březích krav. Neimunizované krávy sice mohou mít vysoký obsah imunoglobulinů, ale jen nepatrné hladiny specifických protilátek. Tyto se vytvářejí buď po spontánní infekci, nebo po imunizaci. U březích zvířat přichází v úvahu jen parenterální imunizace prováděná buď subkutánní, nebo intramuskulární aplikací vakcín z umrtvených původců střevních onemocnění mláďat.

Výchozím postupem při přípravě všech forem biopreparátu je získání kolostra od imunizovaných krav. Uvedeme tedy nejprve tento postup. Pro imunizaci byly použity krávy umístěné ve dvou stájích. V první stáji se použilo k imunizaci "Polyvalentní vakcíny proti enterálním koliinfekcím novorozenech selat", ve druhé stáji se používalo "Polyvalentní vakcíny proti enterálním koliinfekcím novorozenech telat". Obě vakcíny jsou komerčně vyráběné podle návrhu autorů v Biovetě n.p. Ivanovice na Hané. V každé stáji se vakcinovalo podle schématu tak, že se započalo s vakcinací krav v 7. měsíci březosti, po 14 dnech se aplikovala druhá dávka a za dalších 14 dnů třetí dávka vakcíny v množství 20 ml s.s. do volného podkoží. Imunizace byla ukončena asi 14 dnů před očekávaným porodem krav.

Sběr kolostra od krav se provedl v průběhu prvního dne po porodu, zpravidla při trojím vydojení během 24 hodin. Sbírá se jen přebytečné kolostrum, které nespotřebují telata. Takto bylo získáno od jedné krávy 2 až 5 litrů kolostra. Kolostrum po oddojení se přecedí, zchladí a uchovává v nádobách z plastické hmoty od každé krávy zvlášť. Každý den se provede odvoz kolostra z obou stájí k dalšímu zpracování.

V laboratoři probíhá potom vlastní zpracování kolostra na biopreparát. Zpracovává se jen hygienicky získané kolostrum beze stop nečistot nebo krve. Smíchají se vždy kolostra od krav imunizovaných stejnou vakcínou, nakonzervují benzoanem sodným nebo kyselinou benzoovou v 0,3 % koncentraci a uchovávají v 25 l nádobách v chladicím boxu, nebo se nádoby ponoří do nádrže s chlazeným roztokem. Zde je možno kolostrum uchovávat po dobu 1 týdne. Tato základní surovina slouží k výrobě všech dalších forem biopreparátu.

U smíšeného kolostra se provede stanovení hladiny imunoglobulinů, která má být v rozmezí 3 až 10 g na 100 ml. Pro použití kolostra v nativní formě není nutné provést další zpracování. Kolostrum se rozplnilo do polyethylenových sáčků po 1 litru, které se zatavily a uložily ke zmrazení při -15 až -20 °C do mrazicích boxů. Zde byly sáčky uchovávány až po dobu 6 měsíců.

Biopreparát v sušené formě se připravuje z výše popsané výchozí suroviny, a to buď z celého kolostra, nebo jen z kolostrální syrovátky.

Příprava sušeného biopreparátu z kolostrální syrovátky začíná srážením čerstvého, nebo zmrazeného uchovaného kolostra syřidlem Laktosin. Kolostrum je nutno nejdříve zahřát v nádobách ponořených do temperované lázně na teplotu 35 °C. Do ohřátého kolostra se přidává syřidlo v množství 1:10000. Srážení probíhá 2 až 3 hodiny v klidu bez míchání. V případě, že nedojde k vytvoření sraženiny kaseinu může se snížit pH kolostra na 4,6 směsí 0,1 N kyseliny solné a octové (1:1). V tomto případě má získaná kolostrální syrovátka nižší hodnotu pH (4,5 až 3,9), zatímco syrovátka získaná samotným Laktosinem má pH 5,5 až 5,0. Samotný srážecí postup neovlivňuje biologickou aktivitu imunoglobulinů, avšak při delším skladování syrovátky může dojít ke snížení pH na 3,5 i méně, tím již hrozí nebezpečí degradace imunoglobulinů na nižší fragmenty, biologicky neúčinné. Z těchto důvodů jsme syrovátku po vysrážení kolostra ihned odstředili nebo oddělili lisováním přes husté plátno a během 24 až 48 hodin zpracovali na sušený biopreparát. Ze smíšeného kolostra jsme získali 40 až 50 % objemového množství syrovátky. Syrovátka obsahuje především bílkoviny, a to hlavně imunoglobuliny (průměrně 5 g IgG na 100 ml), dále specifické mléčné bílkoviny beta-laktoglobulin a alfa-laktoalbumin, laktózu, řadu stopových prvků, enzymů a vitaminů.

Sušení syrovátky jsme prováděli na sprayovém sušicím zařízení (mlhové sušení). Vyzkoušeli jsme sušicí zařízení firmy NIRO a ANHYDRO (Dánsko), a to jednak laboratorní typ sušicího zařízení, tak i typ II (pětinasobná kapacita oproti laboratornímu zařízení). Podstatné rozdíly v sušení na různých aparaturách nejsou, avšak proces sušení na každém zařízení vykazuje menší individuální odlišnosti ve stupni teploty a rychlosti průletu rozprašovaných částic. Na každé aparatuře je nutno nejšetrnější způsob sušení odzkoušet a stanovit nejvhodnější parametry. Při jejich dodržení se potom biologická hodnota imunoglobulinů v úsušku nemění a proces sušení vyžaduje jen minimální kontrolu. Uvedeme proto parametry, které jsme použili při sušení na zařízení ANHYDRO, laboratorní typ.

Sušicí aparatura se vytemperuje a nastaví konstantní vstupní teplota v rozmezí 220 až 240 °C. Nastavení teploty se provádí při rozprašování destilované vody. Potom se započne s rozprašováním kolostrální syrovátky v atomizéru při otáčkách kolem 35000, aby rozprašované kapky se nelepily na stěnu aparatury. Výstupní teplota se udržuje v rozmezí 75 až 80 °C, čehož se dosáhne regulací přítoku syrovátky do atomizéru. Při tomto postupu rozprašované kapky mají mžikový prolet a jejich povrchová teplota při odpařování nepřesahuje 40 °C, takže nedochází k denaturaci imunoglobulinů. Množství zpracované syrovátky na této aparatuře za hodinu je maximálně 5 litrů.

Získaný úsůšek je značně hydroskopický. Bezprostředně po usušení neobsahuje více jak 5 % reziduální vody. Aby se zamezilo absorbování vlhkosti z ovzduší, sušený preparát se tentýž den rozdělí a zataví do polyetylenových sáčků. Sáčky se uchovávají v temnu při normální teplotě. Z každé šarže se odebírají vzorky pro kontrolu šetrnosti sušicího postupu. Po skončení sušení se každý den vyčistí aparatura, přičemž zbytky sušeného preparátu, které byly nalepeny na stěnách a v potrubí se nepoužívají, jelikož jde o preparát se značně denaturovanou bílkovinou. Sušený preparát z kolostrální syrovátky byl uchováván až po dobu 6 měsíců, bez průkazných změn.

Pro přípravu sušeného preparátu z celého kolostra jsme používali stejného zařízení. K sušení je možno použít kromě horního rozprašování atomizéru také spodního tlakového rozprašování tryskou. Dodržují se stejné teplotní parametry. Jelikož kolostrum má vysoký obsah tuku, použili jsme k homogenizaci tekutého substrátu elektrického míchadla, jinak dojde k oddělování tuku v zásobní nádobě. Sušený preparát z celého kolostra má vysoký podíl tuku v sušině (40 až 50 %), a je proto nutno jej uchovávat v zatavených sáčcích při teplotě +5 °C, a to nejdéle po dobu 3 měsíců. Sušený preparát z kolostra má navíc vysokou nutriční hodnotu a je určen především pro mláďata při raném odstavu.

Preparáty připravené z celého kolostra nebo i z kolostrální syrovátky nejsou sterilní, a to ani v případě, kdy jsou připravovány v sušené formě. Ověřili jsme proto možnost sterilizace kolostrální syrovátky filtrací přes bakteriologické filtry. Používali jsme k těmto účelům Seitzovy filtry, ale je možno využít i membránové filtry firmy Millipore (velikost póru 0,45 μ m) za použití tlaku 0,3 až 0,4 MPa. Zkoušeli jsme také sterilizaci sušených preparátů radiačním zářením, a to kobaltovou bombou v dávce 40 až 50 KGy. Takto ozářené sušené preparáty byly při bakteriologické kontrole sterilní. Neosvědčilo se však ozařování preparátu v tekutém, nativním stavu, jelikož došlo k denaturaci imunoglobulinů.

Pro přípravu biopreparátu z kolostra jsme vyzkoušeli kromě komerčně připravených vakcín "Polyvalentní vakcína proti enterálním kolinfekcím novorozeneých telat" a "Polyvalentní vakcína proti enterálním kolinfekcím novorozeneých selat" vyráběných v Biovetě n.p. Ivanovice na Hané i vlastní vakcíny, které obsahují kromě kmenů obsažených v komerční vakcíně pro telata navíc enteropatogenní kmeny *E. coli* séro skupiny 08:K? a 011:K?, a u vakcíny pro selata navíc kmeny *E. coli* séro skupiny 064:K? a 045:K?.

Dále jsme vyzkoušeli pro přípravu biopreparátu kombinovanou vakcínu sestávající z uvedené vakcíny proti enterálním kolinfekcím novorozenečích selat spolu se suspenzí viru TGE (virus virové gastroenteritidy prasat) z tkáňové kultury.

Obsah specifických protilátek proti vyvolavatelům střevních infekcí se zjišťuje sérologickými metodami, a to u protilátek proti kolinfekcím mikrometodou na plotnách podle Takatsy-ho s kulturami intravitálně barvenými trifenyltetrazolium chloridem. Při vyšetření biopreparátu proti kolinfekcím je nutno prokázat titry proti kapsulárním antigenům (OK-antigeny) v ředění 1:20 až 1:320.

Stanovení celkové bílkoviny se provádí v kolostrální syrovátce, a to biuretovou metodou nebo Kjeldahlizací při použití přepočítavacího faktoru $N \times 6,38$. Hladina celkové bílkoviny by měla být v rozmezí 6 až 16 g na 100 ml.

Stanovení množství hlavního imunoglobulinu G_1 (IgG_1 (IgG_1)) se provádí jednosměrnou radikální imunodifuzí podle Manciniové v agaru za použití specifického králičího antiséra proti hovězímu imunoglobulinu (RAB IgG_2). Princip vyšetření spočívá v precipitační reakci, která vzniká ve formě jednosměrně se zvětšujících zón, jejichž velikost je úměrná množství IgG v naneseném vzorku kolostrální syrovátky do startovacích jamek. Jako srovnávací standardy se použije vzorek hovězího krevního séra, které obsahuje 1,5 g IgG_2 na 100 ml. Zjištěné hodnoty smíšeného kolostra se mají pohybovat v rozmezí 3 až 5 g na 100 ml syrovátky.

Reziduální vlhkost u vyhovujících sušených preparátů je v rozmezí 3 až 8 %. Toto zjištění jsme provedli vážením vzorku před a po sušení při 100 °C v sušárně po dobu 24 hodin.

Poměrně rychlým a jednoduchým vyšetřením, které jsme provedli u sušených preparátů je sledování rozpustnosti sušeného preparátu v destilované vodě a 5 % roztoku NaCl. Sušené preparáty kolostrální syrovátky a kolostra se rozpouští v množství 1:10 na míchačce po dobu 30 minut. Potom se odstředí při 15000 ot./min. po dobu 30 minut a opět zváží nerozpuštěný zbytek. Zbytek nemá přesahovat 10 % původní navážky sušeného preparátu.

Obsah tuku v sušeném kolostru je značně vysoký 40 až 50 % v sušině. V sušené kolostrální syrovátce je naproti tomu značně nízký, což zaručuje další skladovatelnost tohoto sušeného biopreparátu. Naše stanovení ukazovalo, že hodnota tuku je kolem 0,5 %. Zkouška se provádí eterovou extrakcí podle Majaniera.

Ověřování protekčního účinku navrhovaných biopreparátů na bázi kravského kolostra bylo provedeno experimentální infekcí selat a telat enteropatogenními typy *E. coli* dále při spontánním onemocnění enterálními kolinfekcemi telat a selat a při virové gastroenteritidě selat.

Výsledky experimentální infekce u telat ukázaly, že dávka 10 g sušeného biopreparátu kolostrální syrovátky na 1 litr diety zabránila vzniku průjmového onemocnění po infekci enteropatogenním kmenem *E. coli* sérotypu 08+0141. Při aplikaci preparátu z ce-

lého kolostra je potřebná dávka 20 g na 1 litr diety.

Pokusy s experimentální infekcí u selat rovněž ukázaly, že dávka 5 g sušeného kolostra pro sele na den byla dostačující k ochraně zvířat při infekci enteropatogenním kmenem *E. coli* sérotypu 0147:K89,k88.

Využití biopreparátů vyrobených na bázi kravské kolostrální syrovátky byla ověřována i při raném odstavu selat a účinnost byla srovnávána s biopreparátem vyrobeným na bázi imunního hovězího séra. Při aplikaci 5 g na 1 sele po dobu 10 až 14 dnů byl úhyn v důsledku průjemových onemocnění ve skupině selat s aplikací sušené syrovátky 3,6 % a ve skupině s aplikací sušeného séra 5,8 %. V kontrolní skupině bez aplikace biopreparátů byl úhyn selat 12,9 %.

Dále bylo provedeno srovnání účinnosti biopreparátu u konvenčních selat odstavovaných v 28 dnech v lokalitě s výskytem enteropatogenního kmene *E. coli* 0147. V důsledku průjmu docházelo zde u selat ke snížení přírůstku hmotnosti. Při ověřování protekčního účinku byla proto srovnávána hmotnost selat za 3 týdny po odstavu. Ve skupině selat s aplikací sušeného biopreparátu v dávce 10 g na 1 sele po dobu 10 dnů byl oproti kontrole zjištěn vyšší přírůstek hmotnosti o 6 %, zatímco ve skupině s aplikací sušeného imunního séra byl přírůstek hmotnosti vyšší o 4,8 %.

Při získávání selat s minimální nemocností byla prevence průjemového onemocnění prováděna u více jak 200 hysterektomovaných selat odchovávaných v otevřeném systému bez izolátorů. Prevence byla prováděna od 3. do 15. dne po narození aplikací sušeného kolostra v množství 10 g na 1 sele. Úhyn při tomto způsobu prevence nepřesáhl 4 %, zatímco v období před aplikací sušeného kolostra se pohyboval úhyn selat mezi 10 až 15 %.

U telat bylo využití navrhovaných biopreparátů odzkoušeno ve velkokapacitních teletnicích. Zde bylo provedeno srovnání ochranného účinku biopreparátu ze sušené kolostrální syrovátky a sušeného imunního séra. Srovnáván byl jednak úhyn telat a dále množství zvířat onemocnělých průjemem.

Ve skupině s aplikací sušené kolostrální syrovátky v množství 20 g na 1 tele po dobu 14 dnů nebyl zaznamenán úhyn a 66,6 % ze zastavených zvířat onemocnělo průjemem. Ve skupině s aplikací sušeného krevního séra nebyl rovněž zaznamenán úhyn a 80 % telat onemocnělo průjemem. V kontrolní skupině uhynulo 16 % zvířat a průjem mělo všech 100 % zastavených zvířat. V těchto pokusech aplikované preparáty ze sušeného séra a sušené kolostrální syrovátky nahradily běžně používaná antibiotika, však preparát z kolostra nebo kolostrální syrovátky jsou podle našich kalkulací asi 10x levnější.

201 389

P ř e d m ě t v y n á l e z u

1. Biopreparát na ochranu mláďat hospodářských zvířat proti střevním infekcím, vyznačující se tím, že se skládá z kolostra nebo kolostrální syrovátky imunizovaných krav z prvního dne po otelení, obsahuje specifické protilátky proti vyvolavatelům střevních infekcí prokazatelné v ředění 1:20 až 1:320 a má celkové množství imunoglobulinu G v rozsahu 3 až 10 g na 100 ml.
2. Biopreparát podle bodu 1, vyznačený tím, že kolostrální syrovátka a celé kolostrum je v nativní, tekuté formě nebo v sušené formě.

do 5. řádky

O P R A V A

popisu vynálezu k autorskému osvědčení č.201 369
/51/ Int.Cl.² A 61 K 35/20 // A 61 K 39/395

V popisu vynálezu k autorskému osvědčení č.201 369 je u čtvrtého
autora uveden chybný titul.

Místo:...,DRESSLER JIŘÍ ing.,

Správně:..., DRESSLER JIŘÍ MVDr.,

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY
