



PROTOTYP

**Veterinární léčebný přípravek na bázi protilátek IgY
pro léčbu mastitid dojného skotu**

Mgr. Hana Štěpánová, Ph.D.
Mgr. Karolina Hlavová, Ph.D.
Mgr. Šárka Kobzová
MVDr. Katarína Matiašková, Ph.D.
Mgr. Adam Norek, Ph.D.

3273
2023

Prototyp 3273/2023

**Veterinární léčebný přípravek na bázi protilátek IgY pro léčbu
mastitid dojného skotu**

Mgr. Hana Štěpánová, Ph.D.

Mgr. Karolina Hlavová, Ph.D.

Mgr. Šárka Kobzová

MVDr. Katarína Matiašková, Ph.D.

Mgr. Adam Norek, Ph.D.

ISBN 978-80-7672-036-7

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu s názvem „Veterinární léčebný přípravek na bázi obohacení protilátkami IgY“, registrační číslo CZ.01.1.02/0.0/0.0/20_321/0024962, který je spolufinancován Ministerstvem průmyslu a obchodu jako řídicí orgán Operačního programu Podnikání a inovace pro konkurenceschopnost.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i. Hudcova 70 62100 BRNO	Druh dokumentace: Popis technického řešení prototypu	Verze: 01 Strana: 2/8 Počet příloh: 0		
Výtisk č.1		Účinnost od:		
<p>Název dokumentace:</p> <p>Veterinární léčebný přípravek na bázi protilátek IgY pro léčbu mastitid dojného skotu</p> <p>Popis technického řešení prototypu</p>				
Evidence o převzaté dokumentaci				
Číslo výtisku	Funkce	Jméno	Datum	Podpis
1				
2				
3				
4				
5				
Evidence o seznámení s dokumentací				
	Funkce	Jméno	Datum	Podpis
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
Rozsah působnosti: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.	Zpracoval: Hana Štěpánová Karolina Hlavová Šárka Kobzová Katarina Matiašková Adam Norek	Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.	Schválil:	

Obsah

1. Úvod.....	4
2. Oblast techniky	6
3. Aktuální stav techniky (diagnostiky)	6
4. Popis technického řešení a nároků na ochranu	6
5. Nároky na ochranu	7
6. Vysvětlení nároků na ochranu	8
7. Seznam materiálů.....	8

1. Úvod

Záněty mléčné žlázy skotu (mastitidy) jsou nejvýznamnějším zdravotním i ekonomickým problémem moderních chovů mléčného skotu; snižují produkci mléka, jeho kvalitu, vyřazují předčasně dojnice z chovu. *Streptococcus uberis* je jedním z nejčastěji izolovaných původců mastitid. *S. uberis* řadíme mezi environmentální streptokoky, vyskytuje se všude v prostředí stájí i na pastvě. Kmeny *S. uberis* se vyznačují velkou genetickou variabilitou, některé kmeny jsou schopny perzistovat v mléčné žláze a způsobovat chronické infekce (Phuektes et al. 2001). K infekci mléčné žlázy dochází nejčastěji v období stání na sucho (cca 60 %), s následným propuknutím klinické mastitidy v následující laktaci (Kromker et al. 2014).

K léčbě intramamárních infekcí způsobených *S. uberis* je doporučováno použití penicilinů, protože streptokoky jsou známy svou dobrou citlivostí k penicilinům (Bradley 2002, Käppeli et al. 2019). Vzhledem k tomu, že některé kmeny jsou multirezistentní vůči všem běžně dostupným antibiotikům, vzrůstá potřeba nalezení možných alternativ k antibiotické léčbě, které by se mohly stát součástí běžné veterinární praxe. Hledání alternativních přípravků k léčbě i prevenci zánětů mléčné žlázy dojného skotu je i v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/6 o veterinárních léčivých přípravcích, které mimo jiné přináší významné restrikce pro preventivní použití antimikrobiálních látek.

Jednou z možných alternativ antibiotických preparátů je využití specifických protilátek. Vhodným zdrojem mohou být protilátky IgY z vaječného žloutku. Protilátky jsou koncentrovány ve vaječných žloutcích, do nichž přestupují z krevního séra nosnic v průběhu ovogeneze (Mohammed et al., 1998). Tyto protilátky svojí strukturou i biologickou funkcí odpovídají imunoglobulinům savců izotypu IgG. Protilátky IgY v biologických systémech působí jako neutralizační protilátky, které oddělují adhezivní molekuly patogenních mikroorganismů od jejich receptorů na povrchu cílových buněk a tímto způsobem zabraňují infekci. Takto neutralizované mikroorganismy jsou snadno vyloučeny přirozenými bariérovými mechanismy (Akita a Nakai, 1993). Protilátky třídy IgY mají ve srovnání se savčími protilátkami při použití k pasivní imunoterapii řadu výhod. Jejich administrace nevede k rozvoji adaptivní imunitní odpovědi proti IgY (Nilsson a kol., 2007) a IgY neaktivují savčí komplement (Kovaacs-Nolan a Mine, 2012).

Pro léčbu mastitid byly již testovány IgY specifické vůči *Staphylococcus aureus* (Zhen et al, 2016), což podporuje možné využití protilátek z vaječných žloutků jako alternativní terapii i proti dalšímu původci bovinní mastitidy – *S. uberis*.

Literatura:

1. Akita, E.M., Nakai, S.: Production and purification of Fab fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). *J. Immunol. Methods*, 1993, 162:155-164.
2. Bradley, A.J. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J* 164:116–28.
3. Käppeli, N., Morach, M., Zurfluh, K., Corti, S., Nüesch-Inderbinen, M., Stephan, R. 2019.
4. Kovacs-Nolan, J., Mine, Y.: Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2012; 3:163-182.
5. Kromker, V., Reinecke, F., Paduch, J.H., Grabowski, N. 2014. Bovine *Streptococcus uberis* Intramammary Infections and Mastitis. *Clin Microbiol* 3:157
6. Mohammed, S.M., Morrison, S., Wims, L., Trinh, K.R., Wildeman, A.G., Bonselaar, J., Etches, RJ. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology*, 1998, 4:115-125.
7. Nilsson, E., Kollberg, H., Johannesson, M., Wejåker, P.E., Carlander, D., Larsson, A.: More than 10 years' continuous oral treatment with specific immunoglobulin Y for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a case report. *J. Med. Food.* 2007; 10:375-378.
8. Phuektes, P., Mansell, P.D., Dyson, R.S., Hooper, N.D., Dick, J.S. 2001. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. *J Clin Microbiol* 39:1460-1466.
9. Zhen YH, Jin LJ, Li XY, Guo J, Li Z, Zhang BJ, Fang R, Xu YP, 2009. Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol.* 133(4):317-22.

2. Oblast techniky

Předkládané technické řešení poskytuje přípravek, který je alternativou k antibiotické léčbě mastitid dojného skotu.

3. Aktuální stav techniky (léčby)

Záněty mléčné žlázy skotu (mastitidy) jsou nejvýznamnějším zdravotním i ekonomickým problémem moderních chovů mléčného skotu; snižují produkci mléka, jeho kvalitu, vyřazují předčasně dojnice z chovu. *Streptococcus uberis* (dále jen *S. uberis*) je jedním z nejčastěji izolovaných původců mastitid se subklinickými i klinickými projevy u dojnic během laktace i v době zasušení. Aplikace lokálních nebo celkových antibiotik je první volbou při terapii mastitid, k léčbě je doporučováno zejména použití penicilinů. V poslední době byl zaznamenaný viditelný pokles citlivosti izolátů *S. uberis* k penicilinu, ale i jiným antimikrobiálním látkám. Vzhledem k tomu, že některé kmeny jsou multirezistentní vůči všem běžně dostupným antibiotikům, vzrůstá potřeba nalezení možných alternativ k antibiotické léčbě, které by se mohly stát součástí běžné veterinární praxe. Hledání alternativních přípravků k léčbě i prevenci zánětů mléčné žlázy dojného skotu je i v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/6 o veterinárních léčivých přípravcích, které mimo jiné přináší významné restriktce pro preventivní použití antimikrobiálních látek.

4. Popis technického řešení a nároků na ochranu

Předkládané technické řešení poskytuje veterinární přípravek pro léčbu mastitid dojného skotu, který je možno aplikovat lokálně, tj. do mléčné žlázy přes strukový kanálek (intramamární podání).

Tento léčebný přípravek obsahuje specifické protilátky třídy IgY proti *Streptococcus uberis* izolované ze žloutků vajec získaných od nosnic imunizovaných inaktivovaným antigenem *S. uberis*.

Léčebný přípravek je specifikován jedinečnými parametry, které umožňují jeho využití v oblasti veterinární medicíny, jako alternativy k antibiotické léčbě. Zvolené řešení je unikátní v následujících položkách:

- **Obsahuje protilátky třídy IgY specifické proti *S. uberis***

Tento léčebný přípravek obsahuje specifické IgY protilátky proti *Streptococcus uberis* izolované ze žloutků vajec získaných od nosnic imunizovaných antigenem *S. uberis* inaktivovaným pomocí formaldehydu. Žloutky oddělené od bílků se smíchají s destilovanou vodou, homogenizovaná směs je ponechána přibližně 12 hodin v lednici a poté centrifugována. Z takto získané vodní frakce je izolovaná složka s obsahem protilátek IgY pomocí srážení síranem amonným s následnou dialýzou. Přečištěná frakce protilátek IgY je dlouhodobě stabilní při skladování v mrazničce při teplotě minimálně - 20 °C.

- **Aplikační forma je určena k lokálnímu použití**

Veterinární přípravek je určený pro lokální aplikaci, tj. do mléčné žlázy přes strukový kanálek. Protilátky IgY izolované ze žloutků vajec od slepic imunizovaných *S. uberis* jsou formulovány v podobě sterilního transparentního gelu naplněného do intramamárního aplikátoru. Základní komponentou nosného gelu je alginát sodný, jež je k polymeraci přiveden směsí glukonolaktonu s CaCO₃ o vhodné koncentraci. Objem jedné dávky je 10 ml.

5. Nároky na ochranu

- 1) Veterinární přípravek pro léčbu mastitid dojného skotu, vyznačující se tím, že obsahuje IgY protilátky proti *Streptococcus uberis* izolované ze žloutků vajec získaných od nosnic imunizovaných inaktivovaným antigenem *Streptococcus uberis*.
- 2) Aplikační formou přípravku pro léčbu mastitid dojného skotu je intramamární aplikátor obsahující přípravek ve formě gelu.

6. Vysvětlení nároků na ochranu

Ad1) Jedná se o unikátní léčebný přípravek obsahující účinnou složku, která dosud nebyla použita, byla originálně navržena a testována v laboratořích Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v. v. i..

Ad2) Léčebný veterinární přípravek je určený k lokální aplikaci, tj. do mléčné žlázy přes strukový kanálek (intramamární podání). Přípravek je formulován jako gel, gelujícími složkami a gelačními činidly jsou alginát sodný, chitosan a CaCO₃.

7. Seznam materiálu

- Účinná složka: přečištěné IgY protilátky ve fyziologickém roztoku proti *Streptococcus uberis* izolované ze žloutků vajec získaných od nosnic imunizovaných inaktivovaným antigenem *S. uberis*.
- Pomocná složka: nosný gel, jehož základní komponentou je alginát sodný.
- Plastový intramamární aplikátor

Vývoj prototypu léčebného veterinárního přípravku probíhal v rámci řešení projektu s názvem „Veterinární léčebný přípravek na bázi obohacení protilátkami IgY“, registrační číslo CZ.01.1.02/0.0/0.0/20_321/0024962, který je spolufinancován Ministerstvem průmyslu a obchodu jako řídicí orgán Operačního programu Podnikání a inovace pro konkurenceschopnost.

Toto technické řešení je chráněno přihláškou užitného vzoru číslo PUV 2023-41001.

VU^{Ve}L 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz