



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

246791
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
A 61 K 39/12

(22) Přihlášeno 29 03 85
(21) (FV 2302-85)

(40) Zveřejněno 17 04 86

(45) Vydáno 15 12 87

(75)
Autor vynálezu

RYBNIKÁŘ ALOIS RNDr., BRNO, CHUMELA JOSEF MVDr.,
VRZAL VLADIMÍR MVDr., IVANOVIC na Hané,
HEJTMÁNEK MILAN doc. RNDr. DrSc., WEIGL EVŽEN MUDr. CSc.,
OLOMOUC

(54) Avirulentní vakcína proti trichofytóze skotu a způsob její výroby

1

Vynález se týká avirulentní vakcíny proti trichofytóze skotu a způsobu její výroby. Vakcína je určena k profylaxi trichofytózy skotu.

Trichofytóza skotu je kožní onemocnění, postihující především mladý skot do stáří jednoho roku. Průměrný měsíční počet zvířat, postižených touto nákazou, se v ČSSR pohyboval v letech 1970 až 1976 kolem 10 tisíc až 14 000 kusů, což způsobilo našemu národnímu hospodářství velké ztráty. Po zavedení plošné vakcinace telat v roce 1976 se počet ohnisek trichofytózy i počet nemocných zvířat každoročně výrazně snížil, až koncem roku 1983 se podařilo tuto nákazu v ČSSR jako prvnímu státu na světě v chovech skotu utlumit. Hlavní podíl na utlumení trichofytózy skotu u nás měla nesporně vakcína proti trichofytóze skotu živá lyofilizovaná (čs. autorské osvědčení číslo 201 481). Vakcína je připravena ze živého silně virulentního kmene *Trichophyton verrucosum*, takže při její výrobě, kontrole a praktickém použití dochází k ohrožení zdraví lidí a při nesprávné aplikaci i zdraví zvířat. Podobné nevýhody přináší i sovětská vakcína LTF-130 (čs. autorské osvědčení č. 160 324), která obsahuje živý virulentní kmen *Trichophyton faviforme*. Vakcína, vyvinutá polskými autory (patent PLR číslo

2

100 953), je sice připravena z virulentního kmene *Trichophyton verrucosum*, který má však oproti uvedeným výrobním kmenům a našim avirulentním kmenům CCM F-751 a CCM F-764 podstatně nižší výtěžnost. Také doba expirace polské vakcíny (4 týdny) je v porovnání s naší avirulentní vakcínou podstatně kratší (doba expirace naší vakcíny je 1 rok).

Předmět našeho vynálezu, avirulentní vakcína proti trichofytóze skotu, zamezuje riziku ohrožení zdraví zvířat a velmi pravděpodobně i lidí, neboť je vyrobena z avirulentního kmene *Trichophyton verrucosum*. Oproti dříve vyráběné naší i zahraniční vakcíně představuje vakcína kvalitativně vyšší stupeň tohoto výrobního produktu. Také způsob její výroby je oproti předchozím zjednodušen a zkvalitněn. Přitom bylo v pokusech na telatech a morčatech prokázáno, že protekční vlastnosti avirulentní vakcíny jsou plně srovnatelné s vakcínou, připravenou z virulentního kmene *T. verrucosum*.

Avirulentní kmen *Trichophyton verrucosum* CCM F-751, který je součástí vakcíny, se vyznačuje rychlejším růstem, rychlejším nástupem tvorby mikrokonidií, vyšší sporulací a vyšší schopností přežívat lyofilizaci než virulentní kmen *T. verrucosum* CCM F-650, který je obsažen ve vakcíně proti tri-

chofytóze skotu živé lyofilizované (čs. autorské osvědčení č. 201481). Tyto vlastnosti a především vyšší výtěžnost kmene M-9A, umožňují použít k výrobě vakcíny mladší kulturu od 11denního stáří, což usnadňuje technologii výroby (možnost použití ředěného kultivačního média, menší denzity inokula, kratší doby homogenizace kultury, zastavení menšího množství mikrokonií v jednotce objemu vakcíny apod.). Zároveň dochází i ke zvýšení produktivity práce.

Podobnými vlastnostmi, jako kmen M-9A, se vyznačuje též avirulentní kmen *T. verrucosum* TV-M-8 (= CCM F-764), který je možno také použít k výrobě vakcíny.

Podstatou našeho vynálezu je avirulentní vakcína proti trichofytóze skotu a způsob její výroby. Avirulentní vakcína proti trichofytóze skotu se vyznačuje tím, že obsahuje 2,5 až 10 miliónů životaschopných mikrokonií avirulentního kmene *Trichophyton verrucosum* Bodin 1902 CCM F-751 nebo CCM F-764 v 1 cm³ zředěné vakcíny. Způsob výroby se vyznačuje tím, že avirulentní kmen *T. verrucosum* se pomnožuje na vhodné živné půdě při pH = 6,6 až 6,9 po dobu 11 až 18 dnů, při teplotě 26 až 28 °C, narostlá kultura se homogenizuje ve sterilním ochranném médiu, rozplní se do lékovky a lyofilizuje.

Zkušenosti sovětských autorů ukazují, že po přerušení vakcinace v oblastech, kde byla trichofytóza skotu utlumena, došlo opět ke vzplanutí této nákazy. Původce onemocnění, houba *Trichophyton*, je schopný přežívat ve stájovém prostředí po dobu 7 až 10 let při zachování patogenity. Proto se doporučuje provádět vakcinaci všech narozených telat po dobu 10 let od vyléčení posledně nakaženého zvířete v chovu.

Vakcinace skotu avirulentní vakcínou proti trichofytóze má významnou přednost z epidemiologického hlediska, neboť zamezuje vnášení živých virulentních elementů *T. verrucosum* do chovů hospodářských zvířat, jak je tomu při očkování telat vakcínou, připravenou ze silně virulentního kmene *T. verrucosum* (*T. faviforme*). V místě vpichu virulentní vakcíny dochází totiž ke vzniku krusty o průměru 1 až 3 cm, která se může stát potenciálním zdrojem nákazy pro vnímavá zvířata a pro člověka, protože obsahuje infekční houbové elementy. Po vakcinaci avirulentní vakcínou k vytvoření uvedených krust nedochází; kultivačním vyšetřením pokožky v místě vpichu vakcíny nebyl vakcinační kmen prokázán.

Praktické využití avirulentní vakcíny proti trichofytóze skotu vytváří předpoklad pro udržení beznákazového stavu v našich chovech skotu pokud jde o trichofytózu a zároveň i předpoklad pro snížení výskytu trichofytózy u lidí. Otevírají se také možnosti nabídky tohoto přípravku zahraničním odběratelům.

Použitím avirulentního kmene se sníží náklady na dezinfekční prostředky, které by bylo nutné vynaložit při výrobě virulentní vakcíny a při její praktické aplikaci.

Způsob vakcinace zvířat avirulentní vakcínou je stejný jako u vakcíny proti trichofytóze skotu živé lyofilizované (AO číslo 201481); aplikace dvou dávek hluboko intramuskulárně v krajině bederní nebo křížové s intervalem 10 až 14 dnů mezi vakcinací a revakcinací. Vakcinaci doporučujeme provádět v levé a revakcinaci v pravé polovině těla. Profylaktické dávky pro telata stáří 1 až 3 měsíce jsou dvakrát 2,5 cm³ a u skotu nad 3 měsíce dvakrát 5 cm³ vakcíny.

Příklad 1

Příprava 160 000 dávek vakcíny

Pomnožení výrobní kultury probíhá na živné půdě následujícího složení: 10 litrů čerstvé pivovarské sladinky, 30 l destilované vody, 600 g agarů, 200 g petonu, 800 mg thiaminu a 800 mg kyseliny L-glutamové. Sterilizace probíhá při přetlaku 60 až 80 kPa po dobu 30 minut. Koncentrace vodíkových iontů živné půdy je upravena na pH 6,6 až 6,9. Ředěný sladinkový agar je rozlit asi po 300 cm³ do kultivačních lahví dle Rouxeho o obsahu 2 litrů. Láhve s živnou půdou, uzavřené vatovými zátkami obalenými pergamenovým papírem nebo celofánem, jsou opět outoklávovány při přetlaku 60 až 80 kPa po dobu 30 minut. Pro potvrzení mikrobiální sterility jsou kultivační láhve se ztuhlým živným médiem inkubovány po dobu 3 až 5 dnů v termostatu při +37 °C.

K inokulaci živné půdy je použito inokulum výrobního kmene CCM F-751 (nebo CCM F-764), udržované v lyofilizovaném nebo ve zmrazeném stavu. Inokulace se provádí pipetovací stříkačkou, na jednu kultivační láhev použijeme 2 až 20 × 10⁷ životaschopných vegetativních forem, aplikovaných v 10 cm³ fyziologického roztoku. Inokulum je nutno ihned po inokulaci rozmístit po celém povrchu živné půdy krouživými pohyby kultivačních lahví. Inkubace výrobní kultury probíhá při teplotě +26 až +28 °C v poloze kultivačních lahví živným médiem dolů. 11 až 18denní kultura výrobního kmene je oddělena pomocí kovových kliček a motýček od živné půdy a homogenizována v homogenizátoru. K homogenizaci porostu ze 2 až 4 kultivačních lahví použijeme 1 litr ochranného média (500 cm³ fyziologického roztoku + 500 cm³ lyofilizačního média složení: destilovaná voda 1 litr, želatina pro bacto 50 g, sacharóza 75 g). Doba homogenizace při postupném zvyšování počtu otáček homogenizátoru (6 500 až 10 000 otáček za min) je 3 až 5 minut. Koncentrát vakcíny je filtrován přes gázu do zásobní láhve. V

odebraném vzorku koncentráту je mikroskopicky určen počet mikrokonidií a podle zjištěných hodnot jsou pak určeny dávky pro rozplnění koncentráту vakcíny tak, aby výsledná koncentrace byla 2,5 až 10 miliónů mikrokonidií v 1 cm³.

Koncentrát vakcíny je rozplněn do lékovky obsahu 20 cm³ a zmrazen po dobu alespoň 6 až 12 hodin při teplotě -40 °C nebo 4 až 8 hodin při teplotě -50 °C. První fáze sušení v lyofilizačním zařízení probíhá při maximální teplotě desek +50 °C a maximální teplotě produktu 0 °C po dobu 6 až 15 hodin. Při druhé fázi sušení (18 až 30 h) je maximální teplota desek +28 °C a maximální teplota produktu +25 °C. Sušení je ukončeno, když dojde k souběhu křivek teploty desek a materiálu po dobu 12 až 14 hodin. Lékovky s usušenou vakcínou jsou uzavírány gumovými zátkami ve vakuu a zajišťují se hliníkovými pertlemi.

Výroba vakcíny probíhá v podmínkách sterilního prostředí, materiálu a pomůcek.

Lyofilizovaná vakcína se těsně před použitím ředí zředňovačem A (pufrovaný fyziologický roztok).

S vakcínou jsou prováděny tyto kontrolní zkoušky:

1. Zkouška čistoty kultury a bakteriální sterility se provádí s 0,5 cm³ vakcíny a jejím rozočkováním na krevním agaru, masopeptonovém agaru, masopeptonovém bujónu, glukózovém agaru a Sabouraudově agaru. Zkouška bakteriální sterility je posuzována po dobu 72 h (Petriho misky) a 7 dnů (zkumavky) při teplotě +37 °C a po dobu 9 dnů při teplotě +20 °C (zkumavky). Zkouška čistoty kultury je ukončena po 10 dnech inkubace při teplotě +26 až +28 °C.

2. Zkouška neškodnosti vakcíny se provádí očkováním 3 cm³ vakcíny dvěma králíčkům (hmotnost 2,5 až 3,5 kg) hluboko intramuskulárně. Po aplikaci vakcíny nesmí v průběhu 14 dnů dojít k úhynu ani místním či celkovým změnám zdravotního stavu zvířat.

3. Zkouška avirulence vakcíny. Do oholené skarifikované zdravé pokožky tří morčat (hmotnost 250 až 350 g) se vetře na plochu asi 3×4 cm 0,2 cm³ vakcíny. Po inokulaci nesmí dojít v místě aplikace k vytvoření typických trichofytických lézí. Doba pozorování: 14 dnů.

4. Zkouška účinnosti vakcíny stanovením počtu životaschopných vegetativních forem výrobního kmene. Provádí se výsevem ředěné vakcíny (ředění 10⁻⁵ a 10⁻⁶) na Sabouraudův agar s následným počítáním narostlých kolonií výrobního kmene po 9 dnech inkubace při +26 až +28 °C. Zkouška účinnosti je vyhovující, obsahuje-li 1 cm³ zředěné vakcíny 2,5 až 10×10⁶ životaschopných vegetativních forem výrobního kmene.

5. Stanovení koncentrace vodíkových ion-

tů se provádí měřením pH na pH-metru. pH vakcíny je 6,0 až 7,5.

6. Stanovení zbytkové vlhkosti lyofilizátu: maximální přípustná hodnota je do 3 %. Zjistí se z úbytku hmotnosti lyofilizátu po vysušení.

7. Zkouška na vakuum se provádí pomocí vysokofrekvenčního elektrického zkoušeče vakua. Vakuum je vyhovující, je-li tlak menší než 2,66 Pa.

Příklad 2

Příprava vakcíny s použitím jednoduchého lyofilizačního média

Jako kultivační médium je použit agar se sladidlovým extraktem (Imuna, n. p., Šarišské Michalany). Sterilizace živné půdy a její rozplnění proběhlo stejně jako v příkladu 1. Inokulace živného média výrobním kmenem CCM F-751 (nebo CCM F-764) se provádí v množství 2 až 20×10⁷ životaschopných vegetativních forem na jednu kultivační láhev. Kultura je inkubována při teplotě +26 až +28 °C. Kultivační láhve s pomnožující se kulturou jsou každodenně prohlíženy a makroskopicky je hodnocena čistota kultury. Kultivace je ukončena po 11 až 18 dnech růstu. Kultura narostlá ve dvou až čtyřech kultivačních lahvích je homogenizována v prostředí 500 cm³ protektivního lyofilizačního média (7,5% nebo 15% roztok sacharózy v destilované vodě) a suspenze je přelita přes řídkou gázu do zásobní láhve. Zásobní láhev s vakcínou je uzavřena gumovou zátkou s pergamenovými papíry a umístěna na 24 hodin do chladné místnosti při +2 až +8 °C, nebo umístěna po dobu několika dnů do mrazicí místnosti při teplotě -18 °C. Po uvedené době je podle výsledků zkoušek čistoty kultury a bakteriální sterility (viz shora) koncentrát vakcíny rozplněn, zmrazen a lyofilizován. Rozplnění koncentrátu je provedeno tak, aby v 1 cm³ vakcíny po zředění bylo 2,5 až 10 miliónů mikrokonidií.

Tímto způsobem dojde k úspoře lyofilizační kapacity, protože je zkrácena doba sušení lyofilizátu, je rozplněno menší množství koncentrátu vakcíny do lékovek a nepoužívá se kontaminovaná vakcína k lyofilizaci. Počet dávek výrobku ze stejného množství kultivačního média je přitom stejný jako v příkladu 1.

Zmrazení a lyofilizace vakcíny probíhá při stejných poměrech, jak je uvedeno v příkladě 1. Po skončeném sušení jsou lékovky uzavřeny ve vakuu a provedou se zkoušky u vakcíny stejně jako v příkladu 1.

Doba expirace vakcíny je 12 měsíců od ukončení kontrolních zkoušek při dodržení zásad uchovávání biopreparátů (v temnu, suchu, při teplotě +2 až +8 °C).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Avirulentní vakcína proti trichofytóze skotu, vyznačující se tím, že obsahuje 2,5 až 10 miliónů životaschopných mikrokoniidií avirulentního kmene *Trichophyton verrucosum* Bodin 1902 v 1 cm³ zředěné vakcíny.

2. Vakcína podle bodu 1, vyznačující se tím, že obsahuje mikrokoniidie avirulentního kmene *Trichophyton verrucosum* CCM F-751 nebo CCM F-764.

3. Způsob výroby vakcíny podle bodu 1, vyznačující se tím, že avirulentní kmen *Trichophyton verrucosum* se pomnožuje na živné půdě obvyklé při pomnožování kmene *Trichophyton*, při pH = 6,6 až 6,9, při teplotě 26 až 28 °C, po dobu 11 až 18 dnů, narostlá kultura se oddělí od kultivačního mé-

dia a homogenizuje se ve sterilním ochranném médiu.

4. Způsob podle bodu 3, vyznačující se tím, že homogenizace ve sterilním ochranném médiu probíhá po dobu 3 až 5 minut.

5. Způsob podle bodů 3 a 4, vyznačující se tím, že sterilní ochranné médium obsahuje fyziologický roztok se želatinou a sacharózou nebo roztok sacharózy.

6. Způsob podle bodů 3 až 5, vyznačující se tím, že koncentrát vakcíny se rozplňuje a následně zmrazuje a lyofilizuje.

7. Způsob podle bodu 6, vyznačující se tím, že sušení probíhá ve dvou fázích, přičemž první fáze sušení trvá 6 až 15 hodin při maximální teplotě produktu 0 °C a druhá fáze sušení trvá 18 až 30 hodin při maximální teplotě produktu 25 °C.