UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:
35 185

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:
A61K 35/741 (2015.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2021-38747**
(22) Přihlášeno: **20.04.2021**
(47) Zapsáno: **22.06.2021**

(73) Majitel:
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
Mgr. Tereza Kubasová, Ph.D., Janová, CZ
MVDr. Jiří Volf, Ph.D., Brno, Řečkovice, CZ
Mgr. Helena Juřicová, Ph.D., Brno, Královo Pole, CZ
MVDr. Jitka Matiašovicová, Ph.D., Hostěnice, CZ
Ing. Daniela Karasová, Ph.D., Brno, Žabovřesky, CZ
Mgr. Magdaléna Crhánová, Ph.D., Brno, Stránice, CZ
Mgr. Alena Šebková, Brno, Žabovřesky, CZ
Mgr. Zuzana Seidlerová, Ph.D., 01009 Žilina, SK
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 užitného vzoru:
Probiotický přípravek pro drůbež

CZ 35185 U1

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitného vzoru splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

Probiotický přípravek pro drůbež

Oblast techniky

Předkládané technické řešení poskytuje probiotický přípravek pro zlepšení fyziologických a imunitních vlastností trávicího traktu drůbeže *Gallus gallus* prostřednictvím osídlení směsí probiotických baktérií.

Dosavadní stav techniky

Střevní mikroflóra podstatným způsobem ovlivňuje a charakterizuje zdravotní stav hostitele. Střevní mikroflóra každého jedince se sestává z přibližně 1000 různých bakteriálních druhů a asi desetkrát více různých bakteriálních klonů a izolátů. Střevní mikroflóra teplokrevných zvířat se sestává zejména z baktérií náležících mezi Gram pozitivní *Firmicutes* a Gram negativní *Bacteroidetes*. Minoritní baktérie kolonizující trávicí trakt pochází z kmenů *Proteobacteria* a *Actinobacteria*. U hrabavé drůbeže se jako probiotické preparáty nejčastěji používají laktobacily (patří mezi *Firmicutes*) a bifidobaktérie (patří mezi *Actinobacteria*). Experimenty původců tohoto technického řešení však ukazují, že podání čistých kultur laktobacilů nebo *Actinobacteria* jednodenním kuřatům nevede k jejich usídlení v trávicím traktu kuřat. Identifikovat jiné baktérie schopné účinně kolonizovat trávicí trakt drůbeže mezi desítkami tisíc variant je však velmi složitý úkol a prostá znalost baktérií přítomných ve střevní mikroflóře drůbeže nebo lidí neposkytuje vůbec žádnou užitečnou informaci ohledně jejich vhodnosti pro osídlování trávicího traktu kuřat v prvních dnech života. V případě studia střevní mikroflóry kura domácího se navíc různí autoři uchylují ke studiu střevní mikroflóry v prvních týdnech života přibližně odpovídající délce výkrmu brojlerů (cca 35 dnů). To je však značně problematický a zavádějící přístup poskytující výsledky velmi diskutabilní kvality. Důvod pro toto tvrzení je, že kuřata se líhnou v líhních, bez kontaktu s dospělou slepicí a jejich počáteční mikroflóra pochází výlučně z prostředí. Střevní mikroflóra mladých kuřat proto není vůbec reprezentativní pro kura domácího a mikrobiální kultivací z trávicího traktu brojlerů se v naprosté většině případů získají bakteriální kultury nevhodné pro použití jako probiotika, včetně např. laktobacilů. Evoluce naopak selektovala kuřata tak, aby se hned v prvních hodinách po vylíhnutí v hnízdě osídlily mikroflórou matky. Nerespektování této skutečnosti při selekci nových probiotických kmenů vede k zcela mylným konceptům a závěrům. Nadto je jasné, že slepice nepředává kuřatům jednu jedinou baktérii, a v souladu s tím experimentální podání jednotlivých bakteriálních kultur nechrání kuřata před infekcí salmonelami nebo zvýšenými úhyny v prvních dnech života. Pokud některé studie tvrdí opak, neuvádí kriticky vyhodnocené výsledky, což lze snadno doložit reálným stavem v chovech drůbeže. V těch se pro nefunkčnost stávajících jednodruhových probiotik používají antibiotika s veškerými nežádoucími důsledky.

Naopak panuje shoda, že podání komplexní mikroflóry kuřatům např. extraktem trusu dospělých slepic vede k jejich okamžité ochraně před infekcí salmonelami, zcela v souladu se skutečností, že takové experimenty mimikují přirozený přenos komplexní mikroflóry mezi slepicí a kuřetem. Tato varianta ovšem naráží na legislativní opatření, protože se tímto způsobem mohou přenášet i nezjištěná infekční agens bakteriálního, virového nebo protozoárního původu. Je tedy známo, že jednotlivé baktérie nezvyšují zásadním způsobem odolnost kuřat proti salmonelám, zatímco komplexní mikroflóra, která má ale omezené použití, před salmonelami chrání. Řešení ochrany trávicího traktu tedy existuje, ale není jasné, zda je nutné podat vždy všech 1000 baktérií současně s rizikem nekontrolovaného přenosu i nežádoucích baktérií, anebo zda lze ochranu redukovat na menší počet baktérií. A pokud by bylo možné redukovat počet baktérií, není jasné, které baktérie z tisíců různých vybrat do účinného, ale současně z pohledu reálné produkce co nejjednoduššího preparátu.

Předkládané technické řešení proto předkládá výstup, probiotický přípravek, který vyhovuje výše uvedeným požadavkům. Obsahuje více než jednu baktérii, ale přesto má relativně jednoduché složení, které je technicky realizovatelné. Přitom zajistí efektivní osídlení trávicího traktu drůbeže od prvních dnů života, sníží přítomnost nežádoucích bakterií v trávicím traktu kuřat a ochrání kuřata před salmonelovou infekcí.

Podstata technického řešení

V rámci předkládaného technického řešení bylo studováno více než 500 různých baktérií, které původci technického řešení postupně izolovali z trávicího traktu kuřat v čistých kulturách a stanovili u nich kompletní sekvenci genomu. Z nich jen malá část účinně kolonizovala trávicí trakt drůbeže. Klíčovým zjištěním bylo, že mezi baktériemi schopnými kolonizovat trávicí trakt kuřat po jednorázové aplikaci nebyl jediný zástupce rodů *Lactobacillus*, *Enterococcus* nebo *Bacillus*, které se dosud v chovech drůbeže používají jako probiotika. Předkládaná probiotická směs je svým složení zcela unikátní a odlišná od jakéhokoli jiného produktu.

Po identifikaci baktérií schopných účinné kolonizace trávicího traktu kuřat v dalším kroku původci technického řešení redukovali počet bakteriálních druhů vhodných do směsi identifikací takových baktérií, které jsou specifické pro drůbež. Tato úvaha dosud nebyla při přípravě probiotik pro drůbež používána. Toho bylo dosaženo porovnáním střevní mikroflóry kura domácího, prasete domácího a člověka. Tato analýza ukázala, že z řádu Lactobacillales nebo čeledí Lachnospiraceae, Ruminococcaceae nebo Enterobacteriaceae se stejné druhy často vyskytují u všech tří hostitelů. Baktérie z těchto taxonomických jednotek jsou tedy původem z prostředí a nejsou vhodné jako hostitel-adaptovaná probiotika ve smyslu této přihlášky technického řešení. Uvedené zjištění potvrdila analýza střevní mikroflóry sedmidenních kuřat, která se sestávala zejména ze zástupců Lachnospiraceae, Ruminococcaceae nebo Enterobacteriaceae. Protože však tato kuřata nikdy nebyla v kontaktu s dospělou slepicí, baktérie v jejich trávicím traktu musely pocházet výlučně z prostředí. Další experimenty pak ukázaly, že jako vhodné baktérie pro zcela nový typ probiotik pro použití u kura domácího se jevili zástupci čeledí Veillonellaceae, Prevotellaceae nebo Bacteroidaceae. Ze zástupců těchto taxonů byla připravena probiotická směs, která je předmětem tohoto technického řešení.

Předmětem předkládaného technického řešení je tedy probiotická směs vhodná pro podání kuřatům, která obsahuje jako účinnou složku baktérie *Bacteroides caecicola*, *Bacteroides caecigallinarum*, *Megasphaera* sp. *a Mediterranea* sp. Takto je poskytnuta přesně definovaná, bezpečná, snadno kultivovatelná a podatelná probiotická směs, vhodná pro masné i nosné linie drůbeže, která se sestává z baktérií striktně adaptovaných na kura domácího, které ve vysoké účinnosti a dlouhodobě kolonizují trávicí trakt po jednorázové aplikaci. Všechny čtyři baktérie lze kultivovat současně, což významně zjednodušuje jejich průmyslovou přípravu. Probiotická směs je vhodná zejména pro podávání první den života drůbeže, ale lze ji podat i v pozdějších dnech.

Probiotická směs podle technického řešení má oproti všem podobným, doposud připraveným produktům, tyto technické výhody:

- Obsažené baktérie jsou adaptované na kuře a nevyskytují se ve střevní mikroflóře člověka nebo prasat.

- Všechny 4 baktérie patří za předpokladu dodržení anaerobní kultivace mezi in vitro snadno kultivovatelné.

- Všechny 4 baktérie lze souběžně fermentovat, protože mají podobné růstové rychlosti. Žádná z těchto baktérií tedy ve směsi nepřeroste ostatní.

- Všechny baktérie lze kultivovat v médiu bez přídavku jakýchkoli produktů živočišného původu.

- Všechny baktérie výhodného provedení byly celogenomově sekvenovány a bylo ověřeno, že ani jedna z nich nemá v genomu horizontálně přenositelné geny pro rezistence k antibiotikům.

- Baktérie ze směsi účinně osídlují trávicí trakt drůbeže po jednorázové aplikaci, a to tak odlišné genetické linie jako je masná linie Ross nebo nosná linie ISA Brown.

- Po aplikaci všechny 4 baktérie kolonizují trávicí trakt nejméně po dobu 35 dnů.

- Po aplikaci jednodenním kuřatům a infekci *Salmonella* Enteritidis probiotická směs zvyšuje odolnost kuřat před salmonelami.

- U ošetřených kuřat se v menší míře vyskytují patogenní nebo oportunně patogenní baktérie původem z prostředí, jako je *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium perfringens* nebo *Clostridium difficile*.

- V reálných hejnech aplikace směsi snižuje úhyny až na úroveň srovnatelnou s výkrmem (odchovem) kuřat za použití antibiotik. Aplikací probiotické směsi tak lze nahradit použití antibiotik v produkci drůbeže.

Probiotickou směs podle technického řešení lze podávat kuřatům kdykoli v průběhu života. Nejvýhodnější je však její podání kuřatům bezprostředně po vylíhnutí. Směs je proto určena zejména k aplikaci jednodenním kuřatům v líhních nebo bezprostředně po naskladnění kuřat na farmu, to je ve věku 1 až 5 dnů, výhodněji 1 až 3 dnů.

Směs lze podávat v pitné vodě nebo krmivu. Pro dosažení homogenního pokrytí celého hejna je však nejvhodnější sprejová aplikace v líhni. Probiotická směs byla otestována jako zcela bezpečná po sprejové aplikaci.

Předmětem předkládaného technického řešení je také krmivo obsahující probiotickou směs podle technického řešení.

Předmětem předkládaného technického řešení je dále formulace pro sprejovou aplikaci obsahující probiotickou směs podle technického řešení a alespoň jedno potravinářsky přijatelné rozpouštědlo.

Při testování bylo zjištěno, že po orálním podání jednodenním kuřatům tvoří baktérie z probiotické směsi více než 25 % z celkové střevní mikroflóry u sedmidenních kuřat a okolo 50 % z celkové střevní mikroflóry u kuřat 29. den života, což je v podstatě délka života brojlerů ve výkrmu. Ve střevní mikroflóře kontrolních kuřat, kterým nebyla probiotická směs podávána, se baktérie probiotické směsi nenacházely. Baktérie z probiotické směsi ze střevní mikroflóry vytlačily baktérie, které mohou způsobovat záněty a nežádoucí fyziologické stavy, jako je *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* nebo *Clostridium difficile*. Probiotická směs podle technického řešení při testování nevykazovala žádné negativní vlastnosti, a naopak chránila kuřata před experimentální infekcí *Salmonella* Enteritidis, a to jak při orální čelenži, tak i po čelenži s využitím modelu „seeder bird“. U osídlených kuřat navíc klesal podíl *E. coli* na 1 až 2 % z celkové mikroflóry, signifikantně méně než u kontrolních neosídlených kuřat, u kterých se podíl *E. coli* na celkové mikroflóře pohyboval v desítkách procent. Předkládaná probiotická směs je proto velmi vhodná pro použití jako probiotický preparát u kuřat, který účinně zlepšuje zdravotní stav a fyziologické vlastnosti kuřat bez nežádoucích vedlejších účinků a omezuje tak potřebu použití antibiotik.

Ve výhodném provedení se probiotická směs sestává z bakterií *Bacteroides caecicola* CCM 9131, *Bacteroides caecigallinarum* CCM 9132, *Megasphaera* sp. CCM 9129 *a Mediterranea* sp. CCM 9130. Tyto bakteriální kmeny jsou uloženy v České sbírce mikroorganismů (CCM), adresa: Kamenice 5/budova A25, 625 00 Brno, Czech Republic.

Přípravek je s výhodou formulován pro orální nebo sprejové podání, a obsahuje tedy kapalný nosič na bázi vody. Kapalným nosičem může být voda, fyziologický roztok nebo růstové médium pro baktérie. Růstové médium pro pomnožení a fermentaci neobsahuje žádné ingredience živočišného původů a sestává se pouze z peptonu ze sójových bobů (enzymatický digestát), kyselého hydrolyzátu sójových proteinů a kvasnicového extraktu.

Probiotický přípravek s výhodou obsahuje alespoň 10^7 CFU na mililitr tekutého produktu každé ze čtyř obsažených baktérií. Předmětem předkládaného technického řešení je tedy probiotický přípravek obsahující baktérie 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, zejména patogeny *E. coli* a/nebo *Salmonella,* anebo *Proteus vulgaris*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* a *Clostridium difficile*.

Přípravek je možno podávat jednorázově v jedné jednotkové dávce nebo opakovaně v několika jednotkových dávkách rozložených v čase. S výhodou se však poprvé podává sprejováním v dolíhni den před transportem nebo sprejováním kuřat při třídění před transportem na farmu. Třetí dávku je možné distribuovat kuřatům po naskladnění na farmu orálně, a to jak pitnou vodou, tak jako příměs do krmiva.

Objasnění výkresů

Obrázek 1. Výskyt hostitelsky adaptovaných a všeobecně přítomných členů střevní mikroflóry u člověka, prasete a drůbeže. Horní panel, šedá barva, počet druhů v daném taxonu, které se vyskytují u více než jednoho hostitele. Černá, šachovnice a šrafování, počet druhů, které se daného taxonu vyskytují pouze u kuřete, člověka, resp. prasete. Spodní panel, procentuální zastoupení daného taxonu v mikroflóře sedmidenních kuřat. Při vývoji probiotické směsi pro kuřata jsme striktně vybírali z baktérií adaptovaných na kuře.

Obrázek 2. Grafy znázorňují počty salmonel ve slepém střevě kuřat 4, 14 a 21 dní po infekci. U každé skupiny je uveden i věk kuřat ve dnech. *S.* Enteritidis byla kvantifikována kultivačně (panel A) nebo pomocí real-time PCR (Panel B). Hvězdičkou jsou označeny signifikantní rozdíly (t-test, $p<0,05$), kdy nižší počty salmonel byly vždy zaznamenány u kuřat ošetřených probiotickou směsí.

Obrázek 3. Schopnost probiotické směsi zvyšovat odolnost kuřat před spontánním osídlením *E. coli* z prostředí. Hvězdičkou jsou označeny signifikantní rozdíly (t-test, $p<0,05$), kdy nižší počty *E. coli* byly vždy zaznamenány u kuřat ošetřených probiotickou směsí.

Obrázek 4. Vliv podání probiotické směsi pitnou vodou po naskladnění na úhyny po celou dobu výkrmu brojlerů. Černé čtverečky, úhyny ve třech hejnech, ve kterých byla podávána antibiotika. Šedé kroužky, úhyny v hejnech s probiotickou směsí. Bílé trojúhelníky, úhyny v hejnech bez antibiotik a bez probiotické směsi.

Obrázek 5. Vliv podání probiotik sprejováním v dolíhni na úhyny po celou dobu výkrmu brojlerů. Čtverečky, úhyny v hejnu, ve kterém byla podávána antibiotika. Kroužky, úhyny v hejnu ošetřeném probiotickou směsí.

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Identifikace a izolace vhodných bakteriálních druhů specifických pro mikroflóru kuřat

Při návrhu nových probiotik je klíčové selektovat z bakteriálních druhů adaptovaných na daného hostitele a vyhnout se sdíleným druhům, jejichž původ je nejasný. Při návrhu nových probiotik jsme porovnali bakteriální druhy vyskytující se u člověka, prasete a kura domácího, a zaměřili se jen druhy, které jsou přísně hostitelsky adaptované na kuře. Porozumění a plné uvědomění si všech důsledků této skutečnosti je pro návrh nových generací probiotik klíčové. Baktérie adaptované pro kuře jsme vybírali z čeledí Veillonellaceae, Prevotellaceae a Bacteroidaceae (Obr. 1). Na druhy z těchto čeledí jsme zaměřili následnou kultivaci, která byla prováděna z obsahů slepých střev dospělých slepic naředěných ve sterilním ředicím 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). Jednotlivá ředění byla vyseta na Wilkins-Chalgren (WCHA) agar a inkubace probíhala v anaerobní atmosféře sestávající se z 10 % CO_2, 5 % H_2 a 85 % N_2 při 37 °C po dobu 72 hodin. Z narostlých kolonií byl alikvot resuspendován v 1,0 ml BHI bujonu s 10% glycerolem a zamražen při -70 °C pro další použití. Z jiného alikvotu byla izolována DNA, která byla využita pro stanovení kompletní sekvence bakteriální DNA a následnou druhovou identifikaci. *Bacteroides caecigallinarum* a *Mediterranea* sp. patří mezi Gram negativní baktérie čeledi Bacteroidaceae. Konečným produktem jejich metabolismu je acetát, propionát a sukcinát. *Bacteroides caecicola* patří mezi Gram negativní baktérie čeledi Prevotellaceae a konečným produktem jeho metabolismu je acetát, propionát a sukcinát. *Megasphaera* sp. náleží do čeledi Veillonellaceae, která fylogeneticky patří do kmene Firmicutes. *Megasphaera* sp. je butyrát produkující baktérie. Se znalostí celogenomové sekvence byly identifikovány geny specifické pro každou z uvedených baktérií a na ně byly zacíleny Sybr Green real time PCR pro detekci a kvantifikaci v libovolném typu vzorků, zejména však trusu ošetřených kuřat s využitím následujících specifických primerů:

Cílová baktérie	forward primer	reverse primer
Bacteroides caecicola	tataccatgcacgatgaacc (SEQ ID NO. 1)	aaataccttcttccctcacg (SEQ ID NO. 2)
Bacteroides caecigallinarum	gatgcggtccgtgtaaagtt (SEQ ID NO. 3)	gtcggcagtgaggaatttgt (SEQ ID NO. 4)
Megasphaera sp.	acgtcaacgaagccgaatac (SEQ ID NO. 5)	cgacgaccatgaactgaatg (SEQ ID NO. 6)
Mediterranea sp.	gggcatttccccgtatttat (SEQ ID NO. 7)	gtatactcgcccaggttcca (SEQ ID NO. 8)

Jednotlivé izolované kmeny bakterií byly charakterizovány i dle sekvence genu pro 16S rRNA. Ta je pro jednotlivé izoláty baktérií používané v dalších testech následující:

Bacteroides caecicola CCM 9131

ATTTTACAATGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAAC
ACATGCAAGTCGAGGGGCAGCATGTATCTGGCTTGCCAGATACGATGGCGACCGGC
GCACGGGTGAGTAACGCGTATCCAACCTGCCCCGTACACGGGGATAGCCTTCCGAA
AGGGAGATTAATACCCGATGATGTCAGGAGTTCGCATGTAAACCTGACTAAAGTTAT
TACGGTACGGGAGGGGGGTGCGTTCCATTAGGTAGTAGGCGGGGTAACGGCCCACC
TAGCCGACGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCCACATTGGAACTGAGAC
ACGGTCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGCCGGGAG
GCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGAAGGATGACGGCCCTACGGGTTGTAAACTTCTTTT
ATGCGGGATTAACGTGAGGTACGTGTACCTTCTTGCAGGTACCGCATGAATAAGCAT
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAGGCGTTATCCGGAT
TTATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGACGGCATGTCAAGTCAGCTGTGAAAGTTCGGGG
CTCAACCTTGGAATTGCAGTTGAAACTGGCGTGCTTGAGTTCGGTCGAGGCAGGCGG

AATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCACGAAGAACCCCGATTGCGAAGG
CAGCTTGCCAGGCCTGGACTGACGTTGAGGCTCGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCGCACGGTAAACGATGGATACTCGCTGTCGGCGATACAC
GGTCGGCGGCCAAGCGAAAGCGTTAAGTATCCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACG
GTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAA
TTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAACTGTGCCTGACTGCCTCAGAG
ATGGGGCTTCCAGCAATGGCAGGCATGGAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
CCGTGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCCTCCCGCCAGTTGCCAT
CAGGTAAAGCTGGGCACTCTGGGGGCACTGCCACCGCAAGGTGTGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGTTACAATGGG
AGGTCACAGAGGGCTGCTACCCGGCGACGGGACGCCAATCCCCAAACCCTCCCTCA
GTACGGACTGGAGTCTGCAACCCGACTCCACGAAGCTGGATTCGCTAGTAATCGCGC
ATCAGCCACGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCC
ATGAAAGCCGGCGGTGCCTGAAGTGCGTAACCGCAAGGGGCGCCCTAGGGTAAAGC
CGGTGATTGGGGCTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGAAC
AC (SEQ ID NO. 9)

Bacteroides caecigallinarum CCM 9132

ATTTTACAATGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAAC
ACATGCAAGTCGAGGGGCAGCGGGAAGGAAGCTTGCTGAAATTGCCGGCGACCGGC
GCACGGGTGAGTAACGCGTATCCAACCTTCCGTTTACTCAGGGATAGCCTTTCGAAA
GAAAGATTAATACCTGATAGTATGGTAAGATTGCATGATAGTACCATTAAAGATTCA
TCGGTAAACGATGGGGATGCGTTCCATTAGGTAGTAGGCGGGGTAACGGCCCACCTA
GCCTACGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCCACATTGGAACTGAGACAC
GGTCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGCGAGCC
TGAACCAGCCAAGTAGCGTGAAGGATGAAGGTTCTATGGATTGTAAACTTCTTTTAT
AAGGGAATAAAGTGCTTTACGTGTAGAGTTTTGTATGTACCTTATGAATAAGCATCG
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTT
ATTGGGTTTAAAGGGAGCGTAGACGGGATGTTAAGTCAGCTGTGAAAGTTTGGGGCT
CAACCTTAAAATTGCAGTTGAAACTGGCGTTCTTGAGTGCGGTAGAGGCAGGCGGAA
TTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCACGAAGAACTCCAATTGCGAAGGCA
GCTTGCTGGAGCGTAACTGACGTTGATGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACACGGTAAACGATGGATACTCGCTGTTGGCGATATACGGT
CAGCGGCCAAGCGAAAGCATTAAGTATCCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAATTC
GATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTAAATTATGCATGAATGATCTGGAGACA
GATCAGCCGCAAGGCATGTATGAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTG
AGGTGTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCTTTCTGCCAGTTACTAACAGGC
AATGCTGAGGACTCTGGCGGTACTGCCATCGTAAGATGTGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAATCAGCACGGCCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGTTACAATGGGGGGTA
CAGAAGGCAGCTTACCGGCGACGGTTGGCCAATCCCGAAAGCCCCTCTCAGTTCGGA
CTGGAGTCTGCAACCCGACTCCACGAAGCTGGATTCGCTAGTAATCGCGCATCAGCC
ACGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGAAAG
CCGGGAGTACCTGAAGTGCGTAACCGCAAGGAGCGCCCTAGGGTAACACTGGTAAT
TGGGGCTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGAACAC (SEQ ID
NO. 10)

Megasphaera sp. CCM 9129

TATCATGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACAT
GCAAGTCGAACGGGAGGACATGGGAAGCTTGCTTCCTATGGACTCTAGTGGCAAAC
GGGTGAGTAACGCGTAAGCAACCTGCCCTCCGGATGGGGACAACAGCTGGAAACGG
CTGCTAATACCGAATACGTTTCCACTGCCGCATGGCAGTGGGAAGAAAGGTGGCCTC
TGAATATGCTACCGCCGGGGGAGGGGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAA

CGGCCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGTCTGAGAGGATGAACGGCCACATTGG
AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTCCGCAAT
GGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGACGGCCTTCGGGTTGTAA
AGCTCTGTTATACGGGACGAACGGCTAGTGTGCCAATACCACATTAGAATGACGGTA
CCGTAAGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGGTTTCATAAGTCT
GTCTTAAAAGTGCGGGGCTTAACCCCGTGAGGGGACGGAAACTGTGAGACTGGAGT
GTCGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAG
GAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTTTCTGGACGACAACTGACGCTGAGGCGCGAAAG
CCAGGGGAGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGGATA
CTAGGTGTAGGGGGTATCGACCCCTCCTGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA
AGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGCCTTGA
CATTGAGTGCTATCCTCAGAGATGAGGAGTTCTTCTTCGGAAGACGCGAAAACAGGT
GGTGCACGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCCTATCTTCTGTTGCCAGCGCGTCATGGCGGGGACTCAGGAGAGACTGCC
GCAGACAATGCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGGCT
TGGGCTACACACGTACTACAATGGCTCTTAATAGAGGGAAGCGAAGGAGCGATCCG
GAGCAAACCCCAAAAACAGAGTCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACCCGCCTGCA
TGAAGCAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAAAGTCATTCACACCCGAAGCCGGTGAG
GTAACCTTACGGAGCCAGCCGTCGAAGGTGGGGGCGATGATTGGGGTGAAGTCGTA
ACAAGGTAGCCGTATCG (SEQ ID NO. 11)

Mediterranea sp. CCM 9130

ACTTTTACAATGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAA
CACATGCAAGTCGAGGGGCAGCGGGATTGTAGCAATACAATTGCCGGCGACCGGCG
CACGGGTGAGTAACACGTATCCAACCTTCCGGTTACTCGGGGATAGCCTTTCGAAAG
AAAGATTAATACCCGATAGTATAAGATTTCCGCATGGTTTTCTTATTAAAGATTCATC
GGTAACCGATGGGGATGCGTTCCATTAGATAGTAGGCGGGGTAACGGCCCACCTAGT
CGACGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCCACATTGGAACTGAGACACGG
TCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGAGAGCCTG
AACCAGCCAAGTAGCGTGAAGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTTCTTTTATAC
GGGAATAACATCATCCACGTGTGGGTGTCTGCATGTACCGTATGAATAAGCATCGGC
TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTTAT
TGGGTTTAAAGGGAGCGTAGACGGGTCCTTAAGTCAGTTGTGAAAGTTTGCGGCTCA
ACCGTAAAATTGCAGTTGATACTGGGGACCTTGAGTGCGGCAGAGGCAGGCGGAAT
TCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAG
CTTGCTGGACCGTAACTGACGTTGATGCTCGAAAGTGCGGGTATCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCGCACAGTAAACGATGAATACTCGCTGTTGGCGATATACTGCC
AGCGGCCAAGCGAAAGCGTTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAATTCG
ATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAACTGCAGCGGAATGGCGTGGAAACA
TGTCAGCGAGCAATCGCCGCTGTGGAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCG
TGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCTTACCGATAGTTGCCATCAG
GTAACGCTGGGGACTCTATCGGGACTGCCGTCGTAAGATGTGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCAGCACGGCCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGTTACAATGGGGGG
TACAGCAGGCCGCTACCGGGCGACCGGATGCCAATCCCTAAAACCCCTCTCAGTTCG
GACTGGAGTCTGCAACCCGACTCCACGAAGCTGGATTCGCTAGTAATCGCGCATCAG
CCACGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGAA
AGCCGGGGGTACCTGAAGTGCGTAACCGCAAGGAGCGCCCTAGGGTAAAACTGGTG
ATTGGGGCTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGAACACCTC
CTTTCT (SEQ ID NO. 12)

Příklad 2: Příprava probiotické směsi

Jednotlivé čisté kultury výše uvedených izolátů se skladují v BHI médiu s 10% glycerolem při -70 °C. Při pomnožení se jednotlivé kultury vysejí na WCHA agar a kultivují se 36 hodin při 37 °C v anaerobní atmosféře. Poté se jednotlivé kultury samostatně resuspendují v 5 ml BHI média s 10% glycerolem do OD_{600nm} = 1, což odpovídá 1 x 10^9 CFU/ml. Následně se pětimililitrové objemy smíchají a rozplní do jednomililitrových master inokulí. V případě přípravy probiotické směsi se 1 ml master inokula použije k zaočkování 3 litrů kultivační půdy a inkubuje se anaerobně v médiu bez živočišných proteinů (Pepton ze sojových bobů (enzymatický digestát), kyselý hydrolyzát sójového proteinu, kvasnicový extrakt) při 37 °C po dobu 24 hodin. Výsledná koncentrace směsného fermentátu dosahuje hodnot 1 x 10^9 CFU/ml. Vzhledem k procentuálnímu zastoupení jednotlivých baktérií (Tab. 1) se jejich počty pohybovaly v rozmezí od 3,2 x 10^7 CFU/ml pro *Bacteroides caecigallinarum* až do 4,9 x 10^8 CFU/ml pro *Bacteroides caecicola*.

Tabulka 1. Procentuální zastoupení baktérií probiotické směsi po společné fermentaci. Pro průmyslovou fermentaci je důležité, aby baktérie ve směsi měly podobnou růstovou rychlost. Kombinace 4 vybraných baktérií tuto podmínku splnila. Baktérie byly ve směsi zamrazeny jako master seed při -70 °C. Jednotlivá master inokula byla použita pro zaočkování živného média a po 24 hodinové fermentaci byly stanoveny poměry jednotlivých baktérií pomocí kvantitativní real time PCR. Vybrané baktérie rostou podobnou rychlostí a lze je s výhodou kultivovat současně.

	Bact. caecicola	Bact. caecigallinarum	Mediterranea sp.	Megasphaera sp.
Inokulum	61,72	18,35	14,40	5,53
24 hod kultivace poprvé	49,13	3,24	14,91	32,72
24 hod kultivace podruhé	49,40	3,81	25,28	21,50

Příklad 3: Schopnost baktérií z probiotické směsi dlouhodobě kolonizovat slepé střevo drůbeže po jednorázové orální aplikaci

Kuřata masné nebo nosné linie se první den života orálně inokulovala v 0,1 ml probiotické směsi, která obsahovala minimálně 10^7 CFU/ml každé ze čtyř baktérií a týden po osídlení se stanovilo zastoupení probiotických kultur ve slepém střevě kuřat sekvenováním V3 a V4 variabilní oblasti genu pro 16S rRNA (Videnska et al., Succession and replacement of bacterial populations in the caecum of egg laying hens over their whole life. PLoS One 2014;9:e115142) (Tab. 2). V opakovaném pokusu se kuřata nosné linie utratila ve věku 8, 12, 22 a 29 dní (Tab. 3) a bylo stanoveno složení bakteriální mikroflóry sekvenováním V3 a V4 variabilní oblasti genu pro 16S rRNA.

Tabulka 2. Procentuální zastoupení baktérií probiotické směsi po osídlení jednodenních kuřat masného nebo nosného typu. Aby vytipovaná probiotická směs chránila drůbež univerzálně, ověřili jsme kolonizační schopnosti u dvou odlišných linií, u masné linie Ross a nosné linie ISA Brown. Jednodenní kuřata masné a nosné linie byla orálně osídlena probiotickou směsí a jejich přítomnost ve slepém střevě byla stanovena o týden později. Probiotická směs úspěšně osídlovala obě geneticky krajně odlišné linie.

	Brojleři	Nosnice
Bacteroides caecicola	9,88	3,57
Bacteroides caecigallinarum	12,55	54,07
Mediterranea sp.	7,69	4,06
Megasphaera sp.	3,21	1,19

Tabulka 3. Procentuální zastoupení jednotlivých baktérií z probiotické směsi ve slepém střevě kuřat. Probiotická směs byla podána kuřatům linie ISA Brown první den života a procentuální

zastoupení jednotlivých baktérií z probiotické směsi na celkové mikroflóře slepého střeva bylo stanoveno sekvenováním části genu pro 16S rRNA 8., 12., 22. a 29. den života.

	Kontrolní kuřata				Osídlená kuřata			
	Den 8	Den 12	Den 22	Den 29	Den 8	Den 12	Den 22	Den 29
Bacteroides caecicola	0,024	0,124	0,149	0,234	18,04	12,48	14,08	16,14
Bacteroides caecigallinarum	0,016	0,11	0,191	0,568	2,95	18,44	32,76	28,15
Mediterranea sp.	0,009	0,027	0,037	0,047	4,13	2,53	2,83	3,07
Megasphaera sp.	0,004	0,029	0,051	0,045	1,13	1,97	0,74	1,25
Suma	0,053	0,290	0,428	0,894	26,25	35,42	50,41	48,61

Příklad 4: Průkaz nepatogenní povahy baktérií v probiotické směsi

Pět kuřat bylo první den života osídleno probiotickou směsí. Dalších 5 neosídlených kuřat bylo použito jako negativní kontrola. Po sedmi dnech byla kuřata utracena a 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 kvantifikaci exprese genu pro matrix metalloproteinase 7 (MMP7) a avidin (AVD) pomocí SybrGreen real time PCR, jejichž zvýšená exprese by indikovala nežádoucí zánětlivou odpověď kuřat na podávaná probiotika. Exprese těchto genů byla normalizována na průměrnou expresi genů GAPDH, UB a TBP (jak je popsáno např. v PV 2015-753 nebo v publikaci Varmuzova et al., Immune protection of chickens conferred by a vaccine consisting of attenuated strains of *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium and Infantis. Vet Res 2016;47:94). Mezi kontrolní a osídlenou skupinou nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v expresi AVD nebo MMP7. Osídlení slepého střeva vysokými počty baktérií z probiotické směsi proto nevyvolává zánět ve střevě a nemá negativní vliv na funkci střevního traktu (Tab. 4). Probiotická směs tedy prokazatelně nevyvolávala negativní zánětlivou reakci a sestává se ze skutečně nepatogenních, komensálních baktérií.

Tabulka 4. Exprese znaků zánětu (AVD - avidin a MMP7 - matrix metalloproteinase 7) ve slepém střevě kontrolních kuřat a kuřat osídlených probiotickou směsí. Tabulka ukazuje průměrnou expresi AVD a MMP7 ve slepém střevě pěti osmidenních kuřat z kontrolní a pěti osmidenních kuřat z experimentální skupiny po osídlení probiotickou směsí první den života. Osídlení slepého střeva probiotickou směsí nevyvolalo zánětlivou reakci.

	Kontrola	Probiotika
AVD	17,71±16,27	13,98±9,51
MMP7	0,034±0,034	0,013±0,008

Příklad 5: Schopnost probiotické směsi zvyšovat odolnost kuřat před experimentální infekcí *Salmonella* Enteritidis

Probiotická směs byla orálně podána jednodenním kuřatům linie ISA Brown. O týden později, tedy ve věku 8 dní, bylo patnáct kontrolních kuřat neosídlených probiotickou směsí a 15 kuřat osídlených probiotickou směsí orálně čelenžováno divokým kmenem *Salmonella* Enteritidis (10^7 CFU v 0,1 ml). K dalším dvěma kontrolním, resp. osídleným, skupinám sestávajícím z 15 kuřat bylo přidáno jedno řádně označené kuře, které bylo orálně infikováno *Salmonella* Enteritidis (infekce s využitím seeder bird). Kuřata byla utrácena 4, 14 a 21 dní po čelenži, přičemž ve skupinách se seeder bird zůstalo toto kuře ve skupině po celou dobu experimentu a bylo utraceno až 21. den po infekci. Počty salmonel byly stanoveny jak kultivačně po desítkovém ředění obsahu slepých střev a výsevu na XLD agar, tak i pomocí *Salmonella*-

specifické kvantitativní real-time PCR. Osídlení kuřat probiotickou směsí snižovalo počty salmonel ve slepém střevě jak po orální čelenži, tak i ve skupině kuřat infikovaných kontaktem (seeder bird) (Obr. 2).

Příklad 6: Snížení zastoupení *E. coli* v mikroflóře slepého střeva

Jednodenní kuřata linie ISA Brown byla první den života orálně inokulována 0,1 ml probiotické směsi, která obsahovala 10^7 CFU každé ze čtyř baktérií. Kuřata byla utracena ve věku 8, 12, 22 a 29 dní a bylo stanoveno složení bakteriální mikroflóry ve slepém střevě sekvenováním V3 a V4 variabilní oblasti genu pro 16S rRNA (Videnska et al., 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 genů pro 16S rRNA jsme byli schopni stanovit zastoupení *E. coli* ve vyšetřených vzorcích. Zatímco u kontrolních kuřat ve věku 8 a 12 dní tvořila *E. coli* 35 a 65 % z celkové mikroflóry, u kuřat osídlených probiotickou směsí tvořila *E. coli* pouze 1 až 2 % z celkové mikroflóry (Obr. 3). Aplikace probiotické směsi tedy snižovala procentuální zastoupení *E. coli* zejména v prvních dvou týdnech života. Stejně jako u *E. coli*, probiotická směs snižovala zastoupení *Proteus vulgaris*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* nebo *Clostridium difficile* ve střevní mikroflóře ošetřených kuřat.

Příklad 7: Snížení úhynů v komerčních hejnech po orálním podání probiotické směsi kuřatům po naskladnění na farmu

Kuřatům masné linie ve věku jednoho dne byla bezprostředně po naskladnění podána probiotická směs pitnou vodou anebo jako příměs do krmiva. Jedno hejno se sestávalo z 18 000 kuřat a kuřata v kontrolních hejnech byla v prvních třech dnech života ošetřena antibiotiky, anebo zůstala bez jakéhokoli ošetření. Administrace probiotické směsi po naskladnění kuřat vedla ke snížení úhynů ve srovnání se zcela neošetřenými hejny, ale nevedla k dosažení úrovně úhynů jako v hejnech ošetřených antibiotiky (Obr. 4).

Příklad 8: Snížení úhynů v komerčních hejnech po sprejové aplikaci probiotické směsi kuřatům v dolíhni před naskladněním na farmu Kuřata masné linie byla v dolíhni, tedy ve věku nižším než 24 hodin života, ošetřena sprejováním probiotickou směsí. Kontrolní kuřata nebyla v dolíhni ošetřena a po naskladnění na farmu jim byla v prvních třech dnech života podána antibiotika pitnou vodou. Jedno hejno se sestávalo z 42 000 kuřat. Administrace probiotické směsi sprejováním v dolíhni vedla ke snížení úhynů na úroveň srovnatelnou s úhyny v hejnu ošetřeném antibiotiky (Obr. 5). Podání sprejováním v dolíhni vede k časnějšímu a homogennějšímu osídlení všech kuřat v hejnu a je preferovaným způsobem podání probiotické směsi.

Závěry

Probiotická směs účinně osídluje slepé střevo kuřat od prvního dne života a po jednorázové administraci přetrvává ve slepém střevě minimálně do 29. dne života, což je téměř délka života u masných typů drůbeže ve výkrmu (porážka se obvykle provádí mezi 32. až 35. dnem života). Probiotická směs nemá žádné negativní účinky, po jejím podání nebyly zaznamenány žádné úhyny a nedošlo ani ke stimulaci zánětu ve slepém střevě. Probiotická směs naopak chrání kuřata před infekcí baktérií *Salmonella* Enteritidis a snižuje počty *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* nebo *Clostridium difficile* ve střevní mikroflóře. Proto se dá s výhodou použít jako probiotický preparát u kuřat.

NÁROKY NA OCHRANU

1. Probiotický přípravek pro drůbež, **vyznačující se tím**, že obsahuje jako účinnou složku směs bakterií *Bacteroides caecicola, Bacteroides caecigallinarum, Megasphaera* sp. a *Mediterranea* sp.

2. Probiotický přípravek pro drůbež podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje jako účinnou složku směs bakterií *Bacteroides caecicola* CCM 9131*, Bacteroides caecigallinarum* CCM 9132*, Megasphaera* sp. CCM 9129 a *Mediterranea* sp. CCm 9130.

3. Probiotický přípravek podle nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje kapalný nosič na bázi vody, s výhodou vybraný ze skupiny voda, fyziologický roztok nebo růstové médium pro baktérie sestávající se z peptonu ze sójových bobů, kyselého hydrolyzátu sójových proteinů a kvasnicového extraktu a produktů fermentace baktérií probiotické směsi.

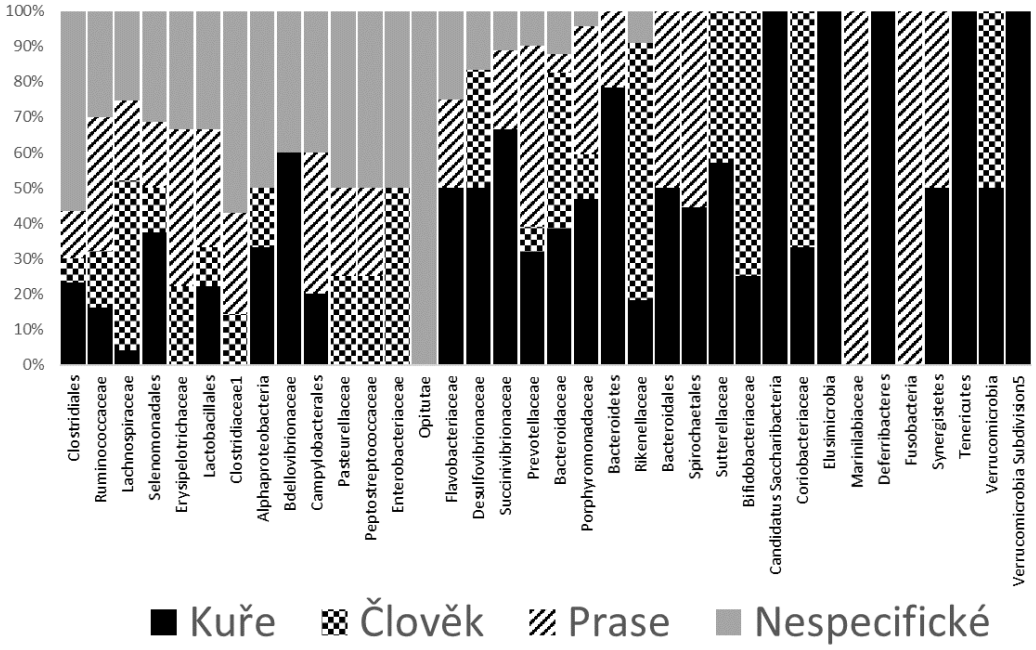
4. Probiotický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že obsahuje 10^7 až 10^9 CFU každé baktérie v jednom mililitru přípravku.

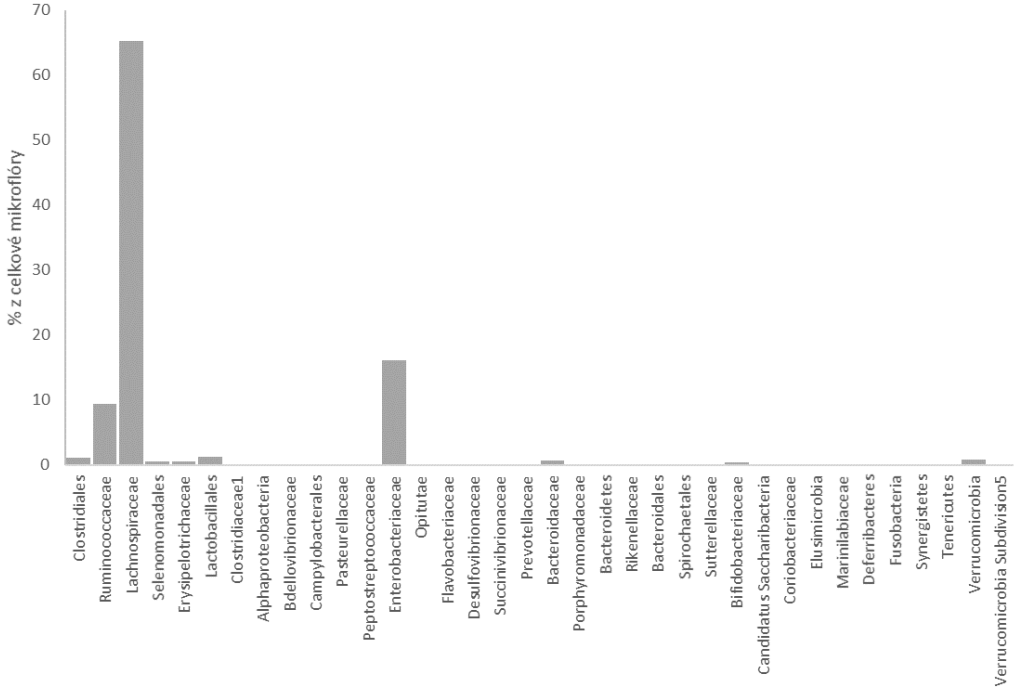
5. Krmivo pro drůbež, **vyznačující se tím**, že obsahuje probiotický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4.

6. Probiotický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4 či krmivo podle nároku 5 pro použití pro léčebné či preventivní zlepšení fyziologických vlastností střevního traktu drůbeže.

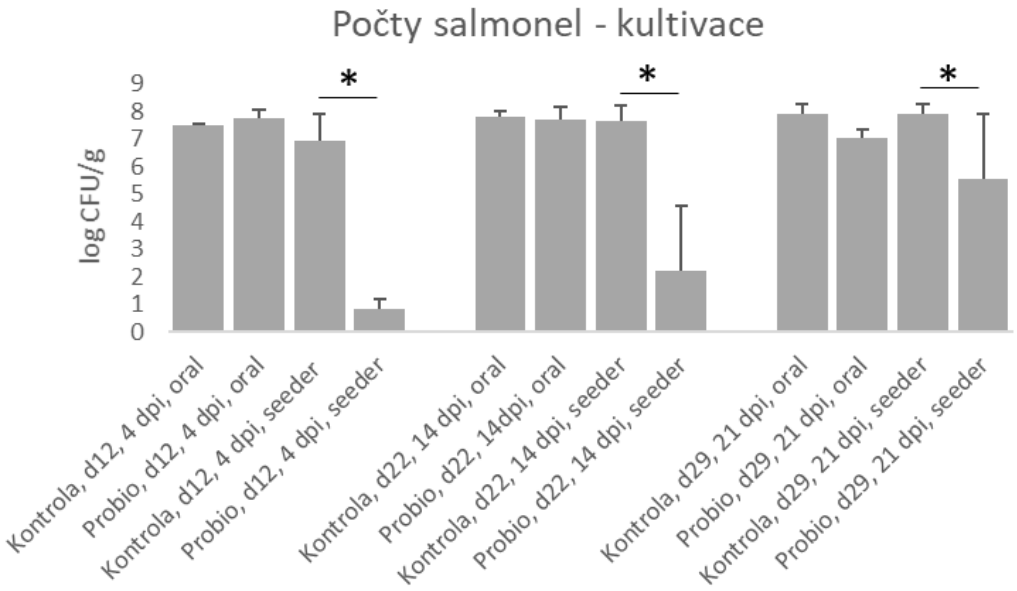
7. Probiotický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4 či krmivo podle nároku 5 pro použití pro prevenci infekcí trávicího traktu drůbeže patogeny vybranými ze skupiny *E. coli, Salmonella*, *Proteus vulgaris*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* a *Clostridium difficile*.

5 výkresů
+
7 stran sekvencí

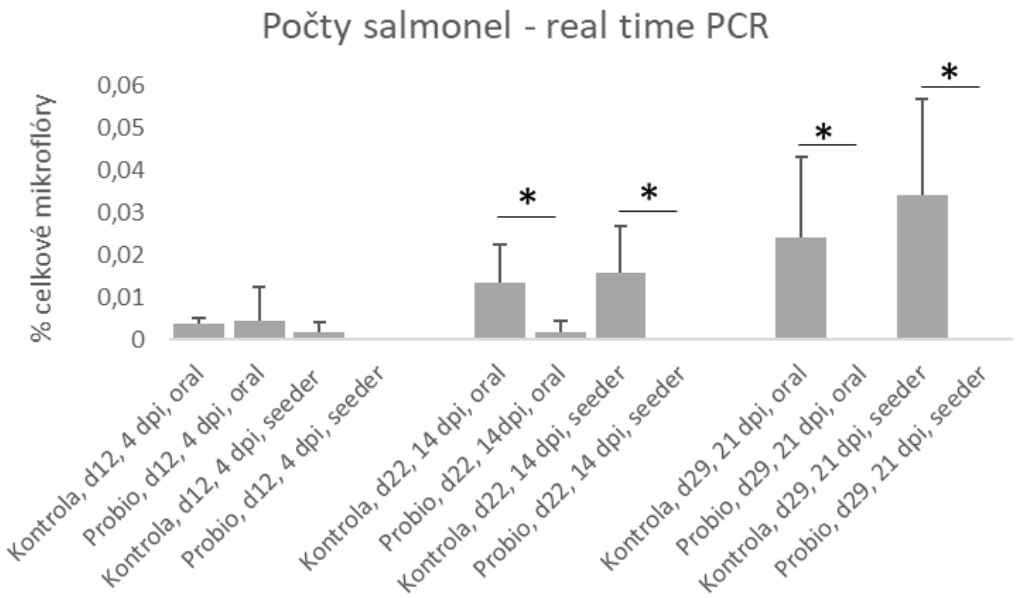

100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Clostridiales
Ruminococcaceae
Lachnospiraceae
Selenomonadales
Erysipelotrichaceae
Lactobacillales
Clostridiaceae1
Alphaproteobacteria
Bdellovibrionaceae
Campylobacterales
Pasteurellaceae
Peptostreptococcaceae
Enterobacteriaceae
Opitutae
Flavobacteriaceae
Desulfovibrionaceae
Succinivibrionaceae
Prevotellaceae
Bacteroidaceae
Porphyromonadaceae
Bacteroidetes
Rikenellaceae
Bacteroidales
Spirochaetales
Sutterellaceae
Bifidobacteriaceae
Candidatus Saccharibacteria
Coriobacteriaceae
Elusimicrobia
Marinilabiaceae
Deferribacteres
Fusobacteria
Synergistetes
Tenericutes
Verrucomicrobia
Verrucomicrobia Subdivision5
Kuře
Člověk
Prase
Nespecifické


70
60
50
40
30
20
10
0
% z celkové mikroflóry
Clostridiales
Ruminococcaceae
Lachnospiraceae
Selenomonadales
Erysipelotrichaceae
Lactobacillales
Clostridiaceae1
Alphaproteobacteria
Bdellovibrionaceae
Campylobacterales
Pasteurellaceae
Peptostreptococcaceae
Enterobacteriaceae
Opitutae
Flavobacteriaceae
Desulfovibrionaceae
Succinivibrionaceae
Prevotellaceae
Bacteroidaceae
Porphyromonadaceae
Bacteroidetes
Rikenellaceae
Bacteroidales
Spirochaetales
Sutterellaceae
Bifidobacteriaceae
Candidatus Saccharibacteria
Coriobacteriaceae
Elusimicrobia
Marinilabiaceae
Deferribacteres
Fusobacteria
Synergistetes
Tenericutes
Verrucomicrobia
Verrucomicrobia Subdivision5

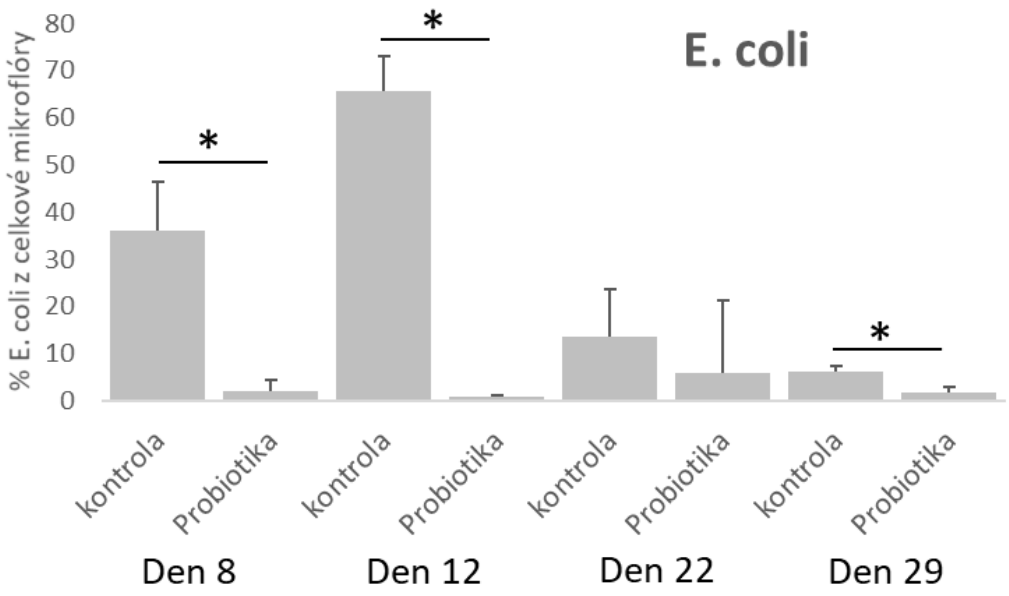
Obr. 1


Počty salmonel - kultivace
log CFU/g
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
*
*
Kontrola, d12, 4 dpi, oral
Probio, d12, 4 dpi, oral
Kontrola, d12, 4 dpi, seeder
Probio, d12, 4 dpi, seeder
Kontrola, d22, 14 dpi, oral
Probio, d22, 14dpi, oral
Kontrola, d22, 14 dpi, seeder
Probio, d22, 14 dpi, seeder
Kontrola, d29, 21 dpi, oral
Probio, d29, 21 dpi, oral
Kontrola, d29, 21 dpi, seeder
Probio, d29, 21 dpi, seeder

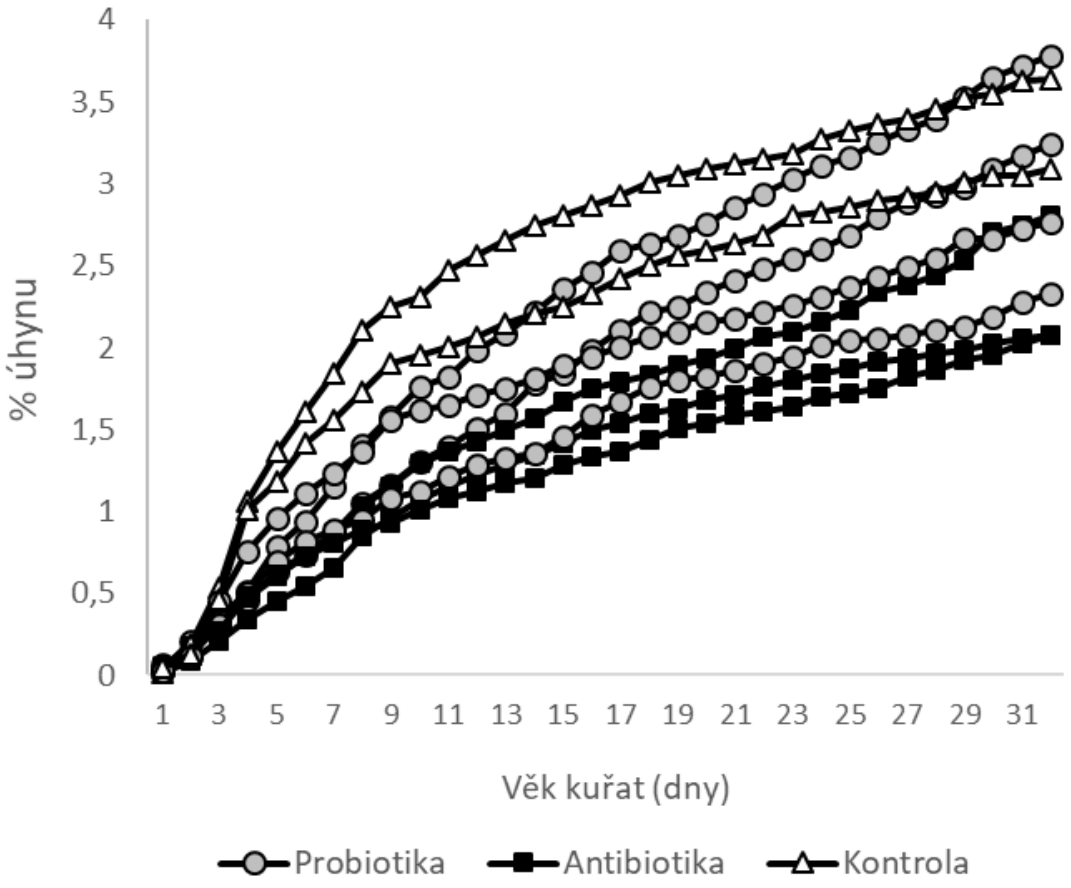
Obr. 2A


Počty salmonel - real time PCR
% celkové mikroflóry
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0
*
*
*
*
Kontrola, d12, 4 dpi, oral
Probio, d12, 4 dpi, oral
Kontrola, d12, 4 dpi, seeder
Probio, d12, 4 dpi, seeder
Kontrola, d22, 14 dpi, oral
Probio, d22, 14dpi, oral
Kontrola, d22, 14 dpi, seeder
Probio, d22, 14 dpi, seeder
Kontrola, d29, 21 dpi, oral
Probio, d29, 21 dpi, oral
Kontrola, d29, 21 dpi, seeder
Probio, d29, 21 dpi, seeder

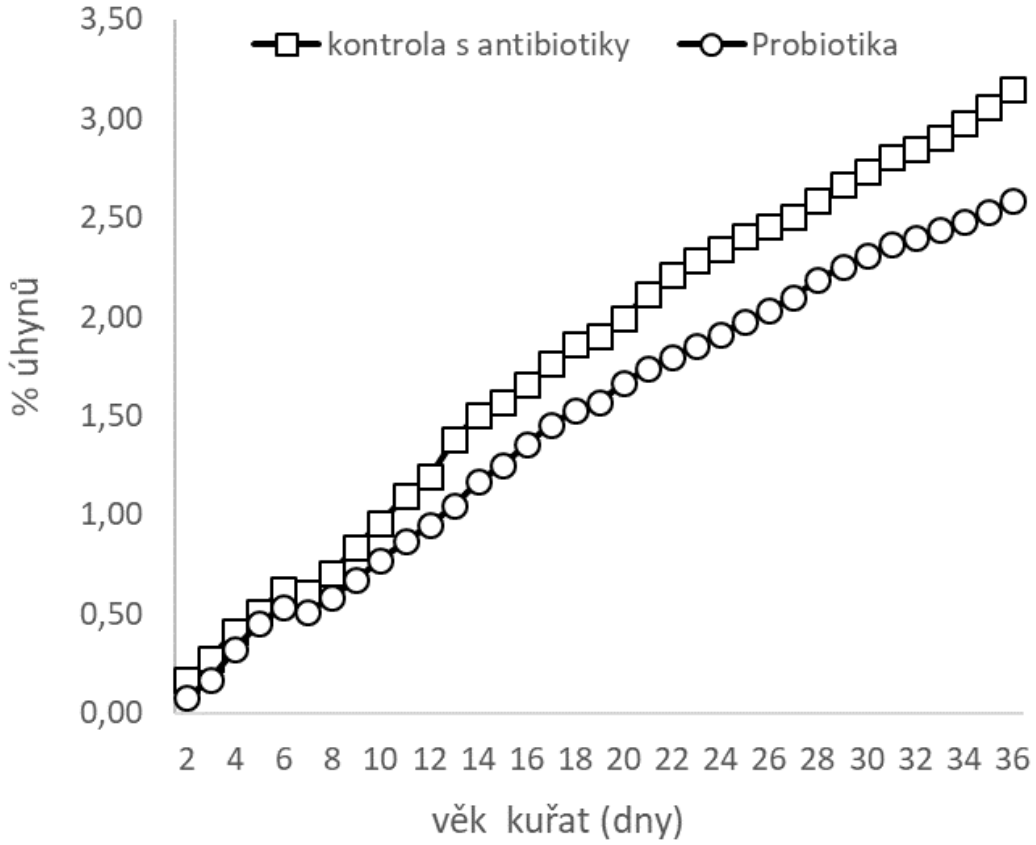
Obr. 2B


E. coli
% E. coli z celkové mikroflóry
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
*
*
kontrola
Probiotika
kontrola
Probiotika
kontrola
Probiotika
kontrola
Probiotika
Den 8
Den 12
Den 22
Den 29

Obr. 3


4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
% úhynu
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31
Věk kuřat (dny)
Probiotika
Antibiotika
Kontrola

Obr. 4


kontrola s antibiotiky
Probiotika
% úhynů
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36
věk kuřat (dny)

Obr. 5

SEQUENCE LISTING

<110> Vyzkumny ustav veterinarniho lekarstvi, v. v. i.

<120> Probiotic preparation for poultry

<130> P

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> forward primer

<400> 1
tataccatgc acgatgaacc
20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> reverse primer

<400> 2
aaataccttc ttccctcacg
20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> forward primer

<400> 3
gatgcggtcc gtgtaaagtt
20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>

<223> reverse primer

<400> 4
gtcggcagtg aggaatttgt
20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> forward primer

<400> 5
acgtcaacga agccgaatac
20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> reverse primer

<400> 6
cgacgaccat gaactgaatg
20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> forward primer

<400> 7
gggcatttcc ccgtatttat
20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> reverse primer

<400> 8
gtatactcgc ccaggttcca
20

<210> 9
<211> 1529
<212> DNA
<213> Bacteroides caecicola

<400> 9
attttacaat gaagagtttg atcctggctc aggatgaacg ctagctacag gcttaacaca 60

tgcaagtcga ggggcagcat gtatctggct tgccagatac gatggcgacc ggcgcacggg 120

tgagtaacgc gtatccaacc tgccccgtac acggggatag ccttccgaaa gggagattaa 180

tacccgatga tgtcaggagt tcgcatgtaa acctgactaa agttattacg gtacgggagg 240

ggggtgcgtt ccattaggta gtaggcgggg taacggccca cctagccgac gatggatagg 300

ggttctgaga ggaaggtccc ccacattgga actgagacac ggtccaaact cctacgggag 360

gcagcagtga ggaatattgg tcaatggccg ggaggctgaa ccagccaagt agcgtgaagg 420

atgacggccc tacgggttgt aaacttcttt tatgcgggat taacgtgagg tacgtgtacc 480

ttcttgcagg taccgcatga ataagcatcg gctaactccg tgccagcagc cgcggtaata 540

cggaggatgc aggcgttatc cggatttatt gggtttaaag ggagcgcaga cggcatgtca 600

agtcagctgt gaaagttcgg ggctcaacct tggaattgca gttgaaactg gcgtgcttga 660

gttcggtcga ggcaggcgga attcgtggtg tagcggtgaa atgcttagat atcacgaaga 720

accccgattg cgaaggcagc ttgccaggcc tggactgacg ttgaggctcg aaggtgcggg 780

tatcgaacag gattagatac cctggtagtc cgcacggtaa acgatggata ctcgctgtcg 840

gcgatacacg gtcggcggcc aagcgaaagc gttaagtatc ccacctgggg agtacgccgg 900

caacggtgaa actcaaagga attgacgggg gcccgcacaa gcggaggaac atgtggttta 960

attcgatgat acgcgaggaa ccttacccgg gcttgaactg tgcctgactg cctcagagat 1020

ggggcttcca gcaatggcag gcatggaggt gctgcatggt tgtcgtcagc tcgtgccgtg 1080

aggtgtcggc ttaagtgcca taacgagcgc aacccctccc gccagttgcc atcaggtaaa 1140

gctgggcact ctgggggcac tgccaccgca aggtgtgagg aaggtgggga tgacgtcaaa 1200

tcagcacggc ccttacgtcc ggggctacac acgtgttaca atgggaggtc acagagggct 1260

gctacccggc gacgggacgc caatccccaa accctccctc agtacggact ggagtctgca 1320

acccgactcc acgaagctgg attcgctagt aatcgcgcat cagccacggc gcggtgaata 1380

cgttcccggg ccttgtacac accgcccgtc aagccatgaa agccggcggt gcctgaagtg 1440

cgtaaccgca aggggcgccc tagggtaaag ccggtgattg gggctaagtc gtaacaaggt 1500

agccgtaccg gaaggtgcgg ctggaacac 1529

<210> 10
<211> 1526
<212> DNA
<213> Bacteroides caecigallinarum

<400> 10
attttacaat gaagagtttg atcctggctc aggatgaacg ctagctacag gcttaacaca 60

tgcaagtcga ggggcagcgg gaaggaagct tgctgaaatt gccggcgacc ggcgcacggg 120

tgagtaacgc gtatccaacc ttccgtttac tcagggatag cctttcgaaa gaaagattaa 180

tacctgatag tatggtaaga ttgcatgata gtaccattaa agattcatcg gtaaacgatg 240

gggatgcgtt ccattaggta gtaggcgggg taacggccca cctagcctac gatggatagg 300

ggttctgaga ggaaggtccc ccacattgga actgagacac ggtccaaact cctacgggag 360

gcagcagtga ggaatattgg tcaatgggcg cgagcctgaa ccagccaagt agcgtgaagg 420

atgaaggttc tatggattgt aaacttcttt tataagggaa taaagtgctt tacgtgtaga 480

gttttgtatg taccttatga ataagcatcg gctaactccg tgccagcagc cgcggtaata 540

cggaggatgc gagcgttatc cggatttatt gggtttaaag ggagcgtaga cgggatgtta 600

agtcagctgt gaaagtttgg ggctcaacct taaaattgca gttgaaactg gcgttcttga 660

gtgcggtaga ggcaggcgga attcgtggtg tagcggtgaa atgcttagat atcacgaaga 720

actccaattg cgaaggcagc ttgctggagc gtaactgacg ttgatgctcg aaagtgtggg 780

tatcaaacag gattagatac cctggtagtc cacacggtaa acgatggata ctcgctgttg 840

gcgatatacg gtcagcggcc aagcgaaagc attaagtatc ccacctgggg agtacgccgg 900

caacggtgaa actcaaagga attgacgggg gcccgcacaa gcggaggaac atgtggttta 960

attcgatgat acgcgaggaa ccttacccgg gcttaaatta tgcatgaatg atctggagac 1020

agatcagccg caaggcatgt atgaaggtgc tgcatggttg tcgtcagctc gtgccgtgag 1080

gtgtcggctt aagtgccata acgagcgcaa ccctttctgc cagttactaa caggcaatgc 1140

tgaggactct ggcggtactg ccatcgtaag atgtgaggaa ggtggggatg acgtcaaatc 1200

agcacggccc ttacgtccgg ggctacacac gtgttacaat ggggggtaca gaaggcagct 1260

taccggcgac ggttggccaa tcccgaaagc ccctctcagt tcggactgga gtctgcaacc 1320

cgactccacg aagctggatt cgctagtaat cgcgcatcag ccacggcgcg gtgaatacgt 1380

tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaag ccatgaaagc cgggagtacc tgaagtgcgt 1440

aaccgcaagg agcgccctag ggtaacactg gtaattgggg ctaagtcgta acaaggtagc 1500

cgtaccggaa ggtgcggctg gaacac 1526

<210> 11
<211> 1541
<212> DNA
<213> Megasphaera sp.

<400> 11
tatcatggag agtttgatcc tggctcagga cgaacgctgg cggcgtgctt aacacatgca 60

agtcgaacgg gaggacatgg gaagcttgct tcctatggac tctagtggca aacgggtgag 120

taacgcgtaa gcaacctgcc ctccggatgg ggacaacagc tggaaacggc tgctaatacc 180

gaatacgttt ccactgccgc atggcagtgg gaagaaaggt ggcctctgaa tatgctaccg 240

ccgggggagg ggcttgcgtc tgattagcta gttggagggg taacggccca ccaaggcgac 300

gatcagtagc cggtctgaga ggatgaacgg ccacattgga actgagacac ggtccagact 360

cctacgggag gcagcagtgg ggaatcttcc gcaatgggcg aaagcctgac ggagcaacgc 420

cgcgtgagcg aagacggcct tcgggttgta aagctctgtt atacgggacg aacggctagt 480

gtgccaatac cacattagaa tgacggtacc gtaagagaaa gccacggcta actacgtgcc 540

agcagccgcg gtaatacgta ggtggcaagc gttgtccgga attattgggc gtaaagggcg 600

cgcaggcggt ttcataagtc tgtcttaaaa gtgcggggct taaccccgtg aggggacgga 660

aactgtgaga ctggagtgtc ggagaggaaa gcggaattcc tagtgtagcg gtgaaatgcg 720

tagatattag gaggaacacc agtggcgaaa gcggctttct ggacgacaac tgacgctgag 780

gcgcgaaagc caggggagcg aacgggatta gataccccgg tagtcctggc cgtaaacgat 840

ggatactagg tgtagggggt atcgacccct cctgtgccgg agttaacgca ataagtatcc 900

cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag 960

cggtggagta tgtggtttaa ttcgacgcaa cgcgaagaac cttaccaagc cttgacattg 1020

agtgctatcc tcagagatga ggagttcttc ttcggaagac gcgaaaacag gtggtgcacg 1080

gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccccta 1140

tcttctgttg ccagcgcgtc atggcgggga ctcaggagag actgccgcag acaatgcgga 1200

ggaaggcggg gatgacgtca agtcatcatg ccccttatgg cttgggctac acacgtacta 1260

caatggctct taatagaggg aagcgaagga gcgatccgga gcaaacccca aaaacagagt 1320

cccagttcgg attgcaggct gcaacccgcc tgcatgaagc aggaatcgct agtaatcgca 1380

ggtcagcata ctgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtac acaccgcccg tcacaccacg 1440

aaagtcattc acacccgaag ccggtgaggt aaccttacgg agccagccgt cgaaggtggg 1500

ggcgatgatt ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgtatc g 1541

<210> 12
<211> 1536
<212> DNA
<213> Mediterranea sp.

<400> 12
actttacaa tgaagagttt gatcctggct caggatgaac gctagctaca ggcttaacac 60

atgcaagtcg aggggcagcg ggattgtagc aatacaattg ccggcgaccg gcgcacgggt 120

gagtaacacg tatccaacct tccggttact cggggatagc ctttcgaaag aaagattaat 180

acccgatagt ataagatttc cgcatggttt tcttattaaa gattcatcgg taaccgatgg 240

ggatgcgttc cattagatag taggcggggt aacggcccac ctagtcgacg atggataggg 300

gttctgagag gaaggtcccc cacattggaa ctgagacacg gtccaaactc ctacgggagg 360

cagcagtgag gaatattggt caatgggcga gagcctgaac cagccaagta gcgtgaagga 420

tgactgccct atgggttgta aacttctttt atacgggaat aacatcatcc acgtgtgggt 480

gtctgcatgt accgtatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtaatac 540

ggaggatgcg agcgttatcc ggatttattg ggtttaaagg gagcgtagac gggtccttaa 600

gtcagttgtg aaagtttgcg gctcaaccgt aaaattgcag ttgatactgg ggaccttgag 660

tgcggcagag gcaggcggaa ttcgtggtgt agcggtgaaa tgcttagata tcacgaagaa 720

ctccgattgc gaaggcagct tgctggaccg taactgacgt tgatgctcga aagtgcgggt 780

atcaaacagg attagatacc ctggtagtcc gcacagtaaa cgatgaatac tcgctgttgg 840

cgatatactg ccagcggcca agcgaaagcg ttaagtattc cacctgggga gtacgccggc 900

aacggtgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggaaca tgtggtttaa 960

ttcgatgata cgcgaggaac cttacccggg cttgaactgc agcggaatgg cgtggaaaca 1020

```
tgtcagcgag caatcgccgc tgtggaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga  1080
ggtgtcggct taagtgccat aacgagcgca acccttaccg atagttgcca tcaggtaacg  1140
ctggggactc tatcgggact gccgtcgtaa gatgtgagga aggtggggat gacgtcaaat  1200
cagcacggcc cttacgtccg gggctacaca cgtgttacaa tgggggggtac agcaggccgc  1260
taccgggcga ccggatgcca atccctaaaa cccctctcag ttcggactgg agtctgcaac  1320
ccgactccac gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcatca gccacggcgc ggtgaatacg  1380
ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcaa gccatgaaag ccgggggtac ctgaagtgcg  1440
taaccgcaag gagcgcccta gggtaaaact ggtgattggg gctaagtcgt aacaaggtag  1500
ccgtaccgga aggtgcggct ggaacacctc ctttct                            1536
```