

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 298

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/40 (2006.01)
A23J 1/08 (2006.01)
A23J 3/04 (2006.01)
A23J 3/22 (2006.01)
C12R 1/325 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35433**
(22) Přihlášeno: **08.10.2018**
(47) Zapsáno: **06.11.2018**

- (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
Mgr. Michaela Macečková, Šumperk, CZ
Ing. Lenka Levá, Brno, Staré Brno, CZ
MVDr. Petra Ondráčková, Ph.D., Brno, Židenice,
CZ
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D., Tišnov, CZ
Mgr. Iva Slaná, Ph.D., Brno, Černovice, CZ
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D., Velešovice, CZ
MVDr. Soňa Šlosárková, Ph.D., Jihlava, CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Na bělidle 64/3, 150 00 Praha 5,
Smíchov

- (54) Název užitného vzoru:
**Veterinární dieteticko-nutriční přípravek
pro zvýšení specifické odolnosti zvířat proti
infekci původcem paratuberkulózy**

CZ 32298 U1

Veterinární dieteticko-nutriční přípravek pro zvýšení specifické odolnosti zvířat proti infekci původcem paratuberkulózy

5 Oblast techniky

Předpokládané technické řešení poskytuje veterinární dieteticko-nutriční přípravek pro zvýšení především specifické odolnosti zvířat ohrožených infikováním původcem paratuberkulózy.

10

Dosavadní stav techniky

Paratuberkulóza je chronické infekční onemocnění přežvýkavců, které se v našich chovech skotu v posledním čtvrtstoletí značně rozšířilo a stalo se tak závažným hospodářským problémem. Původcem tohoto onemocnění je bakterie *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Ze všech věkových kategorií vystavených MAP jsou nejvímavější novorození jedinci, a dále telata v prvních týdnech života (Windsor P.A. and Whittington R.J., Vet. J. 2010, 184:37-44). Nejvýznamnější vstupní branou infekce je zažívací trakt, zejména tenké střevo, resp. ileum. Hlavní dva zdroje jsou MAP obsažená přímo v kolostru a mléku infikovaných krav a dále MAP ze zevního prostředí. Alimentární přenos je omezen jen na relativně krátkou dobu po narození. Navíc čím větší infekční dávkou MAP a čím časněji se telata nakazí, tím dříve u těchto zvířat propuknou příznaky nemoci. Základními preventivními kroky je omezení kontaktu čerstvě novorozeného telete s původcem onemocnění. Praktická doporučení proto spočívají v jejich okamžitém přesunu do bezpečnějšího prostředí bez kontaktu s dospělými zvířaty (v dospělosti se u dříve infikovaných zvířat mohou rozvinout příznaky onemocnění spojené často s masivním vylučováním mykobakterií), dále v jejich prvním napojení co nejbezpečnějším kolostrem a dále co nejrychlejším převedení na náhradní mléčnou výživu zajišťovanou prověřenými sušenými mléčnými směsmi. Jakkoliv je popsán postup většinou účinný, jeho striktní dodržení je v podmínkách hromadné živočišné výroby jen obtížně dosažitelné.

30

Úkolem navrhovaného dieteticko-nutričního přípravku je pomoci co nejlépe překonat kritické období nejvyššího rizika infikování novorozeného telete v době mezi jeho narozením a ukončením kolostrální (příp. mléčné) výživy především omezením rizika či míry jeho infikování *per os*.

35

Podstata technického řešení

Předmětem předkládaného technického řešení je veterinární dieteticko-nutriční přípravek pro zvýšení především specifické odolnosti zvířat proti paratuberkulóze v infikovaných chovech. Podstata tohoto řešení spočívá v tom, že přípravek obsahuje vaječnou hmotu, v níž jsou přítomny specifické IgY protilátky proti MAP.

Veterinární přípravek může být obecně ve formě krmiva fortifikovaného vaječnou hmotou nebo přísady do krmiva, tj. dietetického přípravku nebo dietetického koncentrátu, konkrétně pak především ve formě kolostra fortifikovaného vaječnou hmotou, náhražky kolostra fortifikované vaječnou hmotou, mléka fortifikovaného vaječnou hmotou, mléčné krmné směsi fortifikované vaječnou hmotou.

Dietetický přípravek může být podáván samostatně, dietetický koncentrát s kolostrem nebo mlékem nebo jejich náhražkami, případně i s jiným krmivem.

Vaječnou hmotou (někdy je též nazývána vaječnou melanží) je rozuměn celý obsah slepičího vejce, tedy žloutek i bílek, a to ve formě homogenizovaného obsahu, nebo vysušeného

homogenizovaného obsahu. Sušení zvyšuje trvanlivost, zlepšuje skladovatelnost a usnadňuje další manipulaci s přípravkem.

5 IgY je hlavním sérovým imunoglobulinem ve slepičím vejci. Při průměrném obsahu IgY 60 až 100 mg/žloutek (v závislosti na stáří slepice) a snášce 300 vajec produkuje slepice 18 až 30 g IgY za rok. Obecně cílenou imunizací nosnic lze zvýšit množství specifických protilátek, které budou rozpoznávat příslušné patogenní mikroorganismy a bránit jim v jejich adhezi na povrch střevní sliznice a v pronikání do hlubších vrstev střevní stěny.

10 Vaječná hmota se specifickými IgY protilátkami proti MAP je připravená imunizací slepic bakteriálním kmenem *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, a zpracováním vajec těchto slepic homogenizací a popřípadě i sušením.

15 Specifické imunoglobuliny IgY jsou namířeny proti MAP, které infikují zvíře přes střevní stěnu, v níž později vyvolávají granulomatózní zánět, hlavní příčinu chronických průjmů a následných ztrát. Vedle specifických protilátek se ve vaječné hmotě nachází celá řada dalších imunomodulačních a protizánětlivých látek, což je prospěšné pro zvýšení imunity zvířat, jimž je přípravek podáván.

20 Podstatou navrhovaného přípravku je, že nutriční a biologické potřeby novorozených zvířat saturované kolostrum, náhražkami kolostra a mlékem, resp. sušenou mléčnou krmnou směsí, jsou doplňovány vaječnou hmotou obsahující specifické IgY protilátky proti MAP. Jejich přítomnost ve střevě zajistí neutralizaci infekčních agens a potenciálně omezí vstup MAP přes střevní stěnu. IgY protilátky jsou sérové protilátky ptáků (jejich ekvivalentem u savců jsou protilátky

25 třídy IgG; název IgY je odvozen od anglického yolk - žloutek), které jsou v průběhu ovogeneze koncentrovány ve vaječných žloutcích; během prvních dnů života pak chrání vylíhnutá ptáčata před infekcí z prostředí. Jejich přítomnost ve žloutkovém vaku vyvíjejícího se ptačího zárodku a později v krvi vylíhnutých ptáčat je evolučně starší obdobou kolostrální imunity známé u savců. Specifické protilátky ve vaječných žloutcích jsou výsledkem kontaktu dospělých ptáků se zevním

30 prostředím a jejich reakcí na infekční agens v něm přítomné. IgY protilátky proti MAP je neutralizují – brání jejich adhezi na povrchy hostitelských buněk.

Kromě specifických protilátek a nutričních faktorů (albumin, proteiny, lipidy, cukry, vitamíny a minerály), vaječná hmota obsahuje i některé další imunomodulující látky, které se mohou

35 pozitivním způsobem podílet na tlumení nechtěné zánětlivé odpovědi v důsledku infekce (Choi E.A. et al., Int. J. Mol. Med., 2013, 31:154-162) a napomáhat rozvoji střevní sliznice novorozených zvířat. Biologicky aktivní látky obsažené ve vejcích, stejně jako v savčím kolostru, svým významem pro vývoj novorozeného jedince daleko překračují prostou nutriční hodnotu těchto krmiv.

40 Zařazení dieteticko-nutričního přípravku do výživy novorozených telat ohrožených časnou infekcí MAP nejen zvyšuje specifickou odolnost telat vůči infekci MAP či potenciálně brání specifické infekci, ale je i vhodným biologicky aktivním doplňkem kolostrálních a mléčných náhražek.

45 Veterinární dieteticko-nutriční přípravek obsahuje 0,1 až 100 % hmotnostních vaječné hmoty, výhodněji 1 až 15 %.

50 Veterinární dieteticko-nutriční přípravek dále může zahrnovat přísady podporující ochranu a regeneraci střeva, vitamíny, minerály, a farmaceuticky a/nebo potravinářsky přijatelné pomocné látky, jako jsou krmiva, plniva, rozpouštědla a další.

55 Veterinární dieteticko-nutriční přípravek může dále zahrnovat další farmaceuticky účinné látky, např. antimikrobika, probiotika, prebiotika apod.

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

- 5 Veterinární dieteticko-nutriční přípravek podle předkládaného technického řešení je vhodný především pro zvýšení specifické odolnosti telat proti infekci MAP a jeho zkrmování může být vhodnou součástí systému preventivních opatření zaměřených na omezení přenosu původců paratuberkulózy přežvýkavců v chovech postižených touto infekcí.

10

Příklad uskutečnění technického řešení

Příprava antigenu pro imunizaci slepic

- 15 Pro imunizaci slepic byl použit bakteriální kmen *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

Detailní popis bakterie: Terénní izolát MAP 7072, kmen izolovaný z infikovaného zvířete (taxonomické zařazení: rod *Mycobacterium*, druh *Mycobacterium avium*), původ kmene: jelen bílý, plicní mízní uzlina, zvíře s diseminovanou paratuberkulózou, země původu: ČR.

20

Kultivace MAP

- Kultivace na pevném Herroldově médiu s přidavkem antibiotik (PANTA; koncentrace dle instrukcí výrobce) a Mykobaktinu J (1 mg/l).

25

- Kultivace 3 týdny / 37 °C do vytvoření nárůstu bakteriální hmoty.

Kvantifikace MAP

30

- Metodou duplexní kompetitivní kvantifikační PCR v reálném čase (qPCR) s interní amplifikační kontrolou v systému LightCycler 480 II (Roche). Kvantifikace je prováděna podle kalibrační křivky desetinasobného ředění plazmidového standardu. Výsledek je uváděn jako počet kopií genomu.

35

- Uvolnění DNA z buněk: lýze při 100 °C po dobu 20 min.

- qPCR s využitím DyNAmo™ Probe qPCR Kit

40

- Program termocykleru

- 95 °C/15 min

- 47x 95 °C/5 s

45

- 60 °C/40 s

Příprava antigenu pro imunizaci

- 50 Narostlá kultura MAP byla homogenizována pomocí skleněných kuliček ve fyziologickém roztoku do dosažení OD₆₀₀ 2,94, což odpovídá koncentraci 10¹⁰ bakterií/1 ml. Následovala sterilizace při 120 °C po dobu 30 minut.

55

Zvířata, jejich imunizace

- 5 Osm kuřic ve věku šestnáct týdnů bylo vakcinováno teplem inaktivovanými bakteriemi MAP o koncentraci $3 \cdot 10^9$ /ml v dávce 1ml/kuřici intramuskulárně.

Vakcinační schéma a časový harmonogram prací:

- 10
- den 0 - imunizace MAP s 50% FCA (Freundovo kompletní adjuvans), odběr krve,
 - den 21 - 1. revakcinace MAP s 50% FIA (Freundovo inkompletní adjuvans),
 - 15 • den 28 - odběr krve,
 - den 62 - 2. revakcinace MAP s 50% FIA,

Sběr vajec od 35. dne.

20

Detekce imunitní odpovědi

- 25 Přítomnost specifické imunitní odpovědi na aplikaci inaktivovaných bakterií MAP byla sledována v séru kuřic, později slepic a ve vodné frakci žloutků od nich pocházejících metodou ELISA (capture ELISA), a to pomocí celých inaktivovaných bakterií MAP adherovaných na povrch polystyrenových mikroploten.

Příprava séra kuřic, později slepic

- 30 Od kuřic, později slepic byla odebírána krev z křídla (*vena cutanea ulnaris*) v množství cca 2 ml do zkumavek. Krev byla po odběru ponechána 2 hodiny při pokojové teplotě a následně centrifugována 15 minut při 1500 otáčkách za minutu a sérum bylo staženo do zkumavek typu Eppendorf. Vzorky byly uschovány v mrazničce při teplotě -20 °C.

Příprava vodné frakce žloutků

- 35 Jeden gram žloutku se smíchal s 10 ml destilované vody, směs byla homogenizována šleháním a ponechána 12 hodin v teplotě 4 °C. Poté byla směs centrifugována 30 min při 3500 otáčkách za minutu. Supernatant s obsahem IgY byl pro vyšetření ELISA testem uschován v chladničce, poté uchováván v mrazničce při teplotě -20 °C.
- 40

Vlastní postup ELISA testu

- 45 • vazba antigenu - antigen MAP 7072 v koncentraci 1×10^6 /ml ve vazném karbonátovém pufru pH 9,6; 100 μ l / jamku, vazba 16 hodin, při teplotě 4-8 °C, desky Maxisorp (Nunc),
- 5 \times promytí PBS + 0,05% Tween 20,
 - blokace 30 min 0,5% kasein + 10% sacharóza,
 - 50 • vyředění kontrol a vzorků – vyšetřované vzorky krevního séra a vodné frakce žloutků a kontroly ředěné 100 \times a dále 3kově v ředícím roztoku – PBS + 0,05% Tween 20 + 0,5% kaseinový hydrolyzát,
 - 55 • inkubace 60 min při pokojové teplotě,

- 5× promytí v PBS + 0,05% Tween 20,
- konjugát anti-chicken IgY s křenovou peroxidázou (Bethyl) ředěný 20.000× v PBS + Tween 20 + kaseinový hydrolyzát, po 100 µl /jamku, 60 min pokojová teplota,
- 5× promytí v PBS + 0,05% Tween 20,
- aplikace substrátu – TMB Test-line po 100 µl /jamku, doba působení 0 až 30 min,
- stop 2M H₂SO₄ 50 µl/jamku,
- měření při 450 nm.

Výsledky ELISA:

U imunizovaných zvířat došlo v séru i ve vodné frakci žloutků k výraznému vzestupu hladiny protilátek proti MAP doloženému 28., resp. 35. den po začátku imunizace (tabulka 1).

Tabulka 1 Hladiny protilátek pro MAP v séru a vodné frakci žloutku kuřic, resp. slepic imunizovaných MAP stanovených ELISA testem (absorbance)

Ředění	Slepý vzorek	Sérum				Vodná frakce žloutku	
		Směsný vzorek den 0	Zvíře 1 den 28	Zvíře 2 den 28	Zvíře 3 den 28	Směsný vzorek den 0	Směsný vzorek den 35
100x	0,050	0,131	2,082	1,720	2,110	0,116	2,027
300x	0,046	0,073	2,021	1,572	1,931	0,069	1,736
1000x	0,046	0,060	1,694	1,505	1,756	0,062	1,525
3000x	0,047	0,052	1,622	1,313	1,334	0,052	1,170

- Na základě výsledků ELISA testů bylo zvoleno období sběru vajec s vysokým obsahem protilátek od 35. dne, tj. 14 dní po 1. revakcinaci.

Příprava a sušení vaječné melanže

- Vaječná hmota byla připravena homogenizací vaječných obsahů (bílek + žloutek). Před samotnou homogenizací byla odstraněna vaječná poutka (chalázie) filtrací přes gázu. Vaječná melanž byla následně zmrazena. Později byly homogenáty různými způsoby sušeny nebo lyofilizovány:
- melanž smíchána 1:1 s mikrocelulózou a fluidně sušena vzduchem,
 - melanž smíchána 1:1 s mikrocelulózou a sušena vakuem,
 - sprejové sušení 155 °C / 65 °C (teplota vzduchu / teplota produktu),
 - sprejové sušení 170 °C / 70 °C,
 - sprejové sušení 180 °C / 75 °C,

- sprejové sušení 200 °C / 80 °C,
 - lyofilizace.
- 5 Vliv sušení na zachování funkce specifických protilátek byl ověřen pomocí výše popsané metody ELISA. Z výsledků uvedených v tabulce 2 je patrné, že různé postupy sušení vaječné hmoty nemají zásadní vliv na výsledné množství protilátek a lze proto použít kterýkoli z uvedených způsobů.
- 10 Tabulka 2 Hladiny protilátek proti MAP ve vaječné melanži při různých způsobech jejího sušení a lyofilizaci stanovených ELISA testem (absorbance)

Ředění	Melanž s celulózą 1:1, fluidní sušení ¹		Sprejové sušení				Lyofilizace	Nativní melanž	Slepý vzorek
	Vzduch	Vakuum	155/65°C	170/70°C	180/75°C	200/80°C			
100x	1,577	1,536	1,455	1,507	1,359	1,471	1,438	1,540	0,065
300x	1,208	1,177	1,232	1,259	1,160	1,419	1,295	1,502	0,058
1000x	0,810	0,771	0,834	0,842	0,793	0,985	0,902	0,967	0,050
3000x	0,396	0,410	0,424	0,493	0,409	0,519	0,518	0,579	0,048

¹ dvojitá navážka

15

Testování protizánětlivých účinků vaječné melanže

Protizánětlivé účinky vaječné melanže byly testovány *in vitro* na modelu prasečích makrofágů derivovaných z monocytů stimulovaných lipopolysacharidem. Monocyty byly z periferní krve tří prasat získány na základě jejich schopnosti adherovat k plastovým povrchům. Po 6denní derivaci byly makrofágy vystaveny účinku 4 různých koncentrací vaječné melanže a následně stimulovány 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 uvedených v tabulce 3, které jsou relativizovány k reakci kontrolních buněk neošetřených melanží, je patrný tlumivý efekt vaječné melanže na zánětlivou odpověď, a to v závislosti na dávce, resp. její koncentraci.

30 Tabulka 3 Relativní exprese mRNA (%) pro TNF-alfa, IL-1beta a IL-8 jako odpověď makrofágů derivovaných z monocytů po stimulaci lipopolysacharidem po předchozím ošetření 4 koncentracemi vaječné melanže

	Koncentrace vaječné melanže (%)	Prase 1	Prase 2	Prase 3	Průměr
TNF	0	100	100	100	100
	0,02	105	98	101,9	101,6
	0,2	90	56,7	82,7	76,5
	2	60	63,2	64,6	62,6
	20	58,2	51	46	51,7
IL1	0	100	100	100	100
	0,02	103,1	113,8	102,6	106,5
	0,2	93	96,6	94,6	94,7
	2	87,6	73	67,8	76,1
	20	56,9	66,1	62	61,7
IL8	0	100	100	100	100

	0,02	108,7	96,1	88,1	97,6
	0,2	82,4	92,4	83,9	86,2
	2	79,8	77,1	84,3	80,4
	20	66,9	72,4	59,2	66,2

Skupiny dieteticko-nutričních přípravků

Byly připraveny dvě skupiny dieteticko-nutričních přípravků s vaječnou melanží obsahující specifické IgY protilátky proti MAP:

Skupina 1 Přípravky představující specificky obohacená krmiva

Přípravek 1 Sušené kolostrum s vaječnou melanží

Sprejově sušená (100%) vaječná melanž obsahující specifické IgY protilátky byla mechanicky přimíchána do komerčně vyráběného sušeného kolostra v objemu 10 % celkového hmotnostního objemu přípravku.

Přípravek 2 Sušená mléčná krmná směs s vaječnou melanží

Sprejově sušená (100%) vaječná melanž obsahující specifické IgY protilátky byla mechanicky přimíchána do komerčně vyráběné sušené mléčné krmné směsi v objemu 10 % celkového hmotnostního objemu přípravku.

Skupina 2 Přípravek představující koncentrát

Přípravek 3 Sprejově sušená vaječná melanž

Sprejově sušená (100%) vaječná melanž s obsahem specifických IgY protilátek proti MAP.

Přípravek 4 Fluidně sušená vaječná melanž

Fluidně vzduchem sušená vaječná melanž s obsahem specifických IgY protilátek proti MAP. Složení: Fluidně sušená vaječná melanž (50 % hmotnostních, mikrocelulóza (50 % hmotnostních).

NÁROKY NA OCHRANU

1. Veterinární dieteticko-nutriční přípravek pro zvýšení specifické odolnosti zvířat proti infekci původcem paratuberkulózy, **vyznačený tým**, že obsahuje vaječnou hmotu obsahující specifické IgY protilátky proti *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, přičemž vaječná hmotu tvoří 0,1 až 100 % hmotnostních přípravku.

2. Veterinární dieteticko-nutriční přípravek podle nároku 1, **vyznačený tým**, že je ve formě vybrané z krmiva fortifikovaného vaječnou hmotou, přísady do krmiva, dietetického přípravku, dietetického koncentrátu, kolostra fortifikovaného vaječnou hmotou, náhražky kolostra fortifikované vaječnou hmotou, mléka fortifikovaného vaječnou hmotou, mléčné krmné směsi fortifikované vaječnou hmotou.

3. Veterinární dieteticko-nutriční přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tým**, že vaječná hmotu je ve formě homogenizovaného celého obsahu slepičího vejce, nebo vysušeného nebo lyofilizovaného homogenizovaného celého obsahu slepičího vejce.

4. Veterinární dieteticko-nutriční přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že vaječná hmota obsahující specifické IgY protilátky proti *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* je připravitelná imunizací slepic bakterií *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, s výhodou alespoň dvěma imunizacemi slepic uvedenou bakterií; a následným zpracováním vajec těchto slepic homogenizací a popřípadě i sušením či lyofilizací.
5. Veterinární dieteticko-nutriční přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že vaječná hmota tvoří 1 až 15 % hmotnostních přípravku.
6. Veterinární dieteticko-nutriční přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že dále obsahuje složky vybrané ze skupiny zahrnující přísady podporující ochranu a regeneraci střeva, vitamíny, minerály, antimikrobika, probiotika, prebiotika a farmaceuticky a/nebo potravinářsky přijatelné pomocné látky.
7. Veterinární dieteticko-nutriční přípravek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že je ve formě prášku, granulátu, pasty nebo emulze.