

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

308 101

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
A23K 20/00 (2016.01)
A23K 50/75 (2016.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-467**
(22) Přihlášeno: **11.09.2018**
(40) Zveřejněno: **02.01.2020**
(Věstník č. 1/2020)
(47) Uděleno: **20.11.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **02.01.2020**
(Věstník č. 1/2020)

(56) Relevantní dokumenty:

HUSAIN D. R. et al.: „Evaluation of bacteria from *Gallus domesticus* as a potential probiotic in broiler chicks: effects on growth performance and feed conversion ratio,“ *International Journal of Poultry Science*, vol. 16, 2017, str. 43 – 49, ISSN 1682-8356; BELKACEM B. et al.: „Probiotic potential of thermotolerant Lactobacilli isolated from chicken gastrointestinal digestive and their use as poultry feed,“ *World Applied Sciences Journal*, vol. 7, no. 8, 2009, str. 951 – 957, ISSN 1818-4952; LUO J. et al.: „Proteome changes in the intestinal mucosa of broiler (*Gallus gallus*) activated by probiotic *Enterococcus faecium*,“ *Journal of Proteomics*, vol. 91, 2013, str. 226 – 241, ISSN 1874-3919; FILHO R. A. C. P. et al.: „Immunomodulatory activity and control of *Salmonella enteritidis* colonization in the intestinal tract of chickens by *Lactobacillus* based probiotic,“ *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 167, no. 1-2, 2015, str. 64 – 69, ISSN 0165-2427.
CN 104711210; CN 103750027.

(73) Majitel patentů:

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

(72) Původce:

doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D., Velešovice, CZ
MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D., Velešovice, CZ
MVDr. Jitka Matiašovicová, Ph.D., Hostěnice, CZ
Mgr. Tereza Kubasová, Ph.D., Janová, CZ
Mgr. Alena Šebková, Brno, Žabovřesky, CZ
Ing. Daniela Karasová, Ph.D., Brno, Žabovřesky,
CZ
Mgr. Magdaléna Crhánová, Ph.D., Brno, Stránice,
CZ
prof. MVDr. Alois Čížek, CSc., Brno, Židenice, CZ

(74) Zástupce:

HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:

**Probiotický kmen *Bacteroides dorei* CAPM
6631 pro použití pro zlepšení fyziologických
vlastností trávicího traktu drůbeže *Gallus
gallus***

(57) Anotace:

Předkládané řešení poskytuje použití bakteriálního kmene
B. dorei CAPM 6631 s probiotickými vlastnostmi pro
prevenci infekcí trávicího traktu drůbeže patogeny a
tlumení zánětlivé reakce.

Probiotický kmen *Bacteroides dorei* CAPM 6631 pro použití pro zlepšení fyziologických vlastností trávicího traktu drůbeže *Gallus gallus*

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález poskytuje nástroj pro zlepšení fyziologických a imunitních vlastností trávicího traktu drůbeže *Gallus gallus* prostřednictvím osídlení bakterií *Bacteroides dorei* CAPM 6631.

10

Dosavadní stav techniky

Střevní mikroflóra podstatným způsobem ovlivňuje a charakterizuje zdravotní stav hostitele. Střevní mikroflóra každého jedince sestává z přibližně 1000 různých bakteriálních druhů a asi desetkrát více bakteriálních klonů a izolátů. Střevní mikroflóra teplokrevných zvířat sestává zejména z bakterií náležících mezi Gram pozitivní *Firmicutes* a Gram negativní *Bacteroidetes*. Minoritní bakterie kolonizující trávicí trakt pochází z kmenů *Actinobacteria* a *Proteobacteria*. U hrabavé drůbeže se jako probiotické preparáty nejčastěji používají laktobacily (patří mezi *Firmicutes*) a různí zástupci *Actinobacteria*. Experimenty původců tohoto vynálezu však ověřily, že podání čistých kultur laktobacilů nebo *Actinobacteria* jednodenním kuřatům vůbec nevede k jejich usídlení v trávicím traktu kuřat. Identifikovat jednotlivé bakterie schopné účinně kolonizovat trávicí trakt drůbeže mezi desítkami tisíc variant je tedy velmi složitý úkol a prostá znalost bakterií přítomných ve střevní mikroflóře drůbeže nebo lidí neposkytuje vůbec žádnou užitečnou informaci ohledně jejich vhodnosti pro osídlování trávicího traktu kuřat v prvních dnech života.

Prvním předpokladem pro řešení tohoto problému je získání potenciálních probiotických bakterií v čistých kulturách. Původci tohoto vynálezu získali a popsali bakteriální biom imunologicky relevantních částí trávicího traktu kuřat, včetně kmene *B. dorei* An41 (CAPM 6631) (Medvecký M, Cejková D, Polansky O, Karasová D, Kubasová T, Cizek A, Rychlík I. Whole genome sequencing and function prediction of 133 gut anaerobes isolated from chicken caecum in pure cultures. BMC Genomics 2018;19:561). Samotné získání bakterií a poznání jejich genomů však není dostatečným podkladem pro předpověď schopnosti dané bakterie kolonizovat trávicí trakt drůbeže, tlumit zánět a současně nemít žádné nežádoucí účinky. Žádnou z těchto vlastností ze znalostí sekvencí nelze vyčíst a nepomohou ani informace o tom, že se dané bakterie v trávicím traktu vyskytují.

Stále tedy je potřeba vyřešit problém identifikace vhodného bakteriálního kmene pro kolonizaci trávicího traktu drůbeže v prvních dnech či týdnech života, který by měl probiotické účinky, tlumil zánět a neměl žádné nežádoucí účinky.

45 Podstata vynálezu

V rámci předkládaného vynálezu bylo dále studováno 327 bakterií, které původci vynálezu izolovali z trávicího traktu kuřat a sekvenovali. Z nich pouze 24 účinně kolonizuje trávicí trakt drůbeže. Zajímavým zjištěním je, že mezi těmito 24 bakteriemi není jediný zástupce rodu *Lactobacillus*, *Enterococcus* nebo *Bacillus*, které se dosud v chovech drůbeže používají jako probiotika, a ani jeden zástupce *Actinobacteria* (např. rod *Olsenella* nebo *Enorma*). Naproti tomu bylo zjištěno, že nejúčinněji ze všech testovaných izolátů trávicí trakt drůbeže kolonizoval *Bacteroides dorei* CAPM 6631. Po podání *B. dorei* CAPM 6631 jednodenním kuřatům tato bakterie tvořila více než 40 % z celkové střevní mikroflóry po sedmi dnech života a asi 30 % z celkové střevní mikroflóry 42. den života, což je více než délka života u masných typů drůbeže (brojlerů ve výkrmu). *B. dorei* CAPM 6631 nemá žádné negativní účinky, sám o sobě

55

nestimuluje zánět a naopak tlumí zánět ve slepém střevě kuřat po infekci *Salmonella* Enteritidis. Proto je velmi vhodný pro použití jako probiotický kmen u kuřat a má všechny požadované vlastnosti, takže účinně zlepšuje zdraví a fyziologické vlastnosti kuřat bez nežádoucích vedlejších účinků.

5

Předmětem předkládaného vynálezu je tedy kmen *Bacteroides dorei* CAPM 6631 pro použití jako probiotický preparát pro léčebné či preventivní zlepšení imunity a/nebo fyziologických vlastností střevního traktu drůbeže *Gallus gallus*. Zlepšení imunity a/nebo fyziologických vlastností s výhodou zahrnuje prevenci infekcí trávicího traktu drůbeže patogeny a tlumení zánětlivé reakce na tyto patogeny.

10

Dále je předmětem předkládaného vynálezu použití kmene *Bacteroides dorei* CAPM 6631 jako probiotického preparátu pro neléčebné zlepšení fyziologických vlastností střevního traktu drůbeže *Gallus gallus*.

15

Předmětem vynálezu je i probiotická kompozice pro zlepšení imunity a/nebo fyziologických vlastností střevního traktu drůbeže *Gallus gallus*, která obsahuje kmen *Bacteroides dorei* CAPM 6631 a alespoň jeden farmaceuticky přijatelný excipient.

20

Farmaceuticky přijatelné excipienty zahrnují sterilní ředící roztok nebo fyziologický roztok.

Probiotická kompozice je s výhodou ve formě pro orální podání. Kompozice výhodně obsahuje alespoň 10^9 CFU, výhodněji alespoň 10^7 CFU, bakterií *Bacteroides dorei* CAPM 6631.

25

Bakterie *B. dorei* CAPM 6631, která efektivně kolonizuje trávicí trakt drůbeže od prvního dne života, nemá žádné negativní účinky na osídlovaná kuřata a tlumí zánět indukovaný infekcí *Salmonella* Enteritidis.

30

Objasnění výkresů

Obr. 1 znázorňuje schopnost *B. dorei* CAPM 6631 kolonizovat slepé střevo drůbeže po jednorázové orální aplikaci. Jednotlivé sloupce představují procentuální zastoupení *B. dorei* CAPM 6631 v mikroflóře slepého střeva jednotlivých kuřat. Věk kuřat ve dnech je přibližně
35
zobrazen. Kuřata z deseti nezávislých opakování jsou oddělena prázdným sloupcem. Lze tedy vyčíst, že schopnost účinně kolonizovat není vázána na jeden náhodný experiment.

35

Obr. 2. Porovnání schopnosti *B. dorei* CAPM 6631 a ostatních vybraných izolátů z trávicího traktu drůbeže kolonizovat slepé střevo drůbeže.

40

Obr. 3. Schopnost laktobacilů a aktinobakterií osídlit trávicí trakt drůbeže v prvním týdnu života.

Obr. 4. Expresí znaků zánětu (ExFABP a MMP7) ve slepém střevě kontrolních kuřat a kuřat po osídlení *B. dorei* CAPM 6631. Osídlení slepého střeva bakterií *B. dorei* CAPM 6631 nevyvolává zánětlivou reakci.

45

Obr. 5. Expresí znaků zánětu (ExFABP a MMP7) ve slepém střevě kontrolních kuřat a kuřat po osídlení *B. dorei* CAPM 6631 a po následné infekci *Salmonella* Enteritidis. Mezi kontrolní a osídlenou skupinou byl zaznamenán signifikantní rozdíl v expresi ExFABP ($p=0,033$).

50

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Izolace

55

B. dorei CAPM 6631 byl izolován v říjnu 2015 z obsahu slepého střeva 15-týdenní kuřice. Kultivace byla provedena po desítkovém ředění obsahu slepého střeva ve sterilním ředícím roztoku (0,1 g síran hořečnatý heptahydrát, 0,2 g monobazický fosforečnan draselný, 0,2 g chlorid draselný, 1,15 g dibazický fosforečnan sodný, 3,0 g chlorid sodný, 1,0 g thioglykolát sodný, 0,5 g L-cystein, 1000 ml destilovaná voda, pH 7,5 při 25 °C). Po sterilizaci autoklávním byl roztok přenesen do anaerobního kabinetu na 24 hodin před použitím, aby se zbytkový kyslík v roztoku nahradil anaerobními plyny z anaerobního boxu. Jednotlivá ředění byla vyseta na WCHA agar (Oxoid). Inkubace probíhala v anaerobním kabinetu Concept 400 (Baker Ruskinn, USA) v anaerobní atmosféře sestávající se z 10 % CO₂, 5 % H₂ a 85 % N₂. Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 72 hodin. Z narostlých kolonií byl alikvot resuspendován v 1,0 ml BHI bujonu (Oxoid) s 10% glycerolem a zamražen při -70 °C pro další použití. Z jiného alikvotu byla izolována DNA, která byla využita pro stanovení kompletní sekvenace bakteriální DNA a následnou druhovou identifikaci (Medvecký M et al., BMC Genomics 2018;19:561).

15 Příklad 2: Podání *B. dorei* CAPM 6631 kuřatům

Kuřata byla první den života orálně inokulována 10⁷ CFU *B. dorei* CAPM 6631 v 0,1 ml sterilního ředícího roztoku. V časech specifikovaných níže byla kuřata utracena a bylo stanoveno složení bakteriální mikroflóry sekvenováním V3 a V4 variabilní oblasti genu pro 16S rRNA (Videnska P, Sedlar K, Lukac M, Faldynova M, Gerzova L, Cejkova D, Sisak F, Rychlik I.: Succession and replacement of bacterial populations in the caecum of egg laying hens over their whole life. PLoS One 2014;9:e115142). S využitím znalosti sekvence genu pro 16S rRNA jsme byli schopni detekovat a kvantifikovat *B. dorei* CAPM 6631 ve vzorcích osídlených a kontrolních neosídlených kuřat. Paralelně byly odebrány vzorky tkáně slepého střeva, ze kterých byla izolovaná RNA s využitím RNeasy Mini kitu dle instrukcí výrobce (Qiagen). Ta byla přepsána do cDNA s využitím oligo(dT) primerů. Získaná cDNA byla využita pro kvantifikace exprese genu pro matrix metalloproteinase 7 (MMP7) a extracellular fatty acid binding protein (ExFABP) pomocí SybrGreen real time PCR dle instrukcí výrobce (Qiagen). Expresy těchto genů byla normalizována na průměrnou expresi genů GAPDH, UB a TBP (jak je popsáno např. v PV 2015-753 nebo v publikaci Varmuzova K, Faldynova M, Elsheimer-Matulova M, Sebkova A, Polansky O, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I. Immune protection of chickens conferred by a vaccine consisting of attenuated strains of *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium and Infantis. Vet Res 2016;47:94).

35 Příklad 3: Kolonizační vlastnosti *B. dorei* CAPM 6631

B. dorei CAPM 6631 jsme použili k osídlení kuřat první den života (jak je popsáno v Příkladu 2) v deseti nezávislých experimentech a ve věku 2, 7, 11, 15, 19, 25, 29, 40 nebo 43 dní byla stanovena skladba střevní mikroflóry v slepém střevě pomocí sekvenování genů pro 16S rRNA (Videnska P et al., PLoS One 2014;9:e115142). Celkem bylo osídleno 192 kuřat. *B. dorei* CAPM 6631 v průměru tvořil 39,47 % z celkové mikroflóry a i u 40- a 43-denních kuřat tvořil *B. dorei* CAPM 6631 mezi 20 až 35 % z celkové populace slepého střeva (Obr. 1). Protože doba výkrmu brojlerů se pohybuje okolo 35 dnů, tato bakterie účinně kolonizuje trávicí trakt drůbeže po celé období výkrmu.

Identické experimenty s osídlováním jednodenních kuřat jsme prováděli s ostatními bakteriálními izoláty, které jsme měli k dispozici (Medvecký M et al., BMC Genomics 2018;19:561). Ze srovnání kolonizačních vlastností *B. dorei* CAPM 6631 a ostatních bakterií lze vidět, že *B. dorei* CAPM 6631 kolonizoval slepé střevo kuřat výrazně nejlépe ze všech srovnávaných bakterií (Obr. 2). Běžně používané kmeny laktobacilů a aktinobakterií pak trávicí trakt drůbeže vůbec nekolonizovaly. *Olsenella*, *Enorma* a *Gordonibacter* patří mezi *Actinobacteria* a tyto bakterie týden po orální administraci nebyly v trávicím traktu kuřat detekovány (Obr. 3). *Lactobacillus reuteri*, *L. coleohominis*, *L. aviarius* a *L. gasseri* rovněž téměř neosídlovali trávicí trakt drůbeže. *L. salivarius* a *L. gallinarum* byl zachycován v trávicím traktu drůbeže, avšak vždy se jednalo o přirozenou kolonizaci kuřat bakteriemi z prostředí (šedé sloupce a označení „Kont“, zastoupení

těchto bakteriálních druhů u kontrolních kuřat, kterým nebyl podán žádný preparát) bez dodatečného vlivu experimentálního podání těchto druhů laktobacilů (Obr. 3). Schopnost osídlit trávicí trakt drůbeže tak není triviální záležitostí a běžně podávaná probiotika trávicí trakt nekolonizují.

5

Příklad 4: Průkaz nepatogenní povahy *B. dorei* CAPM 6631

Celkem 159 kuřat bylo první den života osídleno *B. dorei* CAPM 6631. Dalších 84 neosídlených kuřat bylo použito jako negativní kontrola. Po sedmi dnech byla kuřata utrácena a byla stanovena exprese ExFABP a MMP7 genů ve tkáni slepého střeva (Varmuzova K et al., Vet Res 2016;47:94, nebo patentová přihláška PV 2015-753), přičemž zvýšená exprese ExFABP nebo MMP7 genů je znakem zánětlivé reakce. Mezi kontrolní a osídlenou skupinou nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v expresi ExFABP nebo MMP7. Osídlení slepého střeva vysokými počty bakterie *B. dorei* CAPM 6631 proto nemá negativní vliv na funkci střevního traktu a *B. dorei* CAPM 6631 nevyvolává zánět ve střevě (Obr. 4).

10

15

Příklad 5: Protizánětlivý účinek *B. dorei* CAPM 6631 po infekci kuřat *S. Enteritidis*

Celkem 87 kuřat bylo první den života osídleno *B. dorei* CAPM 6631. Čtyřicet sedm neosídlených kuřat sloužilo jako negativní kontrola. Osmý den života byla všechna kuřata orálně infikována 10^7 CFU plně virulentního kmene *Salmonella* Enteritidis 147 a 4 dny po infekci byla stanovena exprese znaků zánětu (ExFABP a MMP7) ve slepém střevě pomocí real time PCR (Varmuzova K et al., Vet Res 2016;47:94, nebo patentová přihláška PV 2015-753). Mezi kontrolní a osídlenou skupinou byl zaznamenán signifikantní rozdíl v expresi ExFABP ($p=0,033$). Osídlení slepého střeva bakterií *B. dorei* CAPM 6631 tedy signifikantně snižovalo zánětlivou odpověď kuřat na infekci salmonelami (Obr. 5).

20

25

Závěry

B. dorei CAPM 6631 účinně osídluje slepé střevo kuřat od prvního dne života a po jednorázové administraci přetrvává ve slepém střevě minimálně do 43. dne života, což je více než délka života u masných typů drůbeže ve výkrmu. *B. dorei* CAPM 6631 nemá žádné negativní účinky, po jeho podání nebyly zaznamenány žádné úhyny a nedošlo ani ke stimulaci zánětu ve slepém střevě. *B. dorei* CAPM 6631 naopak tlumí projevy zánětu vyvolané ve slepém střevě infekcí bakterií *Salmonella* Enteritidis. Proto se dá s výhodou použít jako probiotický kmen u kuřat.

30

35

PATENTOVÉ NÁROKY

40

1. Kmen *Bacteroides dorei* uložený ve Sbírce zoopatogenních mikroorganismů, CAPM, pod číslem 6631 pro použití jako probiotický preparát pro léčebné a/nebo preventivní zlepšení imunity a/nebo fyziologických vlastností střevního traktu drůbeže *Gallus gallus*.

45

2. Kmen *Bacteroides dorei* CAPM 6631 pro použití podle nároku 1, kde zlepšení imunity a/nebo fyziologických vlastností zahrnuje prevenci infekcí trávicího traktu drůbeže patogeny a tlumení zánětlivé reakce na tyto patogeny.

50

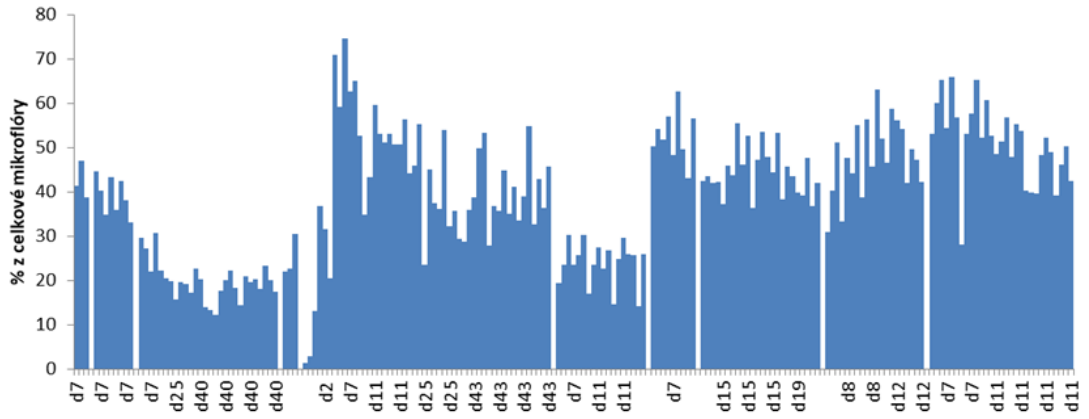
3. Použití kmene *Bacteroides dorei* CAPM 6631 jako probiotického preparátu pro neléčebné zlepšení fyziologických vlastností střevního traktu drůbeže *Gallus gallus*.

55

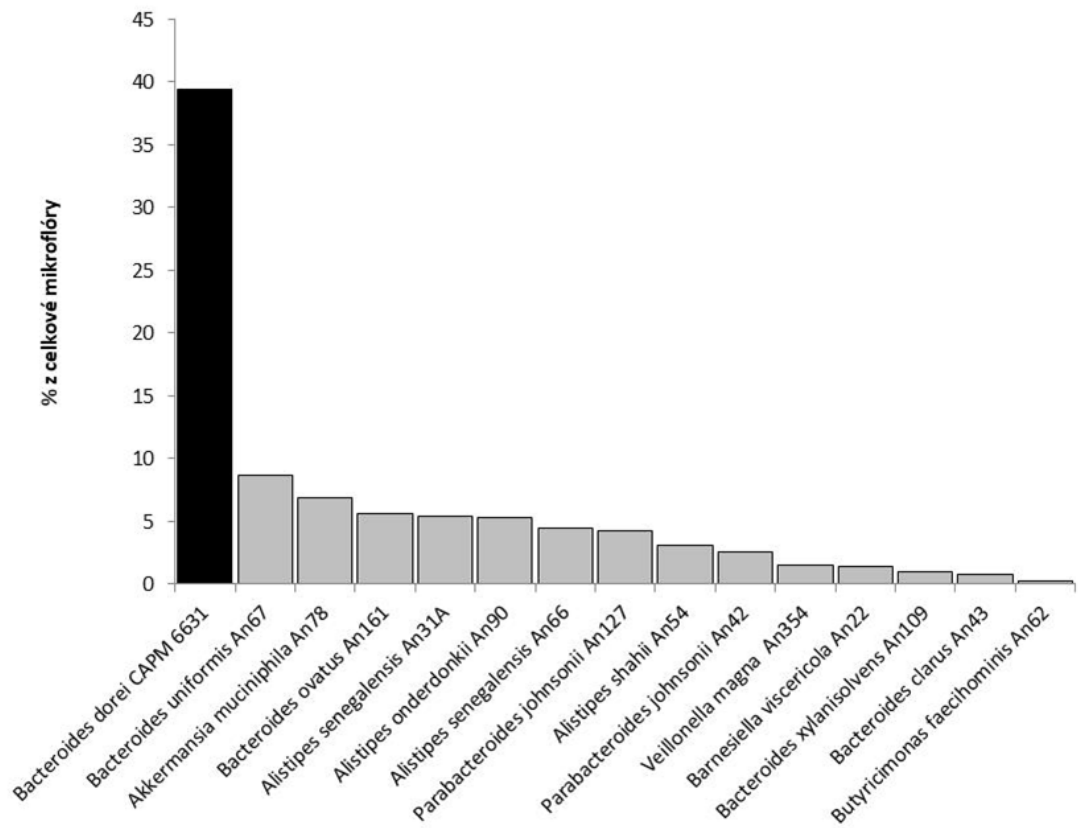
4. Probiotická kompozice pro zlepšení imunity a/nebo fyziologických vlastností střevního traktu drůbeže *Gallus gallus*, **vyznačená tím**, že obsahuje kmen *Bacteroides dorei* CAPM 6631 a alespoň jeden farmaceuticky přijatelný excipient.

5. Probiotická kompozice podle nároku 4, **vyznačená tím**, že farmaceuticky přijatelný excipient je vybrán ze skupiny zahrnující sterilní ředící roztok nebo fyziologický roztok.

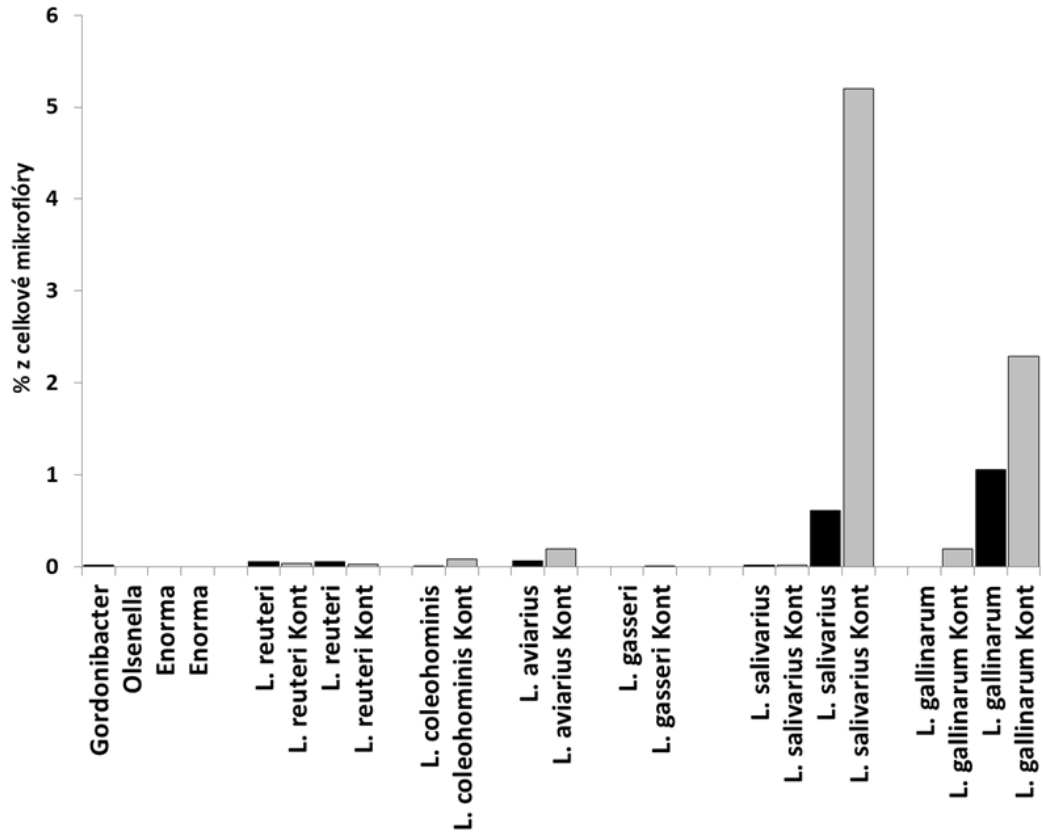
3 výkresy



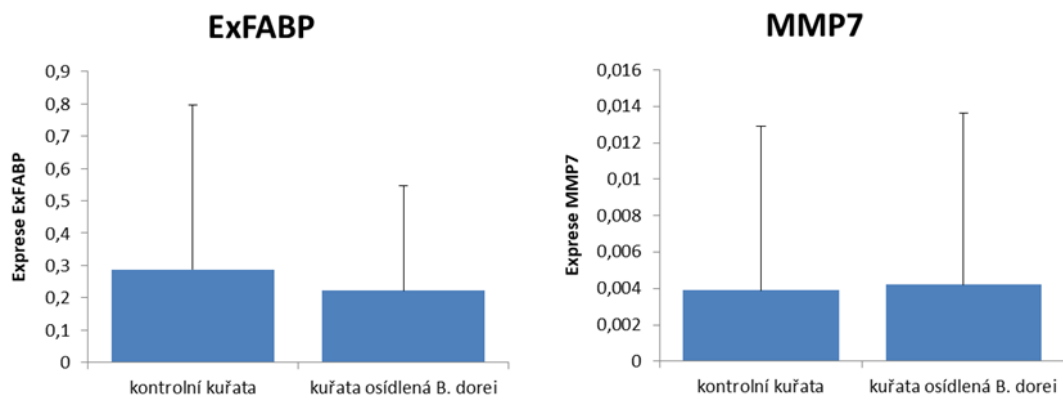
Obr. 1



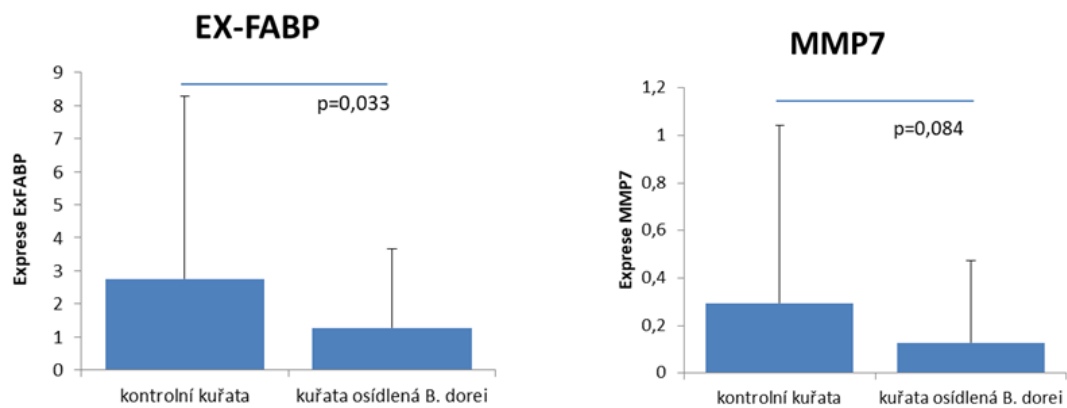
Obr. 2



Obr. 3.



Obr. 4.



Obr. 5