

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

36 679

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/741 (2015.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2022-40189**
(22) Přihlášeno: **30.08.2022**
(47) Zapsáno: **13.12.2022**

- (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
MVDr. Jiří Volf, Ph.D., Brno, Řečkovice, 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
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

- (54) Název užitého vzoru:
Probiotická směs pro novorozená selata

Probiotická směs pro novorozená selata

Oblast techniky

Předkládané technické řešení poskytuje probiotický přípravek pro zlepšení fyziologických a imunitních vlastností trávicího traktu prasete domácího *Sus scrofa* prostřednictvím osídlení směsí prospěšných bakterií.

Dosavadní stav techniky

Selata v produkčních chovech ihned po narození přichází do styku s mikroflórou prasnice a stájového prostředí. Součástí této mikroflóry jsou jak komenzální, tak patogenní bakterie. Časná interakce mezi komenzálními a patogenními bakteriemi může anebo nemusí vést k úhynům v prvních dnech života. Skladba střevní mikroflóry sajících selat je do značné míry předurčena jejich mléčnou výživou. Bakterií vhodných pro trávení mléčné diety je však v trusu prasnice a stájovém prostředí málo, a proto osídlení trávicího traktu selat vhodnou mikroflórou trvá i několik dní. Po tuto dobu nejsou selata přirozeným způsobem chráněna a v trávicím traktu může dojít k pomnožení nežádoucích bakterií jako například *Clostridioides difficile* a *Clostridium perfringens*. Nežádoucí je i vysoký podíl *Escherichia coli*, z nichž některé kmeny mohou enteropatogenní. Výsledkem pak jsou průjemovitá onemocnění spojená se zvýšenými úhyny.

K předcházení klinických příznaků průjemových onemocnění novorozených selat se často používá preventivní aplikace antibiotik ihned po narození. To je v rozporu se současným trendem snižování spotřeby antibiotik. Proto se hledají jiné cesty, jak zabezpečit správný rozvoj střevní mikroflóry selat, který přirozeným způsobem potlačí multiplikaci nežádoucí flóry.

Podstata technického řešení

Cílem bylo vybrat, připravit a otestovat účinnost probiotické směsi snižující úhyny novorozených selat a potlačující výskyt patogenních klostridií a *E. coli* ve střevním obsahu sajících selat. V rámci předkládaného technického řešení bylo studováno více než 100 různých bakterií, které původci technického řešení postupně izolovali z trávicího traktu prasat a stanovili u nich kompletní sekvenci genomu. Z nich původci technického řešení vybrali zástupce rodu *Bacteroides*, a to takové druhy, které jsou charakteristické pro střevní mikroflóru sajících selat a současně jsou velmi nízké zastoupení ve střevní mikroflóře dospělých prasat včetně prasnice.

Při studiu rozvoje střevní mikroflóry sajících selat původci zjistili, že první 3 až 4 dny života se ve střevní mikroflóře selat i bez zjevných klinických příznaků běžně vyskytují patogenní klostridie. Ke snížení jejich výskytu docházelo okolo 4. dne života, právě v době, kdy docházelo ke zvýšení přítomnosti zástupců rodu *Bacteroides*. Negativní korelace mezi přítomností patogenních klostridií a *Bacteroides* původce proto vedla k myšlence využít zástupce rodu *Bacteroides* jako probiotika pro osídlení novorozených selat. Navíc prasnice ve své střevní mikroflóře mají nízké zastoupení bakterií z rodu *Bacteroides* (nahrazují je zástupci příbuzného rodu *Prevotella*) a proto se nemusí chovat jako optimální zdroj těchto bakterií pro sající selata. Podání směsi bakteriálních kultur několika zástupců rodu *Bacteroides* novorozeným selatům tak povede k rychlejšímu vývoji žádoucí střevní mikroflóry sajících selat, která by zabránila pomnožení patogenních mikroorganismů.

Předkládané technické řešení proto předkládá probiotický přípravek, který vyhovuje výše uvedeným požadavkům. Obsahuje více než jednu bakterii, které jsou charakteristické pro sající selata, ale přesto si zachovává jednoduché, technicky realizovatelné, složení. Přitom zajistí efektivní osídlení trávicího traktu selat od prvních dnů života, sníží přítomnost nežádoucích

bakterií v trávicím traktu, sníží úhyny a sníží potřebu terapeutického použití antibiotik pro korekci zdravotního stavu selat.

5 Předmětem předkládaného technického řešení je tedy probiotická směs vhodná pro podání novorozeným selatům, která obsahuje jako účinnou složku čtyři různé bakterie, a to *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus* a *Bacteroides xylanisolvens*.

10 Ve výhodném provedení je předmětem předkládaného technického řešení probiotická směs vhodná pro podání novorozeným selatům, která obsahuje jako účinnou složku čtyři různé bakterie, a to *Bacteroides fragilis* CAPM 7018, *Bacteroides thetaiotaomicron* CAPM 7019, *Bacteroides vulgatus* CAPM 7020 a *Bacteroides xylanisolvens* CAPM 7021. Všechny uvedené kmeny byly uloženy ve Sběrce zoopatogenních mikroorganismů (Collection of Zoopathogenic Microorganisms, CAMP), Hudcova 70, 621 00 Brno.

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

20 - Vybrané druhy odpovídají druhům, které se nejčastěji vyskytují ve střevní mikroflóře sajících selat.

20 - Všechny izoláty byly původně izolovány od selat a u všech kmenů byla stanovena úplná sekvence jejich chromozómu.

25 - Znalost úplné genomové sekvence umožnila zařadit do probiotického preparátu jen kmeny, které nepřenášejí žádné známé geny pro rezistence k antibiotikům, které se vyskytují u bakterií rodu *Bacteroides* (zejména geny *tetQ* a *linA*). Kmeny v probiotickém preparátu tedy nejsou přenašeči žádných známých, horizontálně přenositelných, rezistencí k antibiotikům.

30 - Znalost celogenomové sekvence umožnila připravit pro každý kmen přísně specifické PCR pro jejich detekci a kvantifikaci v trusu selat nebo libovolném dalším biologickém vzorku.

30 - Jedná se komplexní směs 4 jasně definovaných bakterií.

35 - Všechny bakterie patří za předpokladu dodržení anaerobní kultivace mezi in vitro poměrně snadno kultivovatelné.

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

40 - Jejich striktně anaerobní povaha je činí relativně bezpečnými, protože po 24hodinové inkubaci na vzduchu se jejich životaschopnost blíží k nule.

40 - Bakterie ze směsi účinně osídlují trávicí trakt selat po jednorázové aplikaci.

45 - U ošetřených selat se v menší míře vyskytují patogenní nebo oportunně patogenní bakterie původem z prostředí, jako je *Escherichia coli* nebo *Clostridium perfringens*.

45 - U ošetřených selat je nižší potřeba terapeutického užití antibiotik za účelem korekce zdravotního stavu.

50 Probiotickou směs podle technického řešení lze podávat selatům kdykoli v průběhu života. Nejvýhodnější je však její podání selatům bezprostředně po narození. Směs je proto určena zejména k aplikaci jednodenním selatům nebo selatům ve věku 1 až 5 dnů, výhodněji 1 až 3 dnů. Směs lze podávat orálně v pitné vodě. Probiotická směs byla otestována jako zcela bezpečná pro novorozená selata. Při testování bylo zjištěno, že po orálním podání novorozeným selatům tvoří

- baktérie z probiotické směsi přibližně 20 % z celkové střevní mikroflóry čtyřdenních selat. Baktérie z probiotické směsi ze střevní mikroflóry vytlačily baktérie, které mohou způsobovat záněty a nežádoucí fyziologické stavy, jako je *E. coli* *Clostridium perfringens* nebo *Clostridium difficile*. Probiotická směs podle technického řešení při testování nevykazovala žádné negativní vlastnosti, a naopak chránila selata před úhyny a snižovala potřebu terapeutického užití antibiotik. Předkládaná probiotická směs je proto velmi vhodná pro použití jako probiotický preparát pro selata, který účinně zlepšuje zdravotní stav a fyziologické vlastnosti selat bez nežádoucích vedlejších účinků a omezuje tak potřebu použití antibiotik.
- Přípravek je s výhodou formulován pro orální 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 původu 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, výhodněji 10^7 až 10^9 CFU, na mililitr tekutého produktu každé z obsažených bakterií. 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 prasat *Sus scrofa*. Zlepšení imunity a/nebo fyziologických vlastností s výhodou zahrnuje prevenci infekcí trávicího traktu drůbeže patogeny, zejména patogeny *E. coli* anebo *Clostridium perfringens* anebo *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 během prvního dne života selat s výhodou mezi 8 až 12 hodinami po porodu.

Objasnění výkresů

- Obrázek 1. Druhové složení 11 nezávislých šarží probiotického preparátu.
- Obrázek 2. Účinnost kolonizace trávicího traktu sajících selat bakteriemi z probiotického preparátu. Selata ošetřená dávkou probiotických bakterií první den života měla 5 dní po aplikaci zvýšené množství probiotických bakterií v trusu.
- Obrázek 3. Výskyt *Clostridium perfringens* a *Clostridium difficile* u sajících selat přes všech šest nezávislých opakování. Aplikace probiotického preparátu snižovala výskyt patogenních klostridií ve srovnání s kontrolními neošetřenými selaty.
- Obrázek 4. Výskyt *Escherichia coli* ve střevní mikroflóře sajících selat. Nejvyšší zastoupení *E. coli* bylo zaznamenáno u kontrolních selat. Podání probiotického preparátu vedlo ke snížení zastoupení *E. coli* ve střevní mikroflóře sajících selat.
- Obrázek 5. Terapeutické užití antibiotik u probiotických a kontrolních selat. Zdravotní stav kontrolních selat vyžadoval u 58 % z nich použití antibiotik. Podání probiotické směsi snížilo nutnost použití antibiotik ve všech sledovaných turnusech. V průměru se i u probiotiky-ošetřených selat použila antibiotika ve 29 % případů. To však představuje snížení spotřeby antibiotik na polovinu.

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Identifikace a izolace vhodných bakteriálních druhů specifických pro mikrobiotu selat

- Na základě předběžných poznatků a úvah byly bakterie adaptované na novorozená selata vybírány ze zástupců rodu *Bacteroides*. Na druhy z tohoto rodu se zaměřila následná kultivace, která byla prováděna z trusu selat naředěného 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). Jednotlivá ředění byla vyseta na Wilkins-Chalgren (WCHA) agar a inkubace probíhala v anaerobní atmosféře sestávající se z 10% CO₂, 5% H₂ a 85% N₂ po dobu 72 hodin při 37 °C. Z narostlých kolonií byl alikvot resuspendován v 1,0 ml BHI bujony 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. Se znalostí celogenomové sekvence byly identifikovány geny specifické pro každou z uvedených bakterií a na ně byly zacíleny Sybr Green real time PCR pro detekci a kvantifikaci cílových bakterií v libovolném typu vzorků, zejména však v trusu ošetřených selat s využitím následujících specifických primerů:

Cílový druh	Forward primer	Reverse primer
<i>Bacteroides vulgatus</i> CAPM7020	atagttggtgcaagcggagg (SEQ ID NO. 1)	tcctgagcattccaagtccg (SEQ ID NO. 2)
<i>Bacteroides fragilis</i> CAPM7018	caacgacacaacagcttccg (SEQ ID NO. 3)	tcgagtcattcgctccaac (SEQ ID NO. 4)
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> CAPM7019	gttgctcccatgttgacgag (SEQ ID NO. 5)	gccataagccgagcaatgag (SEQ ID NO. 6)
<i>Bacteroides xylanisolvens</i> CAPM7021	ctaccgttatcgcaacctcg (SEQ ID NO. 7)	gacagctcccatccatcacg (SEQ ID NO. 8)
Eubakteriální 16S rRNA	tcctacgggagggcagcag (SEQ ID NO. 9)	cgtattaccgcggtgct (SEQ ID NO. 10)

Cílové sekvence pro primery jsou následující (místa, kde primery přiléhají, jsou vyznačena tučnými velkými písmeny):

Bacteroides vulgatus CAPM 7020

FIG00407595: hypotetický protein

atgaaacgaaaacactaaaagaaaatttctattgttgccatttttagttttgtcagtatgatagtttcatgttggaagatgaatggtctcc
aatgtaactgatgaagtatttttgacagcaataaagaattgaccattgctaagcagaacaatggtataatgccaccaatcctcagctactac
agttagatccttaagtgtgacggcggaattccagcaaaagcctaattggaacaaggcctaagaaagtagaaaaggagatttagaggtagttg
aaacgactctaataagcggtagtacattttttatggataacgaaacaaaagaaaatatgaactacaagatgattggataaaatatataat
gtagtacgcatggtaatattgaagaatctagaacaggtgagatttacaacttcacatggtattcataggtacttatgattttgatgcatacca
cctctttgaaaacaattcttattacatcgtaagctgattttgatggaaaagtttattctacaatttcaattatggattggtaaatggttgaaatat
gaatcagggaataaacagcctcatttccgggaacagaggaaggataccgtatgagttgcaaagaggaagaggacaatccgtatgta
atacggaaatagactggtggaagcgggaattgtcataatgatcgtttggatcatgaactggggctgcccggcatcgatgaatttgcg
acaagtatttacatcctgagtatcatgaagtttgcgtttcattggatgatgacgaaatggatggcggagggtggtggatataatcctccttcaaac
ctcctgaacacctctactcctgttaaacgtgctaaacattgtcgcaggacgcagcatttaaatcggtataaaagatgtgtatagaaaaac
attttctgcaggcaatactgtggagcaaggctttatcacagacttcagacgggcaactattttccgaacgtacaagaatcagggaagtgc
aatcacaatgatcaaatgacaggaaaagaatcatggaatggtaccattcccacccacaggtctatgattactcatgggcagatttaaag
gcttttagctatacagatacaacagggatgtgagatcagagaattttacttatggaattgttcaacggtttggtgctgagtatcatgataactc
tccggtagatttcaatgcttttctactaaagttagaatggtgaactttccgaaagttggaacgcttatATAGTTGGTGCAAGC

GGAGGgggagttgatgaatgtataggtcagttgcttaatttttagatcgcaataactccggtctgtcagtgatgttagttcgaatattgatg
aaagcaat**CCGACTTGGAATGCTCAGGA**actagcttctaattgggaaatctgtaaatatggaatgaaccaataa (SEQ
ID NO. 11)

5

Bacteroides fragilis CAPM 7018

Fe(III) ABC transportér, periplasmatický železo-vážíci protein (Iron(III) ABC transporter
periplasmic iron-binding protein)

Atgatgaaccgatcttcttttattcttttgtactaatatcatttctgtcactgcttgcacaaagaaagcagaaagcaactcactgtcgaagaag
gtgtccggccctcttcatatgcagaaggattcgggaataacacattctcctgaatacactacagtaacagtatataatccctggaaa
10 ccgggagagacatgatatactatttctgtgaaaaccgaagatcagcctgtccctgccacgggtcacaaaatagtgatccactaaaaagt
attatgaccaactcagctactcatttgggggttctgaacttctgggggaattgcataaagtacaggggtgtgcaactcggcctatattfacaat
cctaccattctgcaaggtgtcaaaagagggtaaaaataaagatttgggcgatgcttcaatctggacatagaaaacttactttattacaccaca
ggcgtaatgacttctgcctacaataaccgaagacgaaaacagccgacgtatgaaacaaacgggattgcctatcctatataatattgaatggca
15 agaaaaatctattctgggacgtgcagaatggattaaattgtcggagccctttcgacaaagaagcattggctgacagcattttcgggcaata
gcaaaacaatacaatgaagtaaaaaagagtgcgagaaatttctatagcgcttctatacttccgggcaagattacagggaacctgtgt
atgccgggaggaagaagctatagtcacaacttctccgatgcaggtgccaaactattatgc**CAACGACACAACAGCT**
TCCGgtagtataatccagcaatattgaagaagctctgatacatttcaaccaagctgacatatgggtaggcgtagaagccaatacttggaaag
a**GTTGGGACGAATGGACTCGA**aatacaaaactattcaaatcatataaagacggcaatgtataccatataaacaagcggg
20 caaatgctactggtgaaatgactattgggaaagtggagtagctgcctcgatctattattgagtatatgatcaagatcggtcatccgacacta
ttgcctgactacgagttactacatggataaattaagaagtgaatga (SEQ ID NO. 12)

Bacteroides thetaiotaomicron CAPM 7019

25 pravděpodobná sulfatáza atsG (probable sulfatase atsG)

atgaataattcaaatctaattaaaata**GTTGCTCCCATGTTGACGAG**tattttatcgtgcagcaaacaggagtgaagagata
gtcatcaatcatccaaggaggtgagaagtactccaaatatattgttgcattgctgacgatcaatctttcc**CTCATTGCTCGGC**
TTATGGCaattcttttgaagactccggcatttgattatagctagccagggatgctgttcagaatgcttatgtgacatcctcgggtag
30 tagtcttccagagcatctattttatcaggaatgtatccttggcaataaaggaggcaggaactcattgttcattttccaaaagatagtttgc
atacagatattctgactgctaattggtataacgtaggttatactggttaaggggtgggcaccaggcgattgtaaggaaagaggggtaaatccg
caggaaaagcttttaataagaaaaaactgacccctccctatagtggtacataccaatatagactatgttgaacttttaattgtttatcaagatag
cgataaaaaacaaccattctgttttgggtaggctttaatgaaccacatagaggtttgaacgtgattcatggcagaaagagaataaatcactct
caatcgtagtgtagccgggttcttgcctaatacatgatgttgaagggtgattattggactattcggtagaaatagaatcaggatgcacaatta
35 caaaagataaattgatttctgaaggaaaaagggttgttgataatacattgattatagtgactgctgataacgggtatggctttccaaatgcaaaag
ctacctgttacgatgccgggtacatgttccattagccatctgttggggagacaagataaaaagaaagaatactagcgaaattgttagtctgta
gattttgctccaacgatgttgacgcagcaggtataaatcgttctcctatgggcacatgtcaggcaaaagtatgttgcctttctaatggaagaa
aaagaacagaaaagagaagctgtctattttggaagagaagacatagctcttcacggtagtcaaacttaggttatccaataagaagccttaga
aaaggaaattattgtatataaggaactttcatccggaaagatggccagcaggtgatccgacaccttggataaaaaacaatttggcaag
40 gccctattctggtatttcgatatagacgggtcacctactaagcagtttttataataacagggagaatggcgatggtgtacaattttcatccgtac
tgtcgggttcagaccttataggagttatataacattgagaatgatccctgttcttgataaattgattgaaaaaccagaatataagggtgtattgt
cagagttaagaggcagattggatcagttactatatcagacgaatgatgaagagtaactccgaaaagggggacagtatttgggaatcatac
cacgaatagatagataaggaatttctcctcatgagtag (SEQ ID NO. 13)

45 *Bacteroides xylanisolvens* CAPM 7021

C-terminální část dvoukomponentního systémového senzoru hybridního regulátoru odpovědi /
histidin kinázy (C-terminal part of two-component system sensor histidine kinase/response
regulator hybrid)

50 Atgaccaaagctaaattcttgttattgctgttcataatcgggactttgttgcattggcaaatgtgacgaaggatatcaatatcgctttaagg
acgtaaggcagggactttctcatcaaacagtcattgtttctatcaggatgaattcggatttttggatcggcactcaagacgggctgaaccg
atttgacggacgtaagtttgaagtattcaaacgggataacgctaattcattccatcaatatcaataatcaggcagggttgcggaaataaagc
cggattgctctttatccgtagtgttcagagcgtgactttatgatatgcgtttgaatcgttttaggggtgttgcgtgaaggagaagtgcgggaatc
tgttatgcgcacgatgcattatggatagctaccggaaaggaaat**CTACCGTTATCGCAACCTCG**accaggcgccccgag

ttattcttttcatttccttcggatgaggaggatgtattgatgaacagtcctcatggttcgtcagaatcagacagtgggtgggtacttcttcgaaag
 gtgtatactgcatcgaccagtctgcacatatcaccgg**CGTATGGATGTGGGAGCT**
GTCaattcaataacagaagatagaacgggagtagtctggatagctaccagaaacagagggctacacgggttgatgaagatggaacact
 tactcatttcaagcataataaggtagctgaaaatcagattaaccataataatgtgcgtcatgtgacgcaagctaagtatgctcgtatatacgg
 5 aacctatgccggtttgcagactttaacctgtttaccggagagtttacagattatgaatatgacttgaatgtggaggcgccgatatacgttccat
 tatttcgatgcattatgacacttcggggactttatggttggggactttctatcagggaatc caatattataatgtagcgaatgatgcttccatttta
 ccgctcgtctacggctgttggcggtcatttgaattcttataattatcagttccattggcgaagaccgttccggccggatctggttgcagtgaaagg
 aagcgggttgaaactattatgataaacataccaaacgcttttcccttaaaaaaggtctattctcaagagctttctttaagatagtgaaagtcttcta
 ttatgagaaagagccggtattatcttggtagcttcttctatcagggaatcaaccggattaatctgtcgaccggacatatagaatctatctcgga
 10 aaacatctatactccggaaggaaaaacagttgttgacagagcctataatctgtgtgaaaatgataagagtttccggccacgattcttattgatag
 ctgccaaaggaggattgcttgtattggataaaaaacaccttcgacttcatcatttgcgaacaccttcgttggctgccaaacatctgtcgaggttt
 gggatgatgacgtttgacaaagacggggtattatggctgactaccttttgcgtatgatacagagtcacacacaaagcgggactgcccatagtta
 tctttttccaaaatagcgcagagcacagcgcagcatcatcaaccacattttatgtgataagaagacgtatatggctgggacgcagagg
 ctccgggaatttatctatttgataagaagacagattcttttggggatagcggagcgaacagggttggaatggattataaccggattggtgg
 15 agagtcctttggatggttctatctatgtggcaaccaatggtggtttcttaaatcaacctggcaacgactacattcgagaactataacagacag
 agtgatfttcccttgaataatgtaaatgacggagggtctgtatattgcgtccgaccacgataattacgtgtgtgtgctggcggttattgtctctatcg
 ccaggaagagctgaacaagcagctgtgtgactatgatgtgttgaacagggtgctgtgtgataatagcgaataacacgcttgattcgtt
 ggggcttatcaagaaacgattgtatgaacatcggttagtattgcgcccagatattcttccgtcacttttgagatagcaagtaaacacctga
 ataattttctaatacggctgtggaataaaactgaaggctttgacaacgaatatatgaaggcgggcgataataaatgattacataccaatc
 20 ttcatccggggcattatactttccatgtccgtggcgaccaggtggcggttcacggtcgggaagcaccttccgttagtttgagctgatagtgga
 ggctccgggttatcagcgggcatggtttatttgcgtatggtgctgacagctatccttattgcccgtatattatccgtatgttctggatacga
 aactttgcggcactcttattggccgagaaacgggaaaaagagtatatcgaaagtgtgaaccagtccaaactgcgtttcttaccatgtatcgc
 atgaattccgtactccgttaacacttatatccagccagctcgaatgctcctgatgcataaggacattattcctgaagtataataagattctgga
 tatttataaaaaattccgcccggatgaataacctcgtggatgaagtcattgatatacgaagcaggatcagggaacttgaaactaaagattttta
 25 aagagaatattgtggcggtgatagaggaaattgtggttcttctatagttatgcccactgaataagatagatctccgcttttcttccactctgaa
 agaagctgatttgcataattgacaaaacacagatagagaaagtattctataatttattgtccaacgctttaaagtatacgaagcctggtgactggatt
 tctgttgagctgtcagcgggaaggagataatgacattgtgattcagtcacaacacctggggtaggcattgataaatccaagatcaaacatgat
 ttgaacgggtttggcaggatgattcggcaacaaccacacgaactgtcaaaggatcgggcattggattggcgatggcgaaggaattgtaga
 gttgcatcagggaaccatcgagtggaagcgaaccgaatggagttaccttcttaccgttactctccaccgggatgcgaatatgaatatgga
 30 agtctcttccctccgacagcagcaggttccgaacattatataatagagcctcaagaaatctcggaatgtgaagccggataaaacgggtga
 aaatactgattgtagaagataaccggaaatgcgtaaagtattgacgcagattttgaacagatatagaggtatatacggctgcccagcggc
 aggaaggattggaacgggcttcttgcgtccaaaccgcagatgattgtaagtacgtcatgatgcctgtcatgtccggactggaaatgtgcgag
 aagttgaaaagtaatttcagaccagccatataacctgttcttgcgtacagcccgaaccgggaagaacatacttggaaaggcttgacagaca
 ggtgcccgtgattatctcctaaaccttttaatatcaagatattggttagcccggtgcaacaatatcattcagactcgtaaacacttcaacaacgg
 35 ttgttcgaaacgacgaacctaaagtggaaagaccttccgtttaatccgatcgataaaaagatgttgatggatgtacggcgattgtggaatctta
 tattgataaccagactttgacgtagctacttttcacgagaaatgtgtatgacgagaacgttgccttactaaattgaaagcattgaccggaca
 gaccgccgaatgactttattttatcttgagactgaaaaagcaacagaaaaattgcggaatgaccccaatgccctgattgctgatatagcatttg
 attacggtttttctaatacgaattttatccgggtgttttaaaatgcttatgatattactccggctgcttatagacggaaatatacaagctcttaa
 (SEQ ID NO. 14)

40 Pro normalizaci na celkový počet bakterií ve vzorku byla použita PCR s primery amplifikujícími
 část genu pro 16S rRNA všech bakterií. Po PCR se odečetla Ct hodnota amplifikace jednotlivých
 druhů *Bacteroides* od Ct hodnoty amplifikace bakteriální 16S rRNA (ΔC_t). Následně se na tento
 rozdíl umocnil základ 2 ($2^{\Delta C_t}$), vypočetla se převrácená hodnota ($1/2^{\Delta C_t}$) a výsledek se pro přepočet
 45 na procentuální zastoupení vynásobil číslem 100 ($100 \times 1/2^{\Delta C_t}$). Na závěr se tato hodnota
 vynásobila koeficientem 7, který představoval přibližnou korekci mezi průměrným počtem kopií
 genů pro 16S rRNA v bakteriálních genomech (který jsme používali pro normalizaci) a skutečností,
 že cílové geny se vyskytovaly v genomu *Bacteroides* pouze v jedné kopii. Tím se získalo
 zastoupení jednotlivých druhů rodu *Bacteroides* v celé bakteriální populaci v procentech.

50 **Příklad 2. Příprava probiotické směsi**

Všechny kmeny byly kultivovány 24 hodin na WCHA agaru (Wilkins Chalgren Agar, Oxoid) při
 37 °C v anaerobním kabinetu v atmosféře N₂, CO₂ a H₂. Po kultivaci byly jednotlivé bakteriální
 55 kultury smyty z povrchu agaru WCHB bujónem s 10% glycerolem. Kultury jednotlivých druhů

Bacteroides byly rozplněny v objemu 1 ml do 2ml kryozkumavek a zamrazeny při -80 °C jako master inokula pro další použití. Složení master inokula bylo postupně zkontrolováno negativním růstem v aerobním prostředí a sadou PCR specifickou pro všechny 4 druhy *Bacteroides*. Tím byla zajištěna absolutní kontrola nad složením master inokula všech probiotických kmenů.

5

V případě přípravy probiotické směsi se 1 ml master inokula každého druhu *Bacteroides* použil k zaočkování 750 ml kultivační pudy a inkuboval anaerobně v médiu bez živočišných proteinů (Pepton ze sójových bobů (enzymatický digestát), kyselý hydrolyzát sójového proteinu, kvasnicový extrakt) při 37 °C po dobu 48 hodin. Výsledná koncentrace bakterií ve fermentátu dosahovala hodnot 1×10^8 CFU/ml. Po fermentaci se spojily objemy všech 4 druhů a společně se peletovaly centrifugací při 8000 x g po dobu 20 min. Získaný pelet se v anaerobním boxu resuspendoval ve 100 ml veganBHI média s 10 % glycerolu. Z malého alikvotu (100 µl) se izolovala DNA za účelem stanovení poměrového složení jednotlivých druhů v probiotickém preparátu pomocí real time PCR (Obr. 1). Zbytek suspenze byl rozdělen do jednomililitrových alikvotů, které obsahovaly dostatečné množství probiotických bakterií pro ošetření 30 selat, tedy přibližně dvou vrhů, a byl uschován při -70 °C až do použití. Vzhledem k mírně odlišným růstovým schopnostem jednotlivých kmenů po spojení všech 4 samostatných kultur *B. thetaiotaomicron* tvořil okolo 21 %, *B. fragilis* 67 %, *B. vulgatus* 1 % a *B. xylanisolvens* 11 %.

20 Příklad 3: *Schopnost bakterií z probiotické směsi osídlivat trávicí trakt selat po jednorázové orální aplikaci*

Probiotická směs se skladuje a transportuje v zamraženém stavu při -70 °C. Před aplikací se směs rozmrazí a doplní 29 ml fyziologického roztoku. Novorozeným selatům se sterilní injekční stříkačkou aplikuje 1 ml probiotické směsi na kořen jazyka. O týden později byla v trusu pokusných a kontrolních selat stanovena přítomnost všech 4 kmenů rodu *Bacteroides* z probiotického preparátu a současně *Clostridioides difficile*, *Clostridium perfringens* a *Escherichia coli* pomocí real-time PCR.

30 Na farmě A bylo probiotickou směsí ošetřeno celkem 94 selat v šesti různých turnusech. Dalších 37 selat nebylo probiotiky ošetřeno. Selata, která byla ošetřena dávkou probiotických bakterií krátce po porodu, měla zvýšené množství probiotických bakterií v trusu (Obr. 2). Probiotické bakterie tedy po jednorázové aplikaci kolonizovaly trávicí trakt selat. Celkové množství (součet hodnot všech čtyř probiotických bakterií) bylo oproti neošetřené kontrole statisticky významně vyšší. Individuální rozdíly u sledovaných druhů *Bacteroides* však nebyly statisticky významné nebo byly na hranici významnosti. V prostředí stájí se běžně vyskytoval *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron* a *B. fragilis*, kteří se nacházeli i u kontrolních selat. *B. xylanisolvens* kolonizoval všechna selata v nejmenším rozsahu a byl jen v malé míře detekován v trusu kontrolních selat (Obr. 2).

40

Příklad 4: *Schopnost probiotické směsi snižovat výskyt patogenních klostridií v trávicím traktu selat ošetřených probiotickým preparátem*

Množství patogenních bakterií *Clostridioides difficile* a *Clostridium perfringens* bylo stanoveno 5. den po porodu v rektálním výtěru selat pomocí real-time PCR. U kontrolních selat bylo zaznamenáno vyšší zastoupení patogenních klostridií než u selat po podání probiotického preparátu (Obr. 3). Díky značné variabilitě dosáhlo toto srovnání signifikance pouze v jednom z šesti nezávislých turnusů. Jako statisticky nevýznamné dopadlo zhodnocení testování přes všech šest opakování. V terénních podmínkách však ne vždy musí být kontrolní skupina infikovaná patogenními klostridiemi a v případě kdy se *Clostridioides difficile* nebo *Clostridium perfringens* shodou okolností nevyskytnou v prostředí, nemůže se ochranný efekt probiotického preparátu projevit. I numerické snížení výskytu patogenních klostridií u ošetřených selat tak považujeme za pozitivní výsledek.

50

Příklad 5: *Schopnost probiotické směsi snižovat výskyt E. coli v trávicím traktu selat ošetřených probiotickým preparátem*

- 5 Podobně jako v případě klostridií byla zaznamenána i tendence ke snížení množství *E. coli* ve srovnání s kontrolní skupinou selat, přestože tento rozdíl nebyl statisticky významný za celé sledované období ani v jednotlivých turnusech (Obr. 4).

Příklad 6: *Schopnost probiotické směsi zlepšovat zdravotní stav a v důsledku snižovat spotřebu antibiotik*

- 10 Na farmě B byl sledován celkový zdravotní stav nepřímo přes potřebu korigovat nežádoucí zdravotní stav terapeutickým užitím antibiotik. Spotřeba antibiotik byla sledována ve 4 turnusech u kontrolních selat a u selat po podání probiotické směsi. V probiotické skupině bylo potřeba upravit zdravotní stav dodatečnou antibiotickou terapií u 29 % selat. U kontrolních selat
15 v závislosti na turnusu se potřeba antibiotické terapie pohybovala v průměru na 58 %. Podání probiotické směsi tedy zlepšilo zdravotní stav selat na farmě B do takové míry, že to vedlo ke snížení spotřeby antibiotik na polovinu (Obr. 5).

Závěry

- 20 Použitá probiotická směs pro novorozená selata podle předkládaného technického řešení je založena na vlastním pozorování negativní korelace mezi přítomností bakterií rodu *Bacteroides* u sajících selat a patogenních klostridií. Preparát se podává jednorázově, přirozenou orální cestou a vychází z poznatků o přirozeném osídlování trávicího traktu selat. V souladu s tím nebyly
25 zaznamenány žádné negativní reakce selat na podání preparátu, přestože byl podáván selatům v den porodu. Probiotický preparát nepředstavuje žádný lidmi uměle připravený produkt. Preparát urychluje a garantuje rozvoj střevní mikroflóry sajících selat správným a přirozeným směrem. Sající selata by dosáhla osídlení bakteriemi rodu *Bacteroides* i bez podání probiotického preparátu, což se každodenně v produkci prasat děje. Tuto skutečnost jsme zaznamenali i během testování,
30 kdy v 5 z 6 nedošlo k signifikantnímu snížení patogenních klostridií. Přesto nastávají situace, kdy se vývoj střevní mikroflóry selat opozdí a umožní rozvoj nežádoucí mikroflóry spojené s úhyny selat. V takovém případě podání probiotického preparátu na bázi bakterií rodu *Bacteroides* účinně chrání selata a snižuje ekonomické ztráty chovatelů. Preparát tak nabízí alternativu k podávání antibiotik. Protože se preparát sestává ze striktně anaerobních bakterií, je i bezpečný pro životní
35 prostředí. Baktérie z preparátu ztrácejí životaschopnost během 24hodinové expozice aerobnímu prostředí, a tak jejich nekontrolovatelné šíření v prostředí, včetně přenosu na necílové druhy, je jen velmi málo pravděpodobné.

NÁROKY NA OCHRANU

1. Probiotický přípravek pro novorozená selata, **vyznačující se tím**, že obsahuje jako účinnou složku směs bakterií *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus* a *Bacteroides xylanisolvens*.

2. Probiotický přípravek pro selata podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje jako účinnou složku směs bakterií *Bacteroides fragilis* CAPM 7018, *Bacteroides thetaiotaomicron* CAPM 7019, *Bacteroides vulgatus* CAPM 7020 a *Bacteroides xylanisolvens* CAPM 7021.

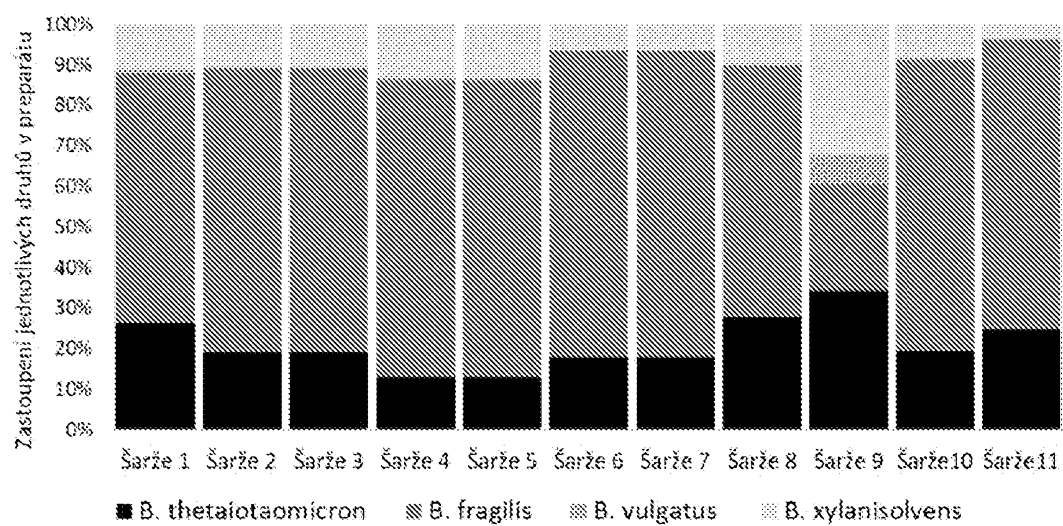
3. Probiotický přípravek podle nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje kapalný nosič na bázi vody, s výhodou vybraný ze skupiny voda, fyziologický roztok nebo růstové médium pro bakterie sestávající z peptonu ze sójových bobů, kyselého hydrolyzátu sójových proteinů a kvasnicového extraktu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

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

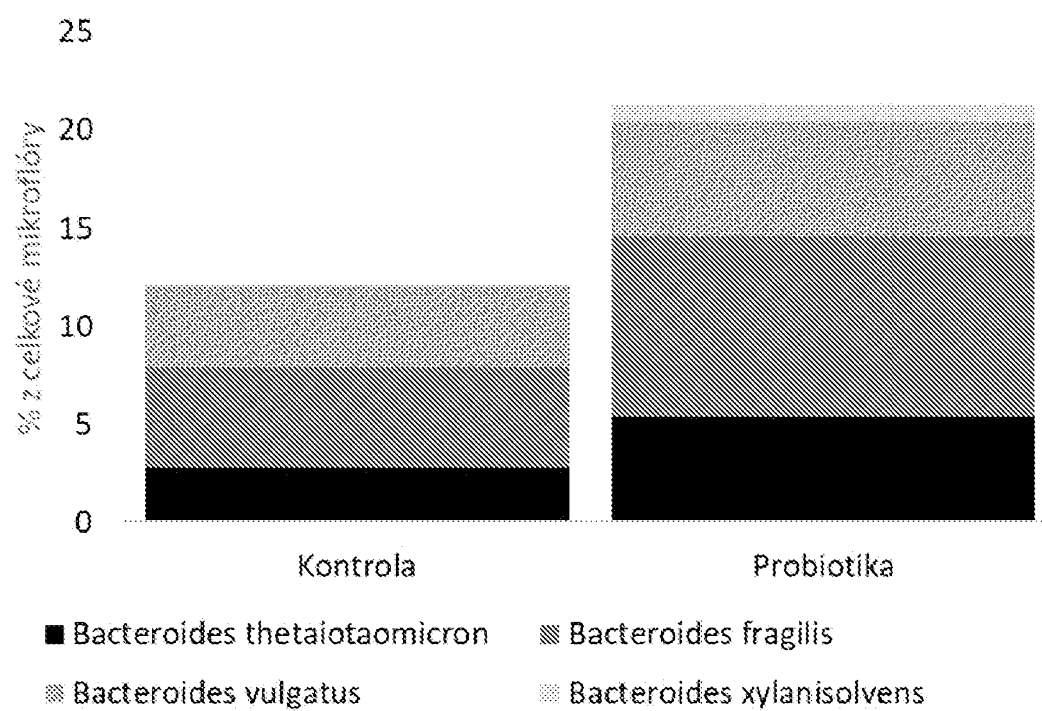
5. Probiotický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4 pro použití pro léčebné či preventivní zlepšení fyziologických vlastností střevního traktu sajících selat.

6. Probiotický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4 pro použití pro prevenci infekcí trávicího traktu sajících selata patogeny vybranými ze skupiny *E. coli*, *Clostridium difficile* a *Clostridium perfringens*.

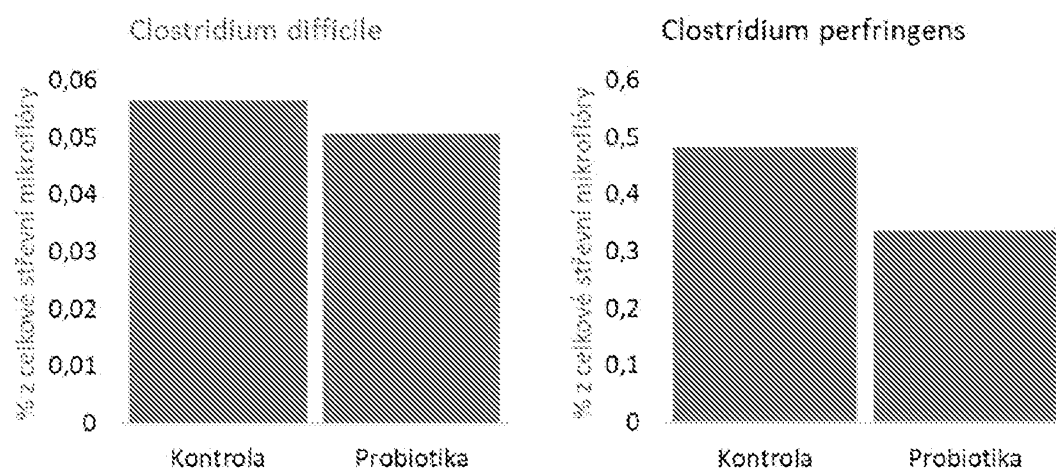
5 výkresů



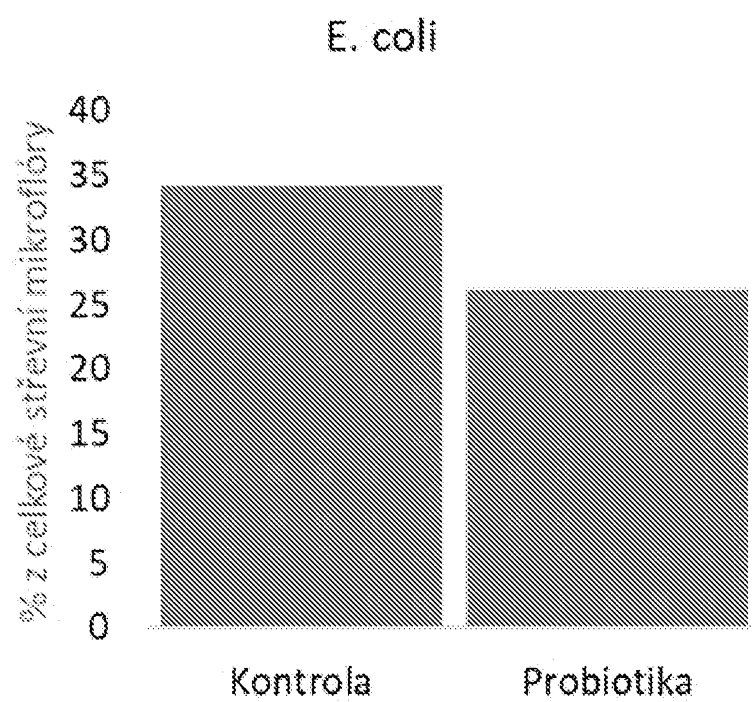
Obr. 1



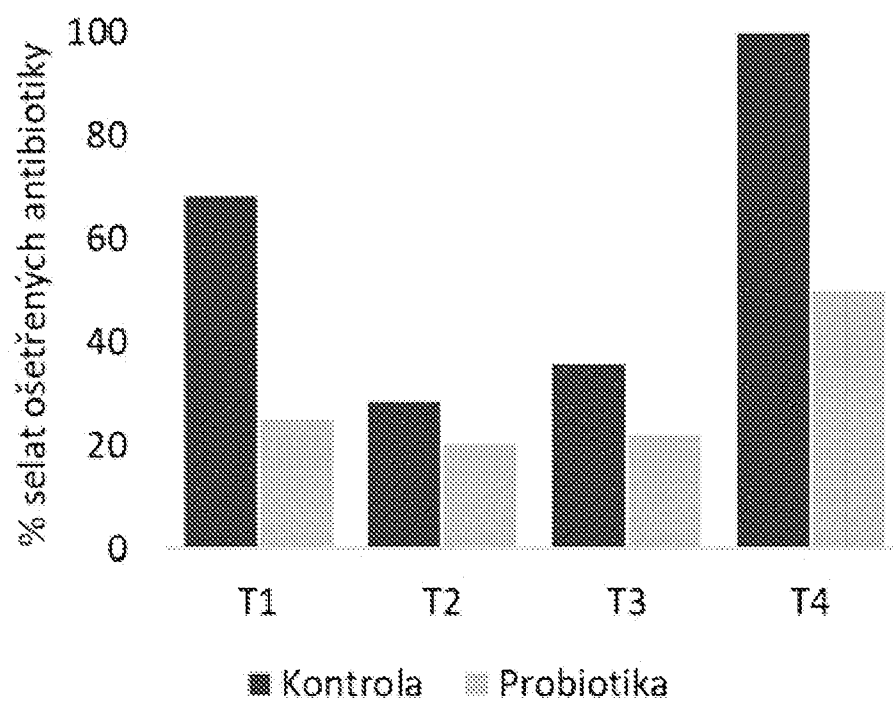
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5