



URZĄD
PATENTOWY
PRL

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

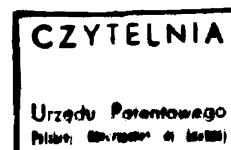
Int. Cl.⁴ A61K 39/012

Zgłoszono: 84 08 03 (P. 249061)

Pierwszeństwo: 83 08 04 Wielka Brytania

Zgłoszenie ogłoszono: 85 04 24

Opis patentowy opublikowano: 89 08 31



Twórca wynalazku _____

Uprawniony z patentu: UNILEVER NV,
Rotterdam (Holandia)

Sposób wytwarzania doustnej kompozycji immunogennej dla zwierząt

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania doustnej kompozycji immunogennej dla zwierząt, takich jak drób.

Bardziej szczegółowo wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania kompozycji immunogennej do podawania doustnego, które zawierają żywe pierwotniaki, takie jak ziarniaki (Coccidia), pasożytujące w układzie żołądkowo-jelitowym, lub poprzez ten układ. Pierwotniaki te przy swoim przemieszczeniu się znajdują się w stadium cysty, to jest w stadium życia nieczynnego w otoczenie zewnętrznej, chroniącej pasożyta przed niekorzystnymi warunkami na zewnątrz ciała gospodarza. Pasożyt opuszcza cystę gdy zostanie połknięty przez nowego gospodarza.

Ogólnie uważa się, że skuteczne uodpornienie drogą doustną przeciw pasożytniczym pierwotniakom można osiągnąć tylko wtedy, gdy szczepionka zawiera pierwotniaki żywe. Odporność gospodarza ustala się przy kontrolowanym zakażeniu pasożytem. Doustne podanie zabitych pierwotniaków pasożytniczych nie prowadzi do skutecznej odporności. Natomiast żywe organizmy mogą być osłabiane, to znaczy może zostać zmodyfikowana charakterystyka naturalnej złośliwości, w celu ich przystosowania do podawania jako szczepionki wywołującej odpowiedni poziom zakażenia w organizmie gospodarza.

Pomimo stanu incystacji, niezbędność utrzymania żywotności pierwotniaków w szczepionce nasuwa problemy nie spotykane zwykle w przypadku tradycyjnych szczepionek zawierających organizmy mniej skomplikowane, takie jak bakterie lub wirusy. Pierwotniaków nie można liofilizować, np. w celu przechowywania. Tym niemniej, zamknięte w cystach pierwotniaki są ogólnie podatne na odwodnienie.

Naturalna ekscystacja pierwotniaków po połknięciu następuje na zasadzie mechanizmu trawiennego w jelicie określonego gospodarza. Dla wywołania zakażenia cysta musi być zniszczona, a zamknięty w niej organizm uwolniony do światła jelita w regionie, w którym organizm może zadowalająco się rozwijać. Jakikolwiek opóźnienie naturalnej oksycystacji doprowadza do tego, że pierwotniaki zostają przeprowadzone przez jelito gospodarza na zasadzie normalnych funkcji trawiennych i wydalone przez niego zanim staną się zdolne do wywołania ustabilizowanego zakażenia.

Z drugiej strony, konieczność skutecznej ochrony zamkniętych w cystach pasożytów zanim zostaną wprowadzone do organizmu gospodarza, wydaje się nie do pogodzenia z zabezpieczeniem procesu ekscystacji po połknięciu przez gospodarza by nie był on upośledzony w znacznym stopniu. Można by zatem oczekiwać, że każda trwała, wytrzymała ochrona spełniająca to pierwsze wymaganie, uczyniłaby szczepionkę nieskuteczną przez opóźnienie ekscystacji.

Wiadomo, że drób, który przeżył zakażenie ziarniakami, zachowuje pewien stopień odporności na dalsze zakażenie. W opisie patentowym Wielkiej Brytanii nr 2008404 podano sposób skutecznego uodpornienia drobiu przeciw kokcydiozie polegający na dodawaniu do karmy dla drobiu, w sposób ciągły lub co najmniej często, niewielkich ilości żywotnych oocyst z utworzonymi zarodnikami jendnego, lub więcej niż jednego, gatunku ziarniaków zakaźnych dla tego gatunku drobiu. W opisie tym przedstawiono sposób polepszania wzrostu drobiu, polegający na prowadzeniu hodowli drobiu na diecie zawierającej materiały odżywcze z dodanymi żywotnymi oocystami, co najmniej jednego gatunku ziarniaków, zawierającymi wytworzone zarodniki pasożyta, na którego drób jest podatny, przy czym oocysty występują w stężeniu wystarczającym do wywołania tylko subklinicznego zakażenia drobiu.

Ważnym zastosowaniem tego wcześniejszego wynalazku jest handlowa karma dla drobiu zawierająca materiał odżywczy i od około 10 do około 10.000 żywotnych oocyst, z wytworzonymi zarodnikami, na kg karmy, przy czym chodzi tu o co najmniej jeden gatunek ziarniaków, na które drób jest podatny.

Dostarczenie drobiowi oocyst w regularnie otrzymywanej karmie umożliwia prowadzenie kontrolowanej postępującej samo-inokulacji. Dienne pobieranie oocyst określane jest ilością karmy spożywanej przez każdego ptaka, a poziom oocyst w karmie może być regulowany przez wytwórcę karmy, któremu nowoczesne udogodnienia kontroli jakości pozwolą zapewnić uniknięcie powstania ryzyka przedawkowania. Oprócz tego, zapewniając obecność oocyst w normalnej karmie, umożliwia się kurczętom pobieranie oocyst na odpowiednim poziomie, jak tylko zaczynają one spożywać karmę stałą, dzięki czemu zaczynają one uodparniać się w bardzo wczesnym okresie ich życia po wylędu.

W opisie patentowym Wielkiej Brytanii nr 2008404 wspomniano, że oocysty mogą ulec poważnemu uszkodzeniu pod wpływem odwodnienia i z tego powodu karma zawierająca je nigdy nie może być wysuszona w stopniu całkowitym. Korzystnie poziom wilgotności w karmie powinno znajdować się w zakresie od około 6 do około 12% wag, aczkolwiek możliwe jest przyjęcie wyższego poziomu wilgotności, nie doprowadzającego do narażenia karmy na spleśnienie itd. w trakcie przechowywania. Ta sama uwaga powinna ogólnie stosować się do podmieszek zawierających oocysty, u których można wytwarzać karmę dla drobiu.

Żywotne oocysty z wytworzonymi zarodnikami można otrzymać za pomocą rozmyślnego zakażenia zwierząt-gospodarzy, takich jak stado ptaków-dawców i zebranie oocyst z ich odchodów. Technika otrzymywania żywotnych oocyst ziarniaków z wytworzonymi zarodnikami jest znana z opisu patentowego Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3147186.

W opisie tym przedstawiono również sposób doustnego immunizowania drobiu przez podawanie oocyst w wodzie pitnej dla ptaków lub w karmie.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu wytwarzania kompozycji zabezpieczającej szczepionki, która pomaga w utrzymywaniu zasadniczej żywotności organizmów immunogennych bez znaczeniejszego uszkodzenia naturalnego mechanizmu, na zasadzie którego zakażają one gospodarza po połknięciu.

Sposób wytwarzania doustnej kompozycji immunogennej dla zwierząt takich jak drób, dla ich uodpornienia na infekcje wywołane przez pasożytnicze pierwotniaki, takie jak ziarniaki, według wynalazku polega na tym, że wytwarza się zawiesinę żywych zamkniętych w cystach pierwotniaków w wodnym roztworze materiału węglowodanowego tworzącego żel takiego jak alginiany o stężeniu 0,25–11% wagowych, przy czym stosuje się co najmniej 1000 cyst na kg oraz ewentualnie dodatek wypełniaczy w ilości 0,25–10% wagowych zawiesiny, a następnie w celu żelowania zawiesinę wkrapla się do roztworu chlorku wapnia o stężeniu około 5% wagowych w czasie około 15 minut i ewentualnie osusza.

Najpierw wytwarza się zawiesinę żywych zamkniętych w cystach pierwotniaków w wodnym roztworze alginianu sodowego, po czym wkrapla się wytworzoną zawiesinę do roztworu zawierającego chlorek wapnia, korzystnie w ilości około 5% wagowych ilości alginianu, utrzymując integralność roztworu podczas wkraplania.

Podłoże żelowe powinno być wystarczająco sztywne, aby wytrzymać manipulowanie. Zbyt miękkie lub gąbczaste żele nie będą dostatecznie silne, by chronić zamknięte w cystach pierwotniaki przed uszkodzeniem fizycznym. Podłoże żelowe, po inkorporacji materiału immunigennego, można wysuszyć. Zaskakującą cechą znaną wynalazku jest to, że stosowane podłoże w postaci wysuszonej może funkcjonować jako skuteczny układ uwalniający szczepionkę. Alternatywnie, podłoże żelowe można utrzymywać w stanie wilgotnym aż do doustnego przyjęcia przez gospodarza osadzonych w nim pierwotniaków, albo włączenie go do karmy. W stanie wilgotnym, osadzonymi pierwotniakami można manipulować jako zawiesiną cząstek żelu np. w podłożu wodnym. Najkorzystniej stosuje się żel na podstawie alginianów. Można stosować mieszaniny podstaw żelowych.

Zastosowanie żelu polisacharydowego prowadzi przy odwodnieniu do względnie twardych podłoży. Ta twardość może być w pewnych okolicznościach korzystna dzięki wzmagananiu fizycznej ochrony pierwotniaków. Tym niemniej, twardość ta może okazać się niekorzystna wskutek zmniejszenia łatwości trawienia podłoża żelowego, a przez to zahamowanie uwalniania pierwotniaków po połknięciu. Jeżeli jest to pożądane, podłożem żelowym można nadać miękkość przez dodanie środka utrzymującego wilgoć albo plastyfikatora. W tym kontekście idealnym materiałem jest gliceryna i parafina ciekła. Korzystnie materiały takie stosuje się w ilości poniżej 75% wagowych w odniesieniu do materiału żelowego (wartość wyrażona w stosunku do suchej wagi).

Właściwości fizyczne podłoża żelowego można zmodyfikować za pomocą włączenia jednego, lub więcej niż jednego, wypełniacza. Materiały tego rodzaju mogą także przyczynić się do obniżenia kosztów surowcowych kompozycji, gdyż na ogół są one tańsze od alginianów. Wypełniacze powinny mieć drobne cząsteczki by nie wpływać w znacznie większym stopniu na płynięcie podstawy żelowej przed zestaleniem. Korzystnie wypełniacz nie powinien być źródłem jonów metalicznych, które mogłyby spowodować przedwczesne zestalenie się żelu. Problem ten można obejść przez dodanie odczynnika maskującego. Wypełniacze takie jak kreda, sproszkowane mleko odtłuszczone i sproszkowana serwatka, zawierają wapń i będą wykazywać tendencję do zestalenia alginianu. Korzystnymi wypełniaczami są: mąki, skrobie, maltodekstryny, dekstryny i miazga ziemniaczana. Bardzo odpowiednie są także wypełniacze nieorganiczne, takie jak glinika biała. Można również zastosować suszony nawóz ptasi, odpowiednio zmielony i wyjałowiony.

W uzupełnieniu do zamkniętych w cystach pierwotniaków, do podstawy żelowej można włączyć różne inne składniki przeznaczone do modyfikowania zachowania się samej podstawy żelowej, albo do uczynienia kompozycji bardziej odpowiednią do podawania doustnego, np. jako składnika karmy zwierząt. Uwolnienie osadzonych pierwotniaków podczas trawienia można ułatwić przez zastosowanie mieszanego układu żelowego lub włączenie w skład kompozycji żelowej emulgatorów lub substancji powierzchniowo czynnych. Dla uczynienia kompozycji, jako składnika pożywienia, bardziej odpowiednią, może okazać się korzystne dokonanie zmiany właściwości organoleptycznych, za pomocą włączenia materiałów takich jak aromaty i barwiniki. Jeżeli jest to pożądane, można także użyć podłoża zawierającego pierwotniaki jako nośnika innych składników stosowanych w mniejszej ilości, takich jak promotory wzrostu i pigmenty karotenoidowe.

W jednym z zastosowań wynalazku, podłoże żelowe może zawierać żywe pierwotniaki pasożytnicze i czynnik chemoterapeutyczny skuteczny w działaniu przeciw pierwotniakom w pośrednim stadium ich cyklu życiowego, w ilości wystarczającej do zapobieżenia pełnemu rozwojowi pierwotniaków w organizmie gospodarza po połknięciu. Pierwotniaki pasożytnicze są więc zdolne do usadowienia się na krótko w organizmie gospodarza po połknięciu, co prowadzi do odpowiedzi immunologicznej gospodarza, ale czynnik chemoterapeutyczny zapobiega ich pełnemu cyklowi rozwojowemu prowadzącemu do wydalenia do otoczenia zakaźnych pierwotniaków. I tak np., jeżeli pierwotniakami są ziarniaki, w tym zastosowaniu idealnie nadaje się lek przeciw ziarniakom, co do którego uważa się, że szczyt jego działania następuje w późnym stadium cyklu życiowego ziarniaków, korzystnie w późnym stadium schizogonii. Przykładowymi odpowiednimi lekami

przeciw ziarniakom są: nicarbazin, furazolidone, nitrofurazone, nihydrazone, sulphaquinaxalene, sulpanitran, dinsed, ormetoprim, sulphadimethoxine i ethopabate. Podawanie szczepionki zawierającej czynnik chemoterapeutyczny zapobiega przeniesieniu się pasożytów na innych gospodarzy, nie pozwalając na rozwinięcie się szczepów opornych na leki. Obecność czynnika chemoterapeutycznego zapewnia dalsze zabezpieczenie przed możliwością doprowadzenia, w rezultacie podania zakaźnych pierwotniaków, w niezwykłych okolicznościach, do klinicznego zakażenia gospodarza. W kombinacji z czynnikiem chemoterapeutycznym można użyć, jeżeli jest to pożądane, pierwotniaków w pełni wirulentnych i/lub pierwotniaków atenuowanych.

Szczepionkę można podać w rozmaity sposób, a mianowicie przez:

a) Włączenie do karmy gospodarza lub zmieszanie z materiałami odżywczymi podczas sporządzania karmy. Można użyć przedmieszki zawierającej podłoże żelowe, w postaci cząstek, tak, aby ułatwić rozprowadzenie cząstek żelowych zawierających pierwotniaki w całości karmy.

b) Zwyczajne dodanie do karmy w tym samym czasie, gdy podaje się ją gospodarzowi, np. posypanie cząstkami żelowej karmy drobiu.

c) Indywidualne podanie zwierzętom-gospodarzom, takim jak nowowylęgłe kurczęta, gdy chodzi o drób.

Szczepionkę według wynalazku można oprzeć na pojedynczym szczepie lub gatunku pierwotniaków, jednakże korzystniejszym celem powinno być rozszerzenie odporności swoistej przez włączenie wyboru pospolitych szczepów lub gatunków pierwotniaków, w pojedynczym preparacie szczepionkowym. Zastosowanymi pierwotniakami mogą być w pełni wirulentne szczepy „dzikie“, szczepy atenuowane (np. szczepy zaadaptowane do embrionów lub szczepy przedwcześnie rozwijające się), szczepy wyprowadzone przez krzyżowanie (obecnie dostępne dla niektórych ziarniaków, takich jak *Eimeria maxima*), lub szczepy zmodyfikowane, np. za pomocą manipulacji genetycznych. Jeżeli jest to pożądane, pojedynczy preparat szczepionki może zawierać kombinację tych różnych typów szczepów.

Wynalazek będzie dalej opisany w odniesieniu do zwalczania kokcydiozy, lecz dla znawcy będzie rzeczą łatwo zrozumiałą, że sposobem według wynalazku można wytwarzać kompozycje wywołujące odporność przeciw innym pasożytniczym pierwotniakom tworzącym cysty.

Szczepionek wytworzonych sposobem według wynalazku można użyć do zwalczania kokcydiozy u gospodarzy jakiegokolwiek gatunku wykazującego skłonność do tej choroby. Aczkolwiek długo kojarzona z gatunkami ptasimi, w szczególności drobiem, kokcydioza jest obecnie rozpoznawana jako ważna dla szerszego zakresu gatunków. Intensywne metody hodowli powodują wielokrotnienie ilości przypadków choroby i ciężkości jej przebiegu. Przykładowymi nieptasimi gospodarzami zwierzęcymi, u których rozpoznaje się obecnie kokcydiozę są świny, przeżuwacze (a zwłaszcza bydło, owce i kozy) oraz króliki. Aczkolwiek choroba ta zazwyczaj nie jest ważnym czynnikiem jeśli chodzi o zdrowie zwierząt dorosłych, może ona spowodować wiele szkód u zwierząt nowonarodzonych w otoczeniu znacznie zanieczyszczonym przez matkę.

Kokcydiozę badano ekstensywnie u drobiu, zwracając na nią względnie mniejszą uwagę w przypadku innych gatunków. Toteż nie są dostępne szczegółowe dane porównawcze jeśli chodzi o ziarniki zakażające np. świny, aczkolwiek w piśmiennictwie zidentyfikowano kilka gatunków ziarniaków. Np. u świń zaobserwowano następujące ziarniki: *Eimeria deblickei*, *E. scabra*, *E. suis*, *E. spinosa*, *E. perminuta*, *E. neodeblickei*, *E. porci*, *E. cerdonis*, *E. polita* i *Isospora suis*. Specyficznymi, zidentyfikowanymi ziarniakami bydłocymi są: *Eimeria bovis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis*, *E. auburnensis*, *E. cylindrica*, *E. alabamensis* i *E. bukidnonensis*. Owce zakażane są przez: *Eimeria minakohlyakimovae*, *E. ovina*, *E. intricate* i *E. ahsate*, a kozy przez: *E. arloingi*. U królików zarejestrowano występowanie następujących ziarniaków: *Eimeria intestinalis*, *E. flavesenes*, *E. magna*, *E. irresidua*, *E. periformis*, *E. stiedai*, *E. perforans*, *E. neoleporis* i *E. media*.

Tym niemniej jednak, wynalazek będzie szczegółowo opisany w odniesieniu do drobiu. W niniejszym opisie terminu „drób“ używa się w odniesieniu do ptaków rzędu Galliformes, takich jak zwykle ptactwo domowe lub kurczęta (*Gallus domesticus*), indyki (*Meleagris*), bażanty (*Phasianus*), kuropatwy (*perdix*), pardwy (*Lagopus*), perlice (*Numida*) i pawie (*Pavo*), a także ptaków rzędu Anseriformes, takich jak kaczki (*Anas*) i gęsi (*Anser*).

Ptactwo domowe (*Gallus domesticus*) może zarazić się jakimkolwiek z ziarniaków takich jak *Eimeria tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. acervulina* i *E. praecox*. Następujące

ziarniaki kojarzy się z zakażeniami u indyków (*Meleagris*): *Eimeria melagrimitis*, *E. dispersa*, *E. meleagridis*, *E. gallopavonis*, *E. adenoides*, *E. innocua* i *E. subrotunda*. Kaczki domowe (*Anas*) cierpią na zakażenie spowodowane *Tyzzeria pernicioso*, a również, jak się uważa, przez *Eimeria anatis*, które mogą być nabyte od kaczek dzikich (*Anas platyrhynchos*). Gęsi (*Anser*) mogą cierpieć z powodu zakażeń spowodowanych przez *Eimeria anseris*, *E. nocens* i *E. parvula*, a w dodatku uważa się, że gęś domowa może zarazić się *Eimeria hermani*, *E. striata* i *E. fulva* od gęsi kanadyjskiej. Drób innych gatunków, przytoczonych powyżej, cierpi na zakażenia spowodowane przez charakterystyczne ziarniaki i dlatego kompozycje wytwarzane sposobem według wynalazku są szczególnie odpowiednie i skuteczne w zwalczaniu zakażeń spowodowanych ziarniakami charakterystyczny dla tych innych gatunków drobiu. Należy rozumieć, że wszystkie poziomy oocyst wspomniane w niniejszym opisie odnoszą się występujących gatunków ziarniaków.

Zakażenia ziarniakami występują u wszystkich gatunków drobiu hodowanych przez człowieka. Zakażenia te są szczególnie kłopotliwe, gdy występują w dużym stadzie ptaków hodowanych w warunkach nowoczesnego intensywnego rolnictwa. Zakażenia mogą rozprzestrzeniać się w stadzie szybko i spowodować co najmniej spowolnienie wzrostu. Ciężkie zakażenia mogą prowadzić do śmierci ptaków. Tak więc od wielu lat czyniono znaczne wysiłki starając się znaleźć niezawodne środki profilaktyczne przeciw tym zakażeniom, a w szczególności znaleźć drogi skutecznego uodpornienia ptaków przeciw tym zakażeniom. Praktyczną korzyścią odnoszoną z każdej skutecznej metody uodpornienia będzie sprzyjanie wzrostowi drobiu, który nabył odporność, co najmniej w tym sensie, że będzie się przeciwdziałać negatywnemu wpływowi na wzrost powodowanemu przez zakażenie ziarniakami.

Ilość oocyst z wytworzonymi zarodnikami włączonych do kompozycji według wynalazku będzie należeć do ilości wymaganej na jednostkę wagi końcowej karmy. Typowo, kompozycja według wynalazku powinna zawierać co najmniej 1000 do 1 miliona oocyst z wytworzonymi zarodnikami/kg. Korzystnie ten minimalny poziom powinien wynosić około 5000/kg, a najlepiej co najmniej 10000/kg. Typowa kompozycja do ogólnego zastosowania może zawierać od około 50000 do około 500000 oocyst z wytworzonymi zarodnikami/kg. Poziom maksymalny nie daje się łatwo zdefiniować. Kompozycja zawierająca w nadmiarze 1000000 oocyst z wytworzonymi zarodnikami/kg może być użyteczna, jeżeli jest niezbędny wysoki poziom oocyst w karmie.

Jeśli chodzi o poziom oocyst w karmie końcowej, korzystnie karma zawierać powinna nie więcej niż około 2500 żywotnych oocyst z wytworzonymi zarodnikami/kg. Aczkolwiek z wprowadzenia oocyst z wytworzonymi zarodnikami do karmy podawanej indywidualnemu ptakowi w każdym stadium jego życia, zostanie odniesiona korzyść, korzystne jest dostarczanie karmy zawierającej oocysty z wytworzonymi zarodnikami na niskim poziomie, jak tylko zaczyna on być karmiony po wylęgu. Gdy ptak rośnie, jego wymagania co do dziennej karmy znacznie wzrastają. Biorąc na przykład ptactwo domowe (*Gallus domesticus*), w stadium „pierwszego karmienia“ kurczę zjada co najmniej 2 g karmy /dzień. Po upływie 10 dni ilość ta wzrasta do co najmniej 10 g/dzień, a po upływie 30 dni ptak będzie zjadać około 80 g, lub więcej/dzień. Zapotrzebowanie ptaka na pożywienie zmienia się wraz z jego rozwojem, a handlowo dostępne karmy dla drobiu są sprzedawane jako pewien asortyment preparatów przeznaczonych dla ptaków w różnych stadiach ich rozwoju. Zasadniczo w asortymencie tym znajdują się karmy specjalne formułowane dla ptaków znajdujących się na poziomie „Początkujących“, „Rosnących“ i „Hodowlanych“. W celu zapewnienia przyjmowania przez ptaka, w każdym stadium jego rozwoju, odpowiedniej ilości oocyst ziarniaków z wytworzonymi zarodnikami/dzień, może okazać się odpowiednie, że różne karmy zawierać będą rozmaite ilości oocyst/kg.

Uważamy, że dla optymalnego uodpornienia nowowyklute kurczę powinno przyjmować 1–20 żywotnych oocyst z wytworzonymi zarodnikami/dzień. Podczas pierwszych 10 dni wzrostu poziom ten powinien podnieść się do około 2–50 oocyst/dzień. Trzydziestego dnia poziom przyjmowanych oocyst powinien wynosić około 5–200/dzień.

Korzystnie karma dla „Początkujących“ będzie zawierać co najmniej 50 żywotnych oocyst z wytworzonymi zarodnikami/kg. Korzystnie maksymalny poziom oocyst będzie wynosić około 5000 kg, a najlepszy nie więcej niż 2000/kg. W karmie dla „Rosnących“ minimalny poziom żywotnych oocyst z wytworzonymi zarodnikami wynosi korzystnie około 50/kg. Górny poziom oocyst wynosi korzystnie około 2000/kg, a najlepszy nie więcej niż około 500/kg. W karmie dla

„Hodowlanych“ odpowiedni poziom minimalny żywotnych oocyst z wytworzonymi zarodnikami wynosi około 10/kg. Korzystnie górny poziom ilości oocyst nie przekracza około 1000/kg, a najlepszy wynosi nie więcej niż 100/kg.

Dla gospodarzy z gatunków innych niż drób, codzienne pobieranie oocyst może wymagać zróżnicowania w zależności od czynników takich jak względna wirulencja organizmu oraz wielkość i podatność zwierzęcia. Np. u odstawanego cielęcia codzienne pobieranie 1–100 żywotnych oocyst z wytworzonymi zarodnikami prawdopodobnie jest wystarczająca.

Pewne pierwotniaki pasożytnicze wytwarzają w swoim stadium przemieszczania się „cysty wewnętrzne”. Np. ziarniaki istnieją jako sporocysty w cyście zewnętrznej (oocysta). Aczkolwiek dla celów praktycznych dogodniej jest użyć pełnej oocysty jako składnika szczepionki, możliwe będzie osadzenie w sztywnym podłożu żelowym uwolnionych sporocyst.

Kompozycji wytworzonej sposobem według wynalazku można użyć także w celu włączenia do karmy innych zasadniczych składników śladowych, np. dodatków mineralnych, które są szczególnie ważne sprzyjając tworzeniu skorupy jaja u niosek, witamin i aminokwasów, takich jak lizyna, pigmentów karotenoidowych używanych zwykle w celu wpłynięcia na barwę żółtek jaj. Jeżeli jest to pożądane, składniki te używane w mniejszej ilości można włączyć z oocystami w jednej złożonej kompozycji.

Kompozycję wytworzoną sposobem według wynalazku można włączyć do karmy za pomocą zwykłego domieszania, przy czym ilość kompozycji na jednostkę wagi karmy wybiera się biorąc pod uwagę stężenie oocyst obecnych w kompozycji i stężenie oocyst pożądane w karmie. Oprócz włączenia do karmy kompozycji zawierającej żywotne oocysty z wytworzonymi zarodnikami, nie jest dla kompozycji, albo dla fizycznej formy karmy istotne dokonanie jej zmiany przy wprowadzaniu wynalazku do użytku. Można użyć któregośkolwiek z istniejących standardowych „pełnych” albo „odżywczo zrównoważonych” handlowo dostępnych preparatów karmy. Materiał odżywczy w karmie może więc zawierać jakiegokolwiek składniki białkowe, węglowodanowe lub tłuszczowe normalnie znajdujące w tego rodzaju karmach. Charakter tych standardowych składników, takich jak różne mączki rybne, mielone zboże i inne materiały roślinne oraz dodatki mineralne, a także wymagania odżywcze, takie jak minimalny poziom witamin, aminokwasów i pierwiastków śladowych są dobrze znane w tej dziedzinie wiedzy i udokumentowane w piśmiennictwie technicznym. Szczegóły te nie wchodzi w zakres niniejszego wynalazku.

W przypadku przyjęcia za przykład żelu na podstawie alginianów jako układu zestalającego na drodze chemicznej, produkt wytwarzany sposobem według wynalazku można otrzymać za pomocą zanurzenia oocyst ziarników w wodnym roztworze alginianu i doprowadzenia do utworzenia przez alginian żelu na drodze odpowiedniej reakcji inicjowanej chemicznie. Żelowania można dokonać za pomocą „zestalania w całości”, kiedy to tworzy się blok żelu wymagający następnie podzielenia go na mniejsze cząstki gotowe do użycia. Podziału takiego można dokonać za pomocą siekania, krajania, sztakowania itp. Tym niemniej jednak, korzystnie żelowanie przeprowadza się podczas wytwarzania produktu w postaci względnie drobnych cząstek, w wyniku czego dalsze rozdrabnianie staje się niekonieczne. I tak np. zestalony żel można wyłaczać przez wąską dyszę z utworzeniem struktury podobnej do makaronu o względnie małym przekroju poprzecznym. Zawieszinę można wyłaczać do podłoża zestalającego.

Korzystne wykonanie sposobu polega na kontaktowaniu kropelek wodnego roztworu alginianu z podłożem zestalującym. Kropelki można wytworzyć przez natryskiwanie, albo, korzystniej, przez pozwolenie roztworowi na wpływanie z jednej, lub więcej niż jednej, dyszy. Najkorzystniejszym sposobem jest tworzenie kuleczek żelu za pomocą dopuszczenia do spadania do podłoża zestalającego, takiego jak kąpiel zawierająca czynnik zestalujący, kropelek roztworu alginianu zawierającego oocysty. W tych warunkach kropelki żelują bardzo szybko i pozostają oddzielnymi kuleczkami. Po zestaleniu można z podłoża zestalającego odzyskać kuleczki alginianu. Jeżeli jest to niezbędne, całość kuleczek można podzielić pod względem wielkości na frakcje, z wykorzystaniem zwykłych metod, takich jak przesiewanie.

Typowa wielkość kuleczek alginianu zawierających oocysty odpowiada w stanie wilgotnym średnicy około 5 mm, co oznacza średnicę około 1–3 mm w przypadku kuleczek odwodnionych. Ostateczne rozmiary odwodnionych kuleczek zależą od zawartości w nich ciał stałych, gdy znajdują się one jeszcze w stanie wilgotnym.

Ilość alginianu w roztworze wodnym powinna być taka co najmniej, aby utrzymać integrację roztworu, gdy jest on kontaktowany z czynnikiem zestalającym. I tak np., gdy krople roztworu spadają do czynnika zestalającego, powinny one żelować natychmiast z utworzeniem sztywnego żelu, pozostając przez to oddzielnymi, mocnymi kuleczkami. Korzystne są alginiany o względnie wysokiej masie cząsteczkowej, gdyż umożliwia to uzyskanie sztywnego żelu przy niskim stężeniu, gdy do produktu zostanie włączona znaczna ilość wypełniaczy lub innych składników. Ogólnie, ilość alginianu w podłożu żelowym w stanie wilgotnym powinna wynosić 0,25–10% wagowych.

Można zastosować dostępne handlowo alginiany w szerokim zakresie, aczkolwiek korzystne są alginiany o wysokim stosunku reszt kwasu mannurowego do reszt kwasu glukuronowego. Z powodu zamierzonego stosowania szczepionki wytworzonej sposobem według wynalazku do doustnego uodpornienia zwierząt, nie jest niezbędne użycie alginianów o czystości farmaceutycznej lub o czystości odpowiadającej normom żywieniowym dla ludzi, aczkolwiek można użyć takich surowców, jeżeli jest to uzasadnione ze względów ekonomicznych. Najważniejszym wymaganiem jest, aby poziom substancji nierozpuszczalnych zawartych w alginianie nie szkodził, np. w wyniku interferencji z właściwościami płynięcia roztworu alginianu albo zmniejszenia siły żelowania, tworzeniu zadawalającego produktu. Można użyć alginianów nie całkowicie oczyszczonych.

Zestalenia alginianu na drodze chemicznej można dokonać przy użyciu jonów metali, nadających alginianowi nierozpuszczalność zwłaszcza przy użyciu jonów wapnia. Idealnymi czynnikami zestalującymi są sole takie jak chlorek wapniowy lub fosforan wapniowy. Alternatywnie użyć można kwasowego czynnika zestalającego. Można użyć wolnych kwasów, takich jak kwas solny lub kwas octowy.

Możliwe jest także użycie, alternatywnie do układów zestalania na drodze chemicznej, materiałów żelujących zestalanych termicznie, w szczególności białek. I tak, w przypadku, przykładowo, żelatyny, należy utworzyć roztwór białka w wodzie, w temperaturze np. 60°C, po czym roztwór ten ochłodzić, a następnie dodać do niego oocysty ziarniaków w temperaturze, w której pozostaną one żywotne. Żelowanie żelatyny rozpoczyna się w temperaturze około 30°C i można je ułatwić za pomocą pozwolenia kropelkom roztworu żelatyny na spadanie do zimnego oleju.

Stężenie czynnika zestalającego w kąpeli zastalającej wpływa na czas zestalenia się roztworu alginianu. Ponadto, jeżeli stężenie czynnika zestalającego, a w szczególności soli wapniowej, takiej jak chlorek wapniowy, będzie wysokie, poziom soli w kuleczkach alginianu może być także wysoki. Następnie kuleczki rozpływają się i można nie odvodnić ich w stopniu wystarczającym. Ponadto, w wilgotnych kuleczkach obecność soli wapniowych w wysokim stężeniu wywołuje silny wpływ osmotyczny na oocysty, a zjawiska tego, jeżeli tylko jest to możliwe, powinno się uniknąć. Ogólnie, wymagany jest maksymalny poziom zawartości chlorku wapniowego w kąpeli zastalającej nie wyższy niż 5% wagowych.

Jednakże, gdy zżelowane kuleczki pozostawia się w kontakcie z wodą przez określoną ilość godzin, np. przez noc, nadmiar chlorku wapniowego zostanie z kuleczek oddyfundowany.

Jeżeli jest to pożądane, odwodnienia kuleczek żelu można dokonać za pomocą suszenia na powietrzu i na ogół powinno się dążyć do uzyskania poziomu zawartości wilgoci poniżej 20% wagowych.

Tym niemniej, kuleczki żelu korzystnie przechowują się w stanie wilgotnym, np. w kontakcie z podłożem wodnym, które zapewnia najlepsze środowisko dla oocyst. Kuleczki można włączyć do karmy w stanie wilgotnym, pozwalające im osiągnąć poziom wilgotności stanowiący wynik równowagi.

Przedmiot wynalazku objaśniają bardziej szczegółowo następujące przykłady.

Przykład I. W przykładzie tym, jako podłoże żelowe stosuje się handlowo dostępny alginian sodowy (Manucol LB). Alginian ten wykazuje wysoki stosunek reszt kwasu mannurowego do reszt kwasu glukuronowego oraz niską masę cząsteczkową. „Manucol“ jest to nazwa fabryczna produktu firmy Kelco/AIL International Ltd.

95 ml 11% wagowych wodnego roztworu Manucol LB miesza się z 5 ml wodnej zawiesiny żywotnych oocyst ziarniaków z wytworzonymi zarodnikami (*Eimeria tenella*) zawierającej około 600000 oocyst. Mieszanie tę wkrapla się z odległości około 7,62 cm do 5% wagowych wodnego roztworu dwuwodzianu chlorku wapniowego. Tak wytworzone zestalone kuleczki żelu mają w

przybliżeniu średnicę około 5 mm i wagę około 40 mg. W czasie 2-minutowej szarży otrzymuje się około 2500 kuleczek. Pozwala się im pozostawać w kąpieli zestalającej w ciągu 15 minut odsiewa się je od czynnika zestalającego i namacza przez noc w wodzie wodociągowej w celu usunięcia chlorku wapniowego. Kuleczki pozostawia się do wyschnięcia na papierze chłonnym w temperaturze otoczenia. Ich końcowa wilgotność wynosi 15–16% wagowych.

Przykład II. W przykładzie tym, jako podłoże żelowe, stosuje się alginian sodowy z gliceryną jako środkiem utrzymującym wilgoć.

45 ml 11% wagowych wodnego roztworu alginianu sodowego w postaci Manuco! LB miesza się z 5 ml zawiesiny oocyst ziarniaków, tak jak to wyżej opisano w przykładzie I, i 50 ml gliceryny. Mieszaninę tę poddaje się takiej samej obróbce, prowadzącej do wytworzenia kuleczek, jak wyżej opisano w przykładzie I, z tym wyjątkiem, że nadmiar chlorku wapniowego usuwa się z żelowanych kuleczek przez namoczenie na noc w mieszaninie wody i glicerynie 50 : 50. Końcowa zawartość wilgoci w wysuszonych kuleczek wynosi i w tym przypadku 15–16% wagowych.

Żywotność oocyst ziarniaków w kuleczkach alginianowych wytworzonych sposobem według dwóch poprzednich przykładów wykazano w następującym badaniu.

Po przechowywaniu w stanie odwodnionym w ciągu kilku dalszych dni, próbkę kuleczek alginianowych miesza się z 500 g zwykłej karmy dla drobiu, tak, że 500 g próbka karmy zawiera 2500 kuleczek. Każdą próbką karmy karmi się 2 30-dniowe kurczęta ad libitum w ciągu 2 dni. Wszystkie ptaki wykazują kliniczne objawy kokcydiozy, z krwią w odchodach 5-go i 6-go dnia po podaniu karmy zawierającej oocysty.

Test ten wykazuje, że duża ilość oocyst ziarniaków pozostaje w stanie żywotnym wbrew procesom, którym zostały one poddane, oraz że są one ciągle zdolne do zadowalającej ekscystacji w jelicie, pomimo tego, że są one osadzone w alginianowym podłożu żelowym.

Przykład III. Eksperyment ten jest przeznaczony do tego, aby potwierdzić, że bardzo niewielka ilość żywotnych oocyst z wytworzonymi zarodnikami, dodana do karmy dla drobiu, może przeżyć i powodować subkliniczne, kontrolowane zakażenia po zjedzeniu przez podatne ptaki. Odporność powstała w rezultacie tego rodzaju traktowania, kontynuowanego w ciągu 27 dni, sprawdza się dawką prowokującą w postaci 50000 oocyst. Używa się dwóch grup ptaków po 12 ptaków w każdej grupie. Pierwsza grupa otrzymuje dietę zawierającą oocyst już od wieku 1 dnia, druga dietę normalną, nie zawierającą oocyst. Ptaki były trzymane na siatce drucianej, tak, że możliwa była kontrola ich dziennego wydalania oocyst (wynikającego z obecności oocyst w diecie). Pomieszczenie, w którym przetrzymywano ptaki, utrzymywano starannie w takim stanie, aby zapewnić, że nie pozostają w nim żadne oocysty.

Oocysty wytwarza się za pomocą zakażenia 4-tygodniowych kurcząt-brojlerów Cobb dawką doustną 50000 oocyst na ptaka, a następnie zebrania ptasich odchodów 6-go, 7-go i 8-go dnia po zakażeniu, wymieszania z mniej więcej dwukrotną objętością 2,5% wodnego roztworu dwuchromianu potasowego i zhomogenizowania aż do uzyskania gładkiej papki. Następnie papkę tę przeciska się przez nylonową gazę i z przesączu odzyskuje się oocysty za pomocą flotacji solnej w następujący sposób. Najpierw oocysty osadza się za pomocą wirowania przy $100 \times g$ w ciągu 15 minut, po czym osad zawieszają w nasyconym wodnym roztworze chlorku sodowego. Następnie zawiesinę tę wiruje się przy $50 \times g$ w ciągu 10 minut. Pozostałą zawiesinę oocyst odciąga się i rozcieńcza 10 objętościami wody destylowanej. Za pomocą wirowania przy $1000 \times g$ w ciągu 15 minut osadza się oocysty w postaci peletu. Całkowity proces flotacji solnej powtarza się i powstały pelet rozproszają w 2,5% wodnym roztworze dwuchromianu potasowego. Doprowadza się do wytworzenia w ekstrahowanych oocystach zarodników za pomocą ciągłego napowietrzania tej zawiesiny w ciągu 4 dni w temperaturze $28^{\circ}C$. Oocysty te przechowuje się jako zawiesinę macierzystą w temperaturze $4^{\circ}C$ w buforowanym fosforanami roztworze soli.

Kuleczki wytwarza się sposobem opisanym w powyższym przykładzie I, z tą różnicą, że używa się ogółem 30000 oocyst ziarniaków z wytworzonymi zarodnikami. Do 3 kg karmy dla drobiu dodaje się 240 kuleczek i karmi nią nowowylute kurczęta w ciągu 3 tygodni. W obu grupach kontroluje się poziom wydalanych oocyst. Uzyskane wyniki przedstawione są na figurze 1.

Oocysty, które przeżyły w karmie czas trwania eksperymentu przeszły, jako oocysty, od 8-go dnia w prawo, w ciągu okresu uodporniania się, jak przedstawiono na figurze 1. Na podstawie

rozkładu wydalania oocyst (linia A) przedstawionego na figurze 1, jest oczywiste, że zasadnicza odporność zaczyna się rozwijać wkrótce po tym, gdy ptaki osiągną wiek zaledwie 2 tygodni, gdyż zwiększone wydalanie oocyst szybko ustaje i 21-go dnia staje się kontrolowane.

Oocysty uodporniające nie wywołują wykrywalnych efektów patogennych. W ciągu całego okresu uodpornienia nie zauważa się krwawych odchodów, co ważniejsze, średni przyrost wagi w grupie kontrolnej i uodpornianej są w istocie identyczne aż do dnia prowokacji.

Prowokacja (C) 50000 oocyst 27-go dnia powoduje ciężką chorobę u grupy kontrolnej, jak można sądzić na podstawie obecności krwi w odchodach i obfitego wydalania oocyst (linia B, figura 1). Grupa uodporniana zupełnie nie została zaatakowana, przy tym w obydwu grupach nie stwierdzono śmiertelności.

Przykład IV-VII. Przykłady te objaśniają użycie wypełniaczy przy wytwarzaniu kuleczek alginianowych.

Kuleczki wytwarza się sposobem opisanym w powyższym przykładzie I z zastosowaniem „roztworu“ przedstawionego poniżej:

Przykład	Alginian	Wypełniacz
IV	1% Manucol LM	10% handlowej białej mąki pszennej
V	0,25% Manucol LM	10% handlowej białej mąki pszennej
VI	1% Manucol LM	10% glinki białej
VII	0,25% Manucol LM	10% glinki białej

W każdym przypadku, po zestaleniu i wysuszeniu sposobem opisanym w powyższym przykładzie I, otrzymuje się mocne kuleczki. Manucol LM jest to alginian wykazujący wysoki stosunek ilości reszt kwasu mannurowego do ilości reszt kwasu guluronowego oraz wysoką masę cząsteczkową, korzystną przy użyciu wypełniaczy dla zapewnienia odpowiedniej siły żelu.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania doustnej kompozycji immunogennej dla zwierząt takich jak drób, dla ich uodpornienia na infekcje wywołane przez pasożytnicze pierwotniaki, takie jak ziarniaki, **znamienny tym**, że wytwarza się zawiesinę żywych zamkniętych w cystach pierwotniaków w wodnym roztworze materiału węglowodanowego tworzącego żel takiego jak alginiany, o stężeniu 0,25–11% wagowych przy czym stosuje się co najmniej 1000 do 1 miliona cyst na kg oraz ewentualnie dodatek wypełniaczy w ilości 0,25–10% wagowych zawiesiny, a następnie w celu zżelowania zawiesinę wkrapla się do roztworu chlorku wapnia o stężeniu około 5% wagowych, w czasie około 15 minut i ewentualnie osusza.

