

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

31 472

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 35/57 (2015.01)
A61K 39/40 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)
A61K 45/08 (2006.01)
A61K 33/30 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLŮVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-34499**
(22) Přihlášeno: **21.12.2017**
(47) Zapsáno: **13.02.2018**

- (73) Majitel:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ
- (72) Původce:
MVDr. Josef Krejčí, Brno, Královo Pole, CZ
Hana Kudláčková, Dolní Kounice, CZ
MVDr. Klára Házová, Babice u Rosic, CZ
MVDr. Pavel Alexa, Lelekovice, CZ
RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D., Kuřim, CZ
Mgr. Nad'a Zemánková, Tišnov, CZ
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D., Tišnov, CZ
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D., Opava, Kateřinky, CZ
Mgr. Michaela Macečková, Šumperk, CZ
MVDr. Petra Ondráčková, Ph.D., Brno, Židenice,
CZ
Ing. Lenka Levá, Brno, Staré Brno, CZ
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D., Velešovice, CZ
- (74) Zástupce:
INVENTIA s.r.o., Kateřina Hartvichová, Na bělidle
64/3, 150 00 Praha 5, Smíchov

- (54) Název užitného vzoru:
**Veterinární přípravek pro prevenci a léčbu
průjmových onemocnění u zvířat**

CZ 31472 U1

Veterinární přípravek pro prevenci a léčbu průjmových onemocnění u zvířat

Oblast techniky

Předkládané technické řešení poskytuje veterinární přípravek pro prevenci a léčbu průjmových onemocnění u zvířat.

5 Dosavadní stav techniky

Průjmy selat po odstavu obvykle nejsou příčinou přímých ztrát úhynem, ale ztrát nepřímých způsobených zastavením růstu nebo případnými váhovými ztrátami, které neúměrně prodlužují období výkrmu. Hlavními původci průjmových onemocnění v tomto období jsou z bakterií zejména enteropatogenní kmeny *Escherichia coli*, salmonely, klostridie a lawsonie, z virů zejména rotaviry a koronaviry. V minulosti byl problém průjmů odstavených selat řešen plošným nasazením antibiotik, která měla eliminovat hlavní původce střevních infekcí a zároveň potencionovat jejich růstové schopnosti. Postupný nárůst bakteriálních kmenů vykazujících mnohočetnou rezistenci vedl orgány Evropské unie k tomu, že používání krmných antibiotik bylo výrazně omezeno. Obava z hromadného výskytu střevních infekcí a to zejména u odstavených selat vedla k tomu, že do krmiv určených pro odstávčata začal být ve velkých množstvích přidáván oxid zinku. Většina takto přijatého zinku je opět střevem vyloučena a objevuje se ve výkalech a následně i v kejďě, kde negativně ovlivňuje životní prostředí. EU proto usiluje o zásadní omezení takto obohacených krmiv. Jejich vysazení bez adekvátní náhrady by však představovalo vysoké riziko pro chovatele hospodářských zvířat z důvodu zvýšené nemocnosti zvířat a snížení výnosů. Jednou z možností, která představuje praktické řešení uvedené problematiky, je obohacení krmiva selat o biologicky aktivní látky, které mají schopnost pozitivně modulovat infekci nebo zánětlivou odpověď ve střevě. Jedním ze slibných kandidátů je využití vaječné melanže, která kromě jiného obsahuje také protilátky IgY, které jsou schopné interagovat s potenciálními patogeny nacházejícími se ve střevě (Diraviyam aj., Effect of chicken egg yolk antibodies against diarrhea in domesticated animals: a systematic review and meta-analysis. PLoS One, 2014, 9:e99716.).

Kromě specifických protilátek a nutričních faktorů (albumin, proteiny, lipidy, cukry a vitamíny a minerály), vajíčka obsahují i některé další imunomodulující látky, které se mohou pozitivním způsobem podílet na tlumení nechtěné zánětlivé odpovědi v důsledku infekce (Choi aj., Anti-inflammatory effects of egg white combined with chalcantite in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia through the inhibition of NF- κ B, MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. Int. J. Mol. Med., 2013, 31: 154-162.).

Úkolem technického řešení je připravit nový typ veterinárního přípravku, který by měl vhodné antimikrobiální a imunomodulační účinky zajišťující ochranu hospodářských zvířat, zejména selat, před podstavovými průjmy, a tím účinně zamezovat úhynu hospodářských zvířat, zejména selat po jejich odstavení.

Podstata technického řešení

Předmětem předkládaného technického řešení je veterinární přípravek pro prevenci a léčbu průjmových onemocnění u zvířat, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje vaječnou hmotu obsahující imunoglobuliny třídy IgY.

40 Veterinární přípravek může být ve formě krmiva fortifikovaného vaječnou hmotou, přísady do krmiva, dietetického přípravku nebo koncentrátu, který může být podáván samostatně nebo s krmivem.

45 Vaječnou hmotou (někdy je též nazývána vaječnou melanží) je zde rozuměn celý obsah slepičího vejce, tedy žloutek i bílek, a to ve formě homogenizovaného obsahu slepičího vejce, nebo vysušeného homogenizovaného obsahu slepičího vejce. Sušení zvyšuje trvanlivost, zlepšuje skladovatelnost a usnadňuje další manipulaci s přípravkem.

Imunoglobuliny IgY představují třídu imunoglobulinů, jejichž specifita je namířena proti hlavním patogenním mikroorganismům schopným vyvolat střevní infekce u zvířat. Vedle nich ve vaječné hmotě se nachází celá řada dalších imunomodulačních a protizánětlivých látek.

5 Ve výhodném provedení je vaječná hmota obsahující imunoglobuliny třídy IgY připravená homogenizací obsahu vajec slepic imunizovaných cílovými patogenními organismy, s výhodou imunizovaných oslabenými cílovými patogenními organismy. Cílové patogenní mikroorganismy mohou zahrnovat například enteropatogenní kmeny *Escherichia coli* a/nebo rotaviry. Takto se zvýší množství a specifita IgY imunoglobulinů obsažených v přípravku.

10 IgY je hlavním sérovým imunoglobulinem ve slepičím vejci. Při průměrném obsahu IgY 60 až 100 mg/žloutek (v závislosti na stáří slepice) a snáše 300 vajec produkuje slepice 18 až 30 g IgY za rok. Cílenou imunizací nosnic lze zvýšit množství specifických protilátek, rozpoznávajících příslušné patogenní mikroorganismy a bránící jim v jejich adhezi na povrch střevní sliznice.

15 Ve výhodném provedení imunoglobuliny IgY zahrnují specifické protilátky proti enteropatogenním kmenům *Escherichia coli* a/nebo rotavírům. Takový přípravek lze získat cílenou imunizací nosnic enteropatogenními kmeny *Escherichia coli* a/nebo rotaviry.

Veterinární přípravek s výhodou obsahuje 0,01 až 90 % hmotnostních vaječné hmoty, výhodněji 1 až 10 % hmotnostních. Další složky mohou zahrnovat přísady podporující regeneraci a ochranu střeva, vitamíny, minerály, a farmaceuticky a/nebo potravinářsky přijatelné pomocné látky, jako jsou krmiva, plniva, rozpouštědla a další.

20 Přípravek může být vyráběn v různých aplikačních formách, zejména v pevné, polotuhé, nebo v tekuté formě, například ve formě prášku, granulátu, pasty nebo emulze.

Veterinární přípravek může dále zahrnovat další farmaceuticky účinné látky, např. antibiotika nebo sloučeniny zinku.

25 Veterinární přípravek podle předkládaného technického řešení je vhodný pro prevenci a léčbu průjmových onemocnění u zvířat, s výhodou u savců, zejména u savčích mlád, at, například selat, po odstavu.

Příklad uskutečnění technického řešení

Příprava antigenů pro imunizaci slepic

30 Pro imunizaci slepic byly použity bakteriální kmeny *Escherichia coli* (*E. coli*) a prasečí rotavirus A. Detailní popis virů i bakterií je uveden níže.

Prasečí rotavirus, katalogové číslo sbírky CAPM V-334, kmen OSU (taxonomické zařazení: rod *Rotavirus*, druh *Rotavirus A*, původ kmene: prase, střevo - trus a střevní obsah selat s gastroenteritidou, země původu: USA).

Kultivace rotaviru

35 - buněčná linie fetálních opičích (*Cercopithecus aethiops*) ledvin. MA-104, v monolayeru, kulturační médium DMEM (glukóza 4,5 g/l, 8 až 10% FBS)

- aktivace rotaviru před infekcí buněk: zásobní virovou suspenzi naředit 100x v DMEM s trypsinem (10 µg/ml), inkubovat 1 hod/37 °C

40 - infekce buněk: slít kulturační médium, monolayer pečlivě opláchnou dvakrát PBS, infikovat aktivovaným virem (na 25 cm² kulturační láhev 0,5 ml viru), inkubovat 30 min/37 °C, doplnit kulturačním médiem DMEM (glukóza 4,5 g/l) s trypsinem (2 µg/ml)

- kultivace po 2 až 3 dny/37 °C do vytvoření CPE na 80% monolayeru, zamrazit ve vodorovné poloze v -80 °C, po rozmrazení řádně promíchat a rozdělit do 1 ml alikvotů, uchovávat v hlubokomrazícím boxu při -80 °C

Kvantifikace rotaviru

- metodou kvantifikační reverzně transkripční PCR v reálném čase (RT-qPCT) v systému LightCycler 480 II (Roche), kvantifikace je prováděna podle kalibrační křivky desetinasobného ředění dsRNA, která byla přepsána ze specifického amplikonu genomu prasečího rotaviru A, kmen OSU. Výsledek je uváděn jako počet kopií genomu na 1 ml.

- extrakce virové RNA: TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, kat. č. T9424)

- jednokroková RT-qPCR s využitím QuantiFast™ Probe RT-PCR (Qiagen, kat. č. 204554)

- primery a sondy použité v RT-qPCR:

primer F: 5'-ATG CTC AAG ATG GAG TCT ACT C-3'

10 primer R: 5'-TCA TTG TAA TCA TAY TGA ATW CCC A-3'

sonda: FAM-ACA ACT GCA GCT TCA AAA GAA GTG T-BHQ

- program termocyklu

50 °C/10 min

95 °C/5 min

15 45x 95 °C/10 sec

60 °C/30 sec

- výsledný počet kopií genomu RVA, kmen OSU: $2,16 \times 10^{10}$ kopií genomu/ μ l

Výběr vhodných kmenů E. coli

Bakteriální kmeny *Escherichia coli* pro přípravu bakterinu pro imunizaci slepic:

20 kmeny 12548 (O149: F4ac), 8914 (O141: F18ac) - byly vybrány z důvodu vysoké exprese adhezinů (potvrzeno v testech vysycením specifickými antiséry) a kmeny 12640 (O149: F4/LT), 11758 (O8: F18) z důvodů vysoké adherence (potvrzeno v testech adherence).

Zjišťování množství antigenu vysycováním antisér

25 - kultivace kmenů v 10 ml médiu (kmeny s antigenem F4 - médium MINCA, kmeny s antigenem F18 - kaseinhydrolyzátové médium) 16 hod, při 37 °C na třepačce

- centrifugace narostlé kultury při 15000 ot./20 min.

- slítí supernatantu, sediment rozsuspendován v 1 ml daného antiséra ředěného 1:10

- zahřátí ve vodní lázni 1 až 2 hod, při 40 °C

- centrifugace při 10000 ot./10 min.

30 - kontrola množství antigenů ve vybraných kulturách vysycených antiséry na základě aglutinace.

Testování adherence

- kultivace kmenů v 5 ml médiu (kmeny s antigenem F4 - médium MINCA, kmeny s antigenem F18 - kaseinhydrolyzátové médium) přes noc při 37 °C na třepačce

- inaktivace 10% vodným roztokem fenolu

35 - centrifugace při 8000 ot./10 min.

- slítí supernatantu, sediment rozsuspendován v 2 ml PBS

- změření hustoty narostlé kultury dle stupňů Mac Farlanda (výsledná hustota by měla být 1,9)

Kultivace

40 - příprava narostlé kultury - do 5 ml média (kmeny s antigenem F4 - médium MINCA, kmeny s antigenem F18 - kaseinhydrolyzátové médium) přes noc na třepačce při teplotě 37 °C

- naočkování tekuté půdy (250 ml Minca či kaseinhydrolyzátového média) 1/10 narostlé kultury - kultivace přes noc na třepačce při teplotě 37 °C

- kontrola čistoty - vyočkování narostlých kultur na krevní agar, kontrola růstu bakterií a jejich následná inaktivace 0,5% roztokem formalínu do následujícího dne

5 - počet CFU/ml na McConcey agaru (před inaktivací)

○ 12548 - 5×10^9

○ 8914 - 5×10^9

○ 12241 - $7,5 \times 10^9$

○ 12640 - $1,5 \times 10^9$

10 ○ 11758 - 5×10^9

- kontrola sterility - po inaktivaci 0,5% roztokem formalínu narostlých kultur vyočkování 100 μ l narostlé kultury na krevní agar, kontrola růstu bakterií po 48 hod, a po 72 hod.

Zvířata, jejich imunizace

15 Slepice byly rozděleny do 4 skupin po 3 zvířatech podle toho, kterým antigenem byly imunizovány, 1. Skupina byla imunizována rotavirem v dávce 4×10^{14} kopií na jedno zvíře; 2. skupina byla imunizována *E. coli* F4+, kmen 12640 (aglutinačně +) a 15548 (adherenčně +), každý kmen v dávce $0,75 \times 10^9$ tzn. $1,5 \times 10^9$ CFU na jedno zvíře; 3. skupina byla imunizována *E. coli* F18+, kmen 8914 (aglutinačně +) a 11758 (adherenčně +), každý kmen v dávce $0,75 \times 10^9$ tzn. $1,5 \times 10^9$ CFU na jedno zvíře a 4. skupina byla imunizována *E. coli* F4+, *E. coli* F18+, rotavirus; výsledná imunizační dávka celkem $1,5 \times 10^9$ CFU na jedno zvíře v případě *E. coli* a 4×10^{14} kopií na jedno zvíře v případě rotaviru.

časový harmonogram:

den 0 imunizace příslušnými antigeny + 50% FCA (Freundovo kompletní adjuvans), odběr séra

den 30 revakcinace s 50% FIA (Freundovo inkompletní adjuvans)

25 den 60 revakcinace s 50% FIA, odběr séra

den 120 revakcinace s 50% FIA

Od 50. do 180. dne byla sbírána vejce.

Imunizace

30 Imunizace byla provedena intramuskulárně. Výskyt specifických protilátek proti příslušným antigenům byl pozorován po 180 dní. V průběhu tohoto časového intervalu byly sledovány hladiny a specifita vytvořených protilátek ELISA testy Western-blottem. Konkrétně v den 0, 30, 60, 72, 90, 104, 120, 150 a 180 po imunizaci ELISA metodou a v jednom případě (60. den) Western blottem.

Detekce imunitní odpovědi

35 *ELISA*

Přítomnost protilátek byla stanovena metodou ELISA (capture ELISA) pomocí antigenů F4+ (fimbrie) kmen 11548 - K88 (F4) a F18 (fimbrie) kmen 8914 - F18ac, které byly získány podle následujícího postupu:

Příprava fimbrií F18

40 Bakteriální kmeny byly sklizeny do PBS a následně byly odděleny fimbrie inkubací suspenze při 60 °C po dobu 20 min. Bakteriální buňky byly odstraněny centrifugací po dobu 20 min při 35000 x g, 4 °C. Fimbrie byly vysráženy přidáním 20% v/v nasyceného síranu amonného. Sraženina byla oddělena následnou centrifugací po dobu 45 min při 60000 g při 4 °C. Peleta byla resuspendována v PBS, pH 7,2 a dialyzována proti destilované vodě po dobu 24 hodin při 4 °C. Precipita-

tace fimbrií byla opakována v 10% v/v nasyceném síranu amonném. Testy specifity byly uskutečněny pomocí Western-blottů. Tento test zahrnoval rozdělení purifikovaných a nepurifikovaných extraktů a detekci specifických antigenů antiséry proti kompletním bakteriálním buňkám.

Příprava fimbrií F4

- 5 Příprava těchto fimbrií se lišila od předchozího postupu pouze přidáním 2,5% kyseliny citronové namísto nasyceného síranu amonného.

Vlastní postup ELISA testu:

- vazba antigenu - antigen v koncentraci 1 µg/ml ve vazném karbonátovém pufru pH 9,6; 100 µl/jamku, vazba přes noc lednice, desky Maxisorp (Nunc)
- 10 - 5x promytí PBS + 0,05 % Tween 20
- blokáce 60 min 0,5% kasein + 10% sacharóza
- vyředění kontrol a vzorků - vyšetřované vzorky a kontroly ředěné 100x a dále 3kově v ředícím roztoku - PBS + 0,05% Tween 20 + 0,5% kaseinový hydrolyzát
- inkubace 60 min, při pokojové teplotě
- 15 - 5x promytí v PBS + 0,05% Tween 20
- konjugát anti-chicken IgY s křenuvou peroxidázou (Bethyl) ředěný 60.000x v PBS+Tween 20 + kaseinový hydrolyzát, po 100 µl/jamku, 60 min, pokojová teplota
- 5x promytí v PBS + 0,05% Tween 20
- aplikace substrátu - TMB Test-line po 100 µl/jamku, doba působení 0 až 30 min.,
- 20 - stop 2M H₂SO₄ 50 µl/jamku
- měření při 450 nm

Výsledky ELISA:

U všech testovaných skupin došlo k výraznému vzestupu hladiny protilátek (anti-F4, anti F18, anti-Rota) 30. den po imunizaci zvířat.

- 25 *Western-blot*

- Pro detekci antigenu byla použita primární protilátka ze séra slepic imunizovaných F4+ respektive F18+ antigenem. Sérum zvířat před imunizací bylo použito jako negativní kontrola. Séra byla 300x ředěna v ředícím roztoku (PBS + 0,05% Tween 20 + 0,5% kaseinový hydrolyzát). Jako sekundární protilátka byl použit peroxidázový konjugát králíčího IgG proti slepičímu IgY (Thermo Scientific). Sekundární protilátka byla ředěna 3000x v ředícím roztoku (PBS + 0,05% Tween 20 + 0,5% kaseinový hydrolyzát). Pro vizualizaci blotu byl použit DAB (3,3'diaminobenzidin). Proteiny o velikosti 25, 35 a 40 kDa, které byly technikou western-blot detekovány jsou ve shodě s údaji v literatuře.

Testování protizánětlivých účinků vaječné melanže

- 35 Protizánětlivé účinky vaječné melanže byly testovány *in vitro* na modelu prasečích makrofágů derivovaných z monocytů stimulovaných lipopolysacharidem. Monocyty byly z periferní krve 3 prasat získány na základě jejich schopnosti adherovat k plastovým povrchům. Po 6denní derivaci byly makrofágy vystaveny účinku 4 různých koncentrací vaječné melanže a následně simulovány lipopolysacharidem (1 µg/ml) po dobu 4 hodin. Jejich odpověď na tuto stimulaci byla stanovena na základě tvorby prozánětlivých cytokinů. Tvorba prozánětlivých cytokinů IL-1beta, IL-8 a TNFalfa byla stanovena na základě relativní kvantifikace obsahu mRNA. Jako referenční sloužil gen HPRT. Z výsledků je patrný tlumivý efekt vaječné melanže na zánětlivou odpověď a to v závislosti na dávce.

Sušení vaječné melanže

Vaječná hmota byla připravena homogenizací vaječných obsahů (bílek + žloutek). Před samotnou homogenizací byla odstraněna vaječná poutka (chalázie) filtrací přes gázu. Homogenáty byly různými způsoby sušeny nebo lyofilizovány.

- 5 Na základě výsledků ELISA testů (stanovení titrů protilátek) byla vybrána vejce s vysokým obsahem protilátek. Z nich byla připravena vaječná melanž, která byla následně zmrazena a později různými způsoby sušena:

melanž smíchána 1:1 s mikrocelulózou a fluidně sušena vzduchem

melanž smíchána 1:1 s mikrocelulózou a sušena vakuem

- 10 sprayové sušení 155 °C/65 °C (teplota vzduchu/teplota produktu)

sprayové sušení 170 °C/70 °C

sprayové sušení 180 °C/75 °C

sprayové sušení 200 °C/80 °C

lyofilizace

- 15 Vliv sušení na zachování funkce specifických protilátek byl ověřen pomocí výše popsané metody ELISA. Z výsledků je patrné, že různé postupy sušení vaječné hmoty mají malý vliv na výsledné množství protilátek. Pokud docházelo ke ztrátám, pak jen při fluidním sušení vzduchem.

Příklady přípravy krmiva obsahujícího vaječnou melanž s obsahem protilátek IgY proti E. coli a rotavirům, připravenou postupem popsaným výše.

- 20 **Příklad 1**

Byly připraveny tři varianty obohaceného krmiva pro selata. Sušená vaječná melanž byla mechanicky přimíchána do sypké krmné směsi pro selata v objemu 0,1, 5 a 10 % celkového váhového objemu krmné směsi.

Příklad 2

- 25 Byly připraveny čtyři varianty veterinárního přípravku. Sušená vaječná melanž byla smíchána s palmovým olejem tak, aby její zastoupení v hotovém produktu (krmná pasta) odpovídalo 0,001, 40, 70 a 90 hmotnostních procent, vztaheno k celkové hmotnosti přípravku.

NÁROKY NA OCHRANU

- 30 1. Veterinární přípravek pro prevenci a léčbu průjmových onemocnění u zvířat, **v y z n a -**
č e n ý t í m, že obsahuje vaječnou hmotu obsahující imunoglobuliny třídy IgY.

2. Veterinární přípravek podle nároku 1, **v y z n a č e n ý t í m**, že je ve formě krmiva fortifikovaného vaječnou hmotou, přísady do krmiva, dietetického přípravku nebo koncentrátu pro podávání samostatně nebo s krmivem.

- 35 3. Veterinární přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **v y z n a č e n ý t í m**, že vaječná hmota je ve formě homogenizovaného obsahu slepičího vejce, nebo vysušeného homogenizovaného obsahu slepičího vejce.

4. Veterinární přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **v y z n a č e n ý t í m**, že vaječná hmota obsahující imunoglobuliny třídy IgY je připravená homogenizací obsahu vajec slepic imunizovaných cílovými patogenními organismy, případně oslabenými.

5. Veterinární přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **v y z n a ě n ý t í m**, že imunoglobuliny IgY zahrnují specifické protilátky proti enteropatogenním kmenům *Escherichia coli* a/nebo rotavirům.
- 5 6. Veterinární přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **v y z n a ě n ý t í m**, že obsahuje 0,01 až 90 % hmotnostních vaječné hmoty, výhodněji 1 až 10 % hmotnostních.
- 10 7. Veterinární přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **v y z n a ě n ý t í m**, že dále obsahuje přísady podporující regeneraci a ochranu střeva, vitamíny, minerály, a farmaceuticky a/nebo potravinářsky přijatelné pomocné látky, jako jsou krmiva, plniva, rozpouštědla a další.
8. Veterinární přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **v y z n a ě n ý t í m**, že je ve formě prášku, granulátu, pasty nebo emulze.
9. Veterinární přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **v y z n a ě n ý t í m**, že dále obsahuje antibiotika a/nebo sloučeniny zinku.

Konec dokumentu
