



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

209351

(11)

(B1)

(22) Prihlášené 23 12 77

(21) (PV 8738-77)

(40) Zverejnené 17 09 79

(45) Vydané 01 07 83

(51) Int. Cl.³
A 61 K 39/40
C 12 N 1/20

(75)

Autor vynálezu ŠNIRC JÚLIUS MVDr. a KOVÁČ JOZEF MVDr., NITRA

(54) Inaktivovaná očkovacia látka proti infekčnej atrofickej rinitíde ošipaných a spôsob jej výroby

Vynález sa týka spôsobu výroby inaktivovanej očkovacej látky proti infekčnej atrofickej rinitíde ošipaných z mikroorganizmu Bordetella bronchiseptica, ktorá má dobré imunizačné vlastnosti a ktoré možno použiť na prevenciu infekčnej atrofickej rinitídy ošipaných. Vynález sa tiež týka aj samotnej očkovacej látky.

Na prevenciu infekčnej atrofickej rinitídy ošipaných sa v súčasnosti používa perorálne alebo parenterálne podávanie rôznych antibiotík, sulfonamidov a iných farmakologických prípravkov. Na tomto základe boli u nás navrhnuté a v praxi použité niektoré metódy terapie a prevencie infekčnej atrofickej rinitídy ošipaných.

Šrubař, B. (Veterinářství, 21: 234–236, 1971) podával asi 10 dní pred pôrodom prasniciam chlortetracyklín vo forme Aureovitu v dávkach 100 g na 100 kg živej hmotnosti, spolu s 20 g sulfadimidínu. Štvrtý až piaty deň po zahájení perorálnej aplikácie liečiv sa prasniciam vypláchnu obidve nosné dutiny 1% vodným roztokom chlortetracyklínu. Okrem toho sa aplikovali prasniciam intramuskulárne 2 g streptomycínu alebo oxytetracyklínu v dávke 20 až 25 ml. Po tomto ošetrení sú prasnice premiestnené do vydezinfikovanej pôrodnice, kde sa pokračuje v podávaní chlortetracyklínu. Miesto vyplachov nosných dutín doporučuje podávať chlortetracyklín aerosolom po dobu asi

1 hodiny denne za 4 dni. Doporučuje sa aplikovať znovu antibiotiká pred pôrodom, alebo v priebehu pôrodu. Ciciakom sa podáva 3. až 4. deň po narodení 3 ml Ferridextranu a vitamín A a D per os vo forme hydrosolu. Ciciaky sa odstavujú vo veku 3 až 4 týždňov. Pri podozrení výskytu infekčnej atrofickej rinitídy sa u ciciakov vykoná popísaná liečebná procedúra.

Škaloud, J. a spol. (Veterinaria Spofa, 17: 69–92, 1975) sledovali účinnosť preparátov Neomix (Spofa-tylosin + Sulfadimidín), Neomix (Spofa) v kombinácii s tylanom pro inj. (Elanco), Spectamu (ABBOTT) a Gallimycín (ABBOTT) na výskyt a priebeh atrofickej rinitídy. Najlepšie sa osvedčil prípravok Neomix pri porovnaní s ostatnými v užitkových chovoch s nízkou zootechnickou úrovňou v tom smere, že viedol k výraznému zvýšeniu hmotnostných prírastkov, k zníženiu úhynu a čiastočnému zníženiu infekčnej atrofickej rinitídy. Autori sa domnievajú, že uvedené preparáty s antibakteriálnymi účinkami nie sú schopné samé likvidovať infekčnú atroficкую rinitídu.

V zahraničí Switzer, W. F. (Vet. Med., 58: 571–574, 1963) podával sulphamethazin v dávke 100 g na 1 tonu krmiva ošipaným, ktoré boli experimentálne infokované Bordetellou bronchisepticou. Liečivo bolo podávané 3 až 5 týždňov.

S podstatne vyššími dávkami Sulphamethazinu, 100 až 500 g na 1 tonu krmiva po dobu 3 týždňov, zaznamenali výsledky (Akkermans, J. P. W. M. a spol., Tijdsch. Diergeneesk., 93: 964–972, 1968).

Woods, G. T. a spol. (Canad. J. Comp. Med., 36: 49–54, 1972) podávali počas 3 týždňov kombináciu antibakteriálnych látok v zložení 50 mg chlortetracyklínu, 50 mg sulphamethazínu a 25 mg prokain-penicilínu na 453,6 g krmiva. Dospeli k záveru, že uvedená zmes je efektívna v eradikácii zárodkov *Bordetella bronchiseptica* v nosnej dutine.

Po dlhodobom používaní uvedených liečiv sa objavujú rezistentné kmene mikroorganizmu *Bordetella bronchiseptica*. Harris, D. L. a Schwitzer, W. P. (Amer. J. Vet. Res., 30: 1161–1165, 1969) pri vyšetrovaní zistili v 20 z 25 stád (80 %) výskyt rezistentných kmeňov *Bordetella bronchiseptica* k sulfonamidom. Okrem toho popísali Terakado, N. a spol. (Antimicrob. Ag. Chemoter., 3: 555 až 558, 1973) rezistentné kmene k sulfadimetoxinu, streptomycínu a aminobenzylpenicilínu. Vznikli aj ďalšie problémy v súvislosti s podávaním spomínaných chemických prípravkov, ako je výskyt rezistentných kmeňov iných druhov mikroorganizmov v populácii ošipáných, výskyt nových infekcií a v neposlednom rade aj nutnosť obmedzenia používania antibiotík z hľadiska obecného zdravia.

Kashiwazaki, M. a spol. (Nat. Inst. Anim. Health Quart., 12: 17–22, 1972); Koníček, J. a spol. (Vesmír, 51: 71 až 73, 1972); Rankin, D. A. (JAVMA, 167: 274 až 278, 1975); Van Os, J. L. (Tijd. Diergeneesk., 100: 999, 1975).

Na základe uvedeného je v súčasnosti potrebné zaviesť vhodný biologický preparát na prevenciu infekčnej atrofickéj rinitídy ošipáných.

Podľa nami uvedených pokusov sa ukázalo, že je možné vyrobiť inaktivovanú očkovaciu látku proti infekčnej atrofickéj rinitíde z bakteriálnej kultúry pripravenej submerzným spôsobom kultivácie mikroorganizmu *Bordetella bronchiseptica* v I. rastovej fáze. Mikroorganizmy v I. rastovej fáze obsahujú K antigén a tento antigén je schopný vyvolať u myši ochranný účinok proti intracerebrálnej infekcii; vykazuje aglutináciu s K antisérom; vyvoláva nekrózu pri intrakutánom injekčnom podaní morčatám; musia mať dobré hemaglutinačné vlastnosti (aglutinujú králičie erytrocyty do titra 1 : 32); vysokú kyslú aglutináciu (v McIlvaného pufré do hodnoty pH 4,2 až 4,6); v teste toxicity supernatant z bakteriálnych kultúr spôsobuje úhyn myši do riedenia 1 : 8 až 1 : 32 a v 10% roztoku NaOH mikroorganizmy lyzujú do 30 minút.

Pre výrobu inaktivovanej očkovacej látky podľa vynálezu sa používajú 4 kmene *Bordetella bronchiseptica*, ktoré spĺňajú uvedené rastové požiadavky. Kmene boli izolované autormi vynálezu od ošipáných v priebehu akútneho ochorenia infekčnej atrofickéj rinitídy a sú uložené v „Československej sbírke mikroorganizmů Univerzity J. E. Pur-

kyně, Brno, tř. Obránců míru 10“. Kultúry sú uložené pod týmito číslami:

Kultúra č.:	lokalita izolácie:
Č – 1 = CCM 3304	Čergov
P – 5/2 = CCM 3305	Preseľany
DP – 7 = CCM 3306	Dolný Peter
DP – 5 = CCM 3307	Dolný Peter

Autori vynálezu skúšali rôzne druhy živných médií a rôzne stimulatory rastu tak, aby mikroorganizmy obsiahnuté v bakteriálnej kultúre, z ktorej je vyrábaná inaktivovaná očkovacia látka, rástli v I. fáze. Bolo zistené, že kombinácia „Sójového živného média“, ktoré predstavuje roztok aminokyselín (proteínov) získaný enzymatickou hydrolyzou depilidizovanej sójovej múky, obsahujúceho 350 mg % celkového dusíka, 150 mg % aminodusíka a NaCl 0,4 g/100 ml. K tomuto produkčnému médiu sú pridané rastové stimulatory, ktorými sú 1% vodný roztok kvasničného extraktu (predstavuje vodný roztok čerstvých autolyzovaných kvasníc), 10% vodný roztok prípravku Bacto Casamino acids (firemný názov pre zmes aminokyselín získaný kyslou hydrolyzou kazeínu, obsahuje celkový dusík 10 %, NaCl 14 %, popol 15 %, fosfor ako kyslíčnik fosforičitý 2 %) a albumínová frakcia krvného séra alebo plazmy ošipáných v množstve 0,1 až 1,5 % (objemových), spĺňa tieto rastové požiadavky, že očkovacia látka vyrobená z mikroorganizmu *Bordetella bronchiseptica*, kultivovaného v uvedenej živnej pôde, má dobrý preventívny účinok proti infekčnej atrofickéj rinitíde ošipáných.

Podstatou vynálezu teda je inaktivovaná očkovacia látka proti infekčnej atrofickéj rinitíde ošipáných, ktorá obsahuje v 1 ml 2×10^8 až 20×10^8 inaktivovaných zárodkov baktérií *Bordetella bronchiseptica* adsorbovaných na gel hydroxidu hlinitého, a to kmene baktérií CCM 3304, CCM 3305, CCM 3306, CCM 3307.

Pre výrobu inaktivovanej očkovacej látky sa používajú baktérie *Bordetella bronchiseptica* v I. rastovej fáze, ktoré sa kultivujú v sójovom živnom médiu, obhatom o rastovo-stimulačné faktory, ktorými sú zmes aminokyselín, získaných kyslou hydrolyzou kazeínu v množstve 0,5 až 1,5 hmotnostných %, kvasničný extrakt v množstve 0,05 až 0,15 hmotnostných %, albumínová frakcia z krvného séra alebo plazmy ošipáných v množstve 0,01 až 0,15 hmotnostných %, vzťahnuté na hmotnosť živného média, pri teplote 36 až 37 °C, po dobu 20 až 36 hodín a potom sa získaná bakteriálna kultúra inaktivuje 4,8 až 5,2 % vodným roztokom formalínu v množstve 3,9 až 4,1 objemových % vzťahnuté na objem kultúry, následne sa adsorbuje na gel hydroxidu hlinitého, ktorého množstvo je 30 až 35 objemových % vzťahnuté na objem kultúry a po sedimentácii sa koncentruje odstránením supernatantu.

Prínos tohto vynálezu spočíva v tom, že nami vyrobená očkovacia látka vytvorí u očkovaných ošipáných dobrú aktívnu imunitu proti infekčnej atrofickéj rinitíde. Úplne alebo čiastočne odstráni

používanie chemických prípravkov používaných na prevenciu tejto nákazy. Zníži náklady spojené s podávaním týchto prípravkov na prevenciu, a tým celkovo zlepši ekonomiku chovu pri výrobe bravčového mäsa. Zníži sa množstvo používaných rôznych širokospektrálnych antibiotík, čím sa zúžia možnosti výskytu prenosnej rezistencie.

Vakcína je kontraindikovaná v chovoch, kde prebieha iné nákazlivé ochorenie prasiat a nesmie sa podávať u prasníc menej ako 14 dní pred pôrodom.

Vakcína sa aplikuje podkožne do voľného väziva prekolennej riasy, alebo pri koreni ušného boltca.

Po aplikácii vakcíny nevznikajú žiadne reakcie.

Prasnice sa vakcinujú dvakrát v druhej polovici gravidity vždy s odstupom 14 dní, dávkami 10 ml. Druhá dávka musí byť podaná najneskôr 14 dní pred očakávaným pôrodom. Prasiatka sa vakcinujú dvakrát a to vo veku 14 a 28 dní dávkou 3 ml.

Imunita nastupuje za 10 až 14 dní po poslednej dávke vakcíny. Imunné prasnice sú schopné kolostralnou cestou chrániť svoje mláďatá proti infekcii dýchacích ciest zárodkami *Bordetella bronchiseptica* počas jedného pôrodu. Vakcinované prasiatka sú schopné aktívnou tvorbou špecifických protilátok chrániť sliznicu dýchacích ciest voči infekcii v období pôrodu.

Vakcína je vyhovujúca, ak priemerný titer špecifických aglutinačných protilátok dosahuje hodnotu 1 : 640.

Expiračná doba vakcíny pri dodržaní skladovacích podmienok je 1 rok.

Príklad prevedenia

K sterilnému „Sójovému živnému médiu“ sa za aseptických podmienok pridá 0,5 až 1,5 % (hmotnostných), optimálne 0,8 % hmotnostných prípravku Bacto Casamino acids, 0,05 až 0,15 % (hmotnostných) s optimom 0,08 % prípravku Yeast extract a 0,01 až 0,15 hmotnostných % albumínovej frakcie. Do takto pripravenej kultivačnej tekutej pôdy sa naočkuje mikroorganizmus *Bordetella bronchiseptica* I. rastovej fázy. Kultivácia prebieha pri 36 až 37 °C za stáleho miešania pri 170 ob/min. a prívode sterilného vzduchu 7 l/min. nepretržite počas celej kultivácie. pH je udržiavané na hodnote 7,6. Pri poklese priepustnosti na 50 % (meranej na Spekle proti referenčnej vzorke pri 575 nm) sa kultivácia ukončí. Dĺžka kultivácie je 20 najdlhšie 36 hodín. Po ukončení kultivácie sa bakteriálna kultúra inaktivuje 5 % vodným roztokom formalínu v pomere 4 % k objemu kultúry. Po 30 min. inaktivácii sa kultúra adsorbuje na $Al(OH)_3$ -gel v pomere 33 % k objemu kultúry a naadsorbovaná kultúra sa nechá 48 hodín sedimentovať. Po sedimentácii sa inaktivovaná očkovacia látka zahustí na 1/3 pôvodného objemu odsatím supernatantu a upraví sa aktuálna acidita na hodnotu 5,8 až 6,8 pomocou hydrofosforečnanu sodného.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Inaktivovaná očkovacia látka proti infekčnej atrofickému rinitíde ošípaných, vyznačujúca sa tým, že 1 ml obsahuje 2×10^8 až 20×10^8 inaktivovaných zárodkov baktérií *Bordetella bronchiseptica* a to kmene baktérií CCM 3304, CCM 3305, CCM 3306, CCM 3307, adsorbovaných na gel hydroxidu hlinitého.

2. Spôsob výroby inaktivovanej očkovacej látky podľa bodu 1, ktorá sa vyrába z baktérií *Bordetella bronchiseptica* v I. rastovej fáze, vyznačujúci sa tým, že sa kultivuje I. rastová fáza baktérií *Bordetella bronchiseptica* v sójovom živnom médiu obohatenom o rastovo-stimulačné faktory, ktorými sú zmes aminokyselín získaných kyslou hydrolyzou kazeínu, v množstve 0,5 až 1,5 hmotnostných %, kvasničný extrakt v množstve 0,05 až 0,15 hmotnostných %, albumínová frakcia z krvného séra, alebo plazmy ošípaných v množstve 0,01 až 0,15 hmotnostných %, vztiahnuté na hmotnosť

živného média, pri teplote 36 až 37 °C, po dobu 20 až 36 hodín a potom sa získaná bakteriálna kultúra inaktivuje 4,8 až 5,2 % vodným roztokom formalínu v množstve 3,9 až 4,1 objemových % vztiahnuté na objem kultúry, následne sa adsorbuje na gel hydroxidu hlinitého, ktorého množstvo je 30 až 35 objemových % vztiahnuté na objem kultúry a po sedimentácii sa koncentruje odstránením supernatantu.

3. Spôsob výroby podľa bodu 2, vyznačujúci sa tým, že baktérie *Bordetella bronchiseptica* predstavujú kmene baktérií CCM 3304, CCM 3305, CCM 3306, CCM 3307.

4. Spôsob výroby podľa bodu 2 a 3, vyznačujúci sa tým, že sa používajú rastovo-stimulačné faktory v zložení 0,8 hmotnostných % zmesi aminokyselín získaných kyslou hydrolyzou kazeínu, albumínovej frakcie z krvného séra, alebo plazmy ošípaných, vztiahnuté na hmotnosť živného média.