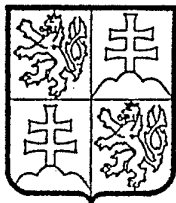


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 276 181

(21) Číslo přihlášky : 2167-90.0

(22) Přihlášeno : 02 05 90

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B 6

(51) Int. Cl.⁵ :

A 61 K 39/108

(40) Zveřejněno : 15 04 92

(47) Uděleno : 21 02 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 15 04 92

(73) Majitel patentu : ÚSTAV FYZIOLOGIE HOSPODÁRSKÝCH ZVIERAT SAV,
KOŠICE

(72) Původce vynálezu : SOVA OTO MUDr.CSc., KOŠICE

(54) Název vynálezu : Spůsob izolácie povrchového antigénu
987-p baktérií Escherichia coli

(57) Anotace :

Riešenie sa týka spôsobu izolácie povrchového pilusového antigénu 987-P z povrchu tela baktérií Escherichia coli, ktorý je vhodný ako imunizačný ochranný prostriedok v prevencii proti kolihnačkám a koliinfekciám novorodených prasiat a teliat. Baktérie E.coli, nesúce na svojom povrchu pilusový antigén 987-P, sa odstredia, resuspendujú a z povrchu baktérií sa odstránia pilusy s antigénom 987-P. Roztok s antigénom 987-P sa aplikuje do autofokusačného prístroja a antigén sa odfokusuje. Frakcie sa zhromaždia a ich koncentrácia sa upraví tak, aby v riedení 1 : 128 vykazovali jasnú precipitačnú líniu pri difúzii v agare voči antiséru.

Vynález sa týka spôsobu izolácie povrchového antigénu 987-P (pilusového) baktérií *Escherichia coli*, ktorý slúži buď samostatne k imunizácii prasných prasníc alebo teľných kráv alebo ako doplnok k iným vakcínám proti črevným zápalom a hnačkám.

Kolienteritídy a kolihnačky novorodených teliat a prasiat spôsobujú enteropatogénne baktérie *Escherichia coli*, ktoré sa adherujú na črevnú stenu postihnutých zvierat a potom vylučovaním enterotoxínov spôsobujú črevný zápal a hnačky, v dôsledku ktorých novorodenci často hynú. Zdolanie tohoto črevného zápalu je vážnym problémom. Najúspešnejšou je imunizácia zvierat antigénom adherencie, ktorý zabraňuje baktériám priľnúť ku črevnej stene a tým aplikovať v potrebnom množstve svoje toxíny a tak spôsobovať onemocnenie. Doteraz najúčinnejšou bola imunizácia matiek pred pôrodom parenterálnou cestou, celulárnou alebo subcelulárnou vakcínou obsahujúcou buď celé, šetrne usmrtené enteropatogénne baktérie nesúce na svojom povrchu príslušný antigén, alebo izolovaný pilusový antigén či kombináciu oboch.

V poslednom čase sa stáva aktuálnou otázka výroby vakcíny z povrchového antigénu 987-P. Doteraz známe postupy izolácie tohoto povrchového pilusového antigénu *E.coli* majú komplikovaný postup a veľkú prácnosť. Pri izolácii sa používa až deväť operácií, z ktorých možno spomenúť centrifugáciu, ultracentrifugáciu, ionexovú chromatografiu, zrážanie, ultrafiltráciu, gélovú chromatografiu (Nagy, L.K., Mc Kenzie, I., Painter, K.R.: Veterinary record (1985), 117, 408-413), pričom výťažok je relatívne nízky.

Uvedené nedostatky v podstatnej miere odstraňuje spôsob izolácie povrchového pilusového antigénu 987-P z baktérií *Escherichia coli* podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že sa pilusový antigén 987-P z povrchu tela enteropatogénnych baktérií *E.coli* separuje homogenizáciou a izoluje autofokusáciou do takej koncentrácie, že vykazuje jasnú precipitačnú líniu pri difúzii v agare voči antiseru anti 987-P až do riedenia 1 : 128.

Výhodou izolácie povrchového pilusového antigénu podľa vynálezu sú nízke výrobné náklady, jednoduchá manipulácia pri imunizácii zvierat, jednoduchosť vlastného spôsobu izolácie antigénu, ktorý vylučuje trvalú obsluhu aparatury a potrebu akýchkoľvek chemikálií, pretože separácia prebieha len v apyrogénnej destilovanej vode.

Uvedený príklad ilustruje, ale neobmedzuje predmet vynálezu.

Príklad 1

Enteropatogénne baktérie *Escherichia coli* 987-P, nesúce na svojom povrchu pilusový antigén 987-P, sa po bežnej kultivácii, zaručujúcej produkciu uvedeného antigénu, odstredia a bakterín bez supernatantu sa resuspenduje v sterilne destilovanej vode chladenej na 4 °C pomocou homogenizéra počas 5 až 10 minút pri 3 000 l/min a teplote do 4 °C. Tým nastane odseparovanie pilusov obsahujúcich bielkovinovú zložku antigénu 987-P. Homogenát sa potom odstredí pri 70 000 m.s⁻² po dobu 20 minút pri teplote do 4 °C. Supernatant, ktorého vodivosť sa upraví na hodnoty do 800 μ S.cm⁻¹ pridaním destilovanej vody, sa aplikuje do autofokusačnej aparatury a po jej uzatvorení sa aplikuje jednosmerný elektrický prúd maximálne 3V a roztok sa fokusuje pri teplote do 4 °C, kým prúd neklesne na jednu desatinu svojej pôvodnej hodnoty pri maximálnom napätí 1 000 V. Po fokusácii sa zmeria vo všetkých pracovných komôrkach aparatury pH a obsah antigénu 987-P ntisérom. Pilusový antigén 987-P fokusuje automaticky k pH 4,2 až 4,8. Z priehradiek s pH v tomto rozmedzí sa zhromažďuje pilusový antigén 987-P. Jeho pH sa upraví na hodnotu 7 a koncentrácia sa upraví tak, že vykazuje pri sledovaní precipitácie v agare jasnú precipitačnú líniu voči antiseru anti 987-P až do riedenia 1 : 128.

Po dosiahnutí tejto koncentrácie sa do roztoku pridá olejové adjuvans a podáva sa parenterálne prasným prasniciam asi 6 týždňov pred pôrodom. Táto doba postačuje k tomu, aby uvedená dávka vytvorila u matiek protilátky voči 987-P antigénu a po napití mlieka sa tieto prenesú do čriev novorodencov. Tieto protilátky potom zabraňujú enteropatogénnym baktériám *E.coli* 987-P adherovať sa na črevnú stenu a tak spôsobovať kolienteritídy a kolihnačku.

Príklad 2

Postup rovnaký ako v príklade 1, vodivosť supernatantu sa upravila dialýzou a pH zhromaždeného pilusového antigénu 987-P sa upravilo na 7,2.

Príklad 3

Postup rovnaký ako v príklade 1, vodivosť supernatantu sa upravila ultrafiltráciou a pH zhromaždeného pilusového antigénu 987-P sa upravilo na 7,4.

Príklad 4

Postup rovnaký ako v príklade 1, vodivosť supernatantu sa upravila ďalším pridaním antigénu 987-P a pH zhromaždeného pilusového antigénu 987-P sa upravilo na 7,5.

Vynález môže nájsť široké praktické využitie v živočíšnej výrobe vo veľkochove ošipáných, kde podstatne môže prispieť k znižovaniu úhynu novorodencov z titulu kolienteritíd a kolihnačiek.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Spôsob izolácie povrchového pilusového antigénu 987-P bielkovinovej povahy z povrchu tela enteropatogénnych baktérií *Escherichia coli*, vyznačujúci sa tým, že pilusový antigén 987-P sa z povrchu tela baktérií separuje homogenizáciou a izoluje autofokusáciou v automaticky sa vytvárajúcom gradiente pH k hodnotám pH 4,2 až 4,8 do koncentrácie, v ktorej vykazuje jasnú precipitačnú líniu pri difúzii v agare voči antiséru anti987-P až do riedenia 1 : 128.