



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

231 145

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlášené 28 02 83
(21) PV 1377-83

(51) Int. Cl.
C 12 P 1/04

(40) Zverejnené 15 02 84
(45) Vydané 01 06 86

(75)
Autor vynálezu

SOVA OTO MUDr.CSc., KOŠICE,
VIEŠT MIROSLAV MVDr., NITRA

(54)

Sposob výroby subcelulárnej parenterálnej
látky proti neonatálnej kolienteritíde a
kolihnačke prasiat

Vynález sa týka nového spôsobu izolácie pilusového telového antigénu K 88 enteropatogénnych baktérií *Escherichia coli*. Úvedený izolovaný antigén slúži buď k imunizácii prasných prasníc osve, alebo ako doplnok k iným vakcínam proti črevným zápalom a hnačkám novorodencov.

Pre nízke výrobné náklady a jednoduchú manipuláciu nachádza široké použitie v živočíšnej veľkovýrobe, kde podstatne prispieva k znižovaniu úhynu ciciakov.

Vynález sa týka spôsobu výroby účinnej subcelulárnej parenterálnej látky proti neonatálnej kolienteritíde a kolihnačke prasiat, podávanej prasným prasniciam 6 týždňov pred pôrodom injekčne do svalu, alebo podkožia.

Kolienteritída a kolihnačka novorodených prasiat je vážnym problémom veľkochovov oštipaných. Jej zdolanie bežnými terapeutickými prípravkami je veľmi náročné, zdĺhavé a len zriedka úspešné. Doteraz najúčinnjším spôsobom jej likvidácie je imunizácia novorodených prasiat autochtonnou perorálnou vakcínou, obsahujúcou umrtené baktérie *Escherichia coli*, obsahujúce pilusový antigén K 88, prípadne enterotoxín. Iným spôsobom je imunizácia matiek pred pôrodom parenterálnou cestou celulárnou, alebo subcelulárnou vakcínou, obsahujúcou buď celé umrtené enteropatogénne baktérie *Escherichia coli*, alebo izolovaný pilusový antigén K 88, či kombináciou oboch. Perorálna vakcína má viacero nevýhod. Vyžaduje neustále zaraďovanie nových a nových kmeňov do výroby a denné manuálne podávanie vakcíny ciciakom, ktorých je niekoľko tisíc a tak značne sťažuje prácu vo výkrme. Parenterálne, celulárne, alebo subcelulárne vakcíny imunizujú matku a ciciak po narodení sa s mliečivom dostáva proti látky proti antigénu K 88. Doteraz vyrábané parenterálne

vakcíny boli pripravované veľmi náročnými a drahými spôsobmi, vyžadujúcimi niekoľkostupňové izolácie kyselinou octovou, alebo síranom amónnym a nákladné zariadenia, ako ultracentrifúgy, chromatografické kolony a pod.

Uvedené nedostatky v podstatnej miere odstraňuje spôsob výroby subcelulárnej parenterálnej látky proti neonatálnej kolienteritíde a kolihnačke prasiat podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že sa pilusový antigén K 88 z povrchu tela enteropatogénnych baktérií *Escherichia coli* separuje homogenizáciou a izoluje izoelektrickou autofokusáciou do takej koncentrácie, že vykazuje jasnú precipitačnú líniu pri difúzii v agare voči antiséru anti K 88 až do riedenia 1 : 128.

Výhodou vynálezu sú nízke výrobné náklady, jednoduchá manipulácia pri imunizácii zvierat, ktorá je jednorázová a vyžaduje iba imunizáciu matky. Vlastný spôsob izolácie antigénu je jednoduchý, vylučuje trvalú obsluhu aparatury a potreby akýchkoľvek chemikálií, pretože separácia prebieha jedine v apyrogénnej sterilnej destilovanej vode.

Príklad

Enteropatogénne baktérie *Escherichia coli* K 88⁺, nesúce pilusový antigén K 88 sa po bežnej kultivácii, zaručujúcej produkciu uvedeného antigénu odstredia a bakterín bez supernatantu sa resuspenduje v 4 °C chladnej sterilnej destilovanej vode pomocou homogenizéra 5 až 10 min pri 3 000 1/min a teplote 4 °C. Tak nastane odseparovanie pilusov obsahujúcich antigén K 88. Potom sa homogenát odstredí pri 70 000 m.s⁻² po dobu 20 min a pri teplote 4 °C. Supernatant, ktorého vodivosť sa

upraví na hodnoty do 800 μ S pridaním sterilnej destilovanej vody, alebo ďalším pridaním antigénu K 88, sa aplikuje do horizontálnej izoelektrofokusačnej veľkokapacitnej aparatury s mechanicky stabilizovaným deleným roztokom. Do aparatury sa aplikuje jednosmerný elektrický prúd maximálne 3 VA a roztok fokusuje pri teplote 4 °C kým prúd neklesne pod 3 mA pri napätí 1 000 V. Po fokusácii sa zmeria vo všetkých priehradkách aparatury pH. Pilusový antigén K 88 fokusuje k pH 4,2 až 5,0 automaticky. Z priehradok s pH v tomto rozmedzí sa zhromažďuje fimbriálny pilusový antigén K 88. Jeho pH sa upraví na 7 až 7,5 a koncentrácia sa upraví tak, aby vykazoval pri sledovaní precipitácie v agare jasnú precipitačnú líniu voči antiséru anti K 88 až do riedenia 1 : 128. Po dosiahnutí tejto koncentrácie sa k roztoku antigénu pridá vhodné adjuvans, napr. olejové a podáva sa parenterálne injekčne v dávke 2 až 3 ml podkožne alebo intramuskulárne prasným prasniciam asi 6 týždňov pred pôrodom. Táto dávka a doba postačujú k tomu, aby sa u matiek vytvorili protilátky voči K 88 antigénu a po napití mliečiva sa premiesli do čriev novorodencov. Tieto protilátky zabráňujú enteropatogénnym baktériám *Escherichia coli* K 88⁺ adherovať sa na črevnú stenu a tým spôsobovať kolienteritídu a kolihnačku.

Vynález môže nájsť široké praktické využitie v živočíšnej výrobe vo veľkochovoch ošápaných, kde podstatne prispieva k znižovaniu úhynu novorodencov z titulu kolienteritíd a kolihnačiek.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

231 145

Spôsob výroby subcelulárnej parenterálnej látky proti neonatálnej kolienteritíde a kolihnačke prasiat vyznačujúci sa tým, že sa pilusový antigén K 88 z povrchu tela enteropatogénnych baktérií *Escherichia coli* separuje homogenizáciou a izoluje izoelektrickou autofokusáciou do takej koncentrácie, že vykazuje jasnú precipitačnú líniu pri difúzii v agare voči antiséru anti K 88 až do riedenia 1 : 128.