FOD Economie, KMO, Middenstand & Energie
Dienst voor de Intellectuele Eigendom

(11) 1027041 B1

(47) Datum van verlening : 08/09/2020

(12) BELGISCH UITVINDINGSOCTROOI

(47) Publicatiedatum : 08/09/2020

(21) Aanvraagnummer : BE2019/5082

(22) Indieningsdatum : 08/02/2019

(62) Afgesplitst van basisaanvraag :

(62) Indieningsdatum basisaanvraag :

(51) Internationale classificatie : A01K 61/13, A23K 50/80, A61K 31/19, A61K 31/20, A61K 45/06, A61P 31/04

(30) Voorrangsgegevens :

(73) Houder(s) :

NUTRITION SCIENCES N.V.

9031, DRONGEN
België

(72) Uitvinder(s) :

BRUGGEMAN Geert
8200 BRUGGE
België

BRUGGER Roland
9031 DRONGEN
België

(54) SAMENSTELLING VOOR GEBRUIK BIJ DE BEHANDELING VAN PISCIRICKETTSIOSE

(57)De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een samenstelling voor gebruik bij de behandeling, onderdrukking en/of preventie van piscirickettsiosis, bij voorkeur bij poikilotherme waterdieren, waarbij de genoemde samenstelling een of meerdere vetzuren met middellange keten (MCFA's) en/of derivaten daarvan omvat.

SAMENSTELLING VOOR GEBRUIK BIJ DE BEHANDELING VAN PISCIRICKETTSIOSE

TECHNISCH GEBIED

De uitvinding heeft in het algemeen betrekking op het gebied van obligate intracellulaire bacteriën, en in het bijzonder op middelen van rickettsia-type ziektes, specifiek Piscirickettsia salmonis bij poikilotherme waterdieren.

ACHTERGROND

Piscirickettsia salmonis was het eerste lid van de orde Rickettsiales dat werd geïsoleerd uit poikilotherme waterorganismen. P. salmonis is het etiologische middel van rickettsial septicemia bij zalmachtigen of piscirickettsiosis, en is een economisch significant pathogeen van zalmachtigen dat verantwoordelijk is voor de sterfte op grote schaal in de koudwater-aquacultuurindustrie. P. salmonis, een gramnegatieve obligate intracellulaire bacterie, werd voor het eerst geobserveerd in 1989 in een zieke, moribund Coho-zalm uit een zoutwater net pen site aan de kust van Chili. Het is nu bekend dat P. salmonis geografisch meer verspreid is dan aanvankelijk werd vermoed. Er is geobserveerd dat P. salmonis een breed gamma zalmachtigen infecteert en een systemische infectie veroorzaakt die gericht is op de nier, lever, milt, hart, hersenen, darm, eierstok en kieuwen van zalmachtigen.

Piscirickettsiosis is de grootste uitdaging met betrekking tot de gezondheid in de koudwater-aquacultuursector en de ziekte heeft een grote economische impact op de sector. Uitbraken van de ziekte in het verleden hebben namelijk geresulteerd in verliezen met een waarde van bij benadering honderden miljoenen Amerikaanse dollars in de sector.

Momenteel heeft de sector haar controlestrategieën voor de ziekte gefocust op antimicrobiële therapieën en vaccins. Piscirickettsiosis is in de loop van de tijd geëvolueerd waarbij elke nieuwe uitbraak steeds meer verraderlijk is en steeds meer immuun voor behandelingen, en elkeen heeft een verhoogde bacteriële virulentie, klinische en pathologische ernst en variabele voorstelling onder gelijkaardige condities van species, leeftijd en beheersmaatregelen vertoond.

Het gebruik van antibiotica, zowel profylactisch als tijdens het begin van de infectie, is grotendeels onsuccesvol gebleken bij het stoppen van uitbraken van de ziekte. Zo ook zijn commerciële vaccins tegen P. salmonis niet erg doeltreffend gebleken.

JP283135B2 beschrijft het gebruik van een antimicrobiële samenstelling omvattende een combinatie van een vetzuur met middellange keten (MCFA), een monoglyceride en een diglyceride van het MCFA voor de preventie van de groei van een aantal schadelijke bacteriën. JP283135B2 beschrijft echter geen antimicrobiële activiteit van deze samenstelling ten opzichte van Piscirickettsia salmonis of ten opzichte van enige andere bacteriën die piscirickettsiosis kunnen veroorzaken.

De huidige benaderingen voldoen daarom niet aan de behoeften van de koudwater-aquacultuursector.

De onderhavige uitvinding heeft als doel het bieden van een alternatief voor de behandeling en preventie van piscirickettsiosis.

SAMENVATTING VAN DE UITVINDING

De onderhavige uitvinding heeft daarom als doel het bieden van een samenstelling voor gebruik bij de behandeling, onderdrukking en/of preventie van piscirickettsiosis volgens conclusie 1. Meer in het bijzonder biedt de uitvinding een samenstelling omvattende een of meerdere vetzuren met middellange keten (MCFA's) en/of derivaten daarvan. In een verder aspect biedt de onderhavige uitvinding een visvoeder volgens conclusie 15. Meer in het bijzonder biedt de uitvinding een visvoeder omvattende een samenstelling voor gebruik volgens de uitvinding, waarbij de dosering van de samenstelling in het voeder X ppm tot X ppm in gewicht bedraagt, gebaseerd op het totale gewicht van het visvoeder.

De uitvinders hebben gevonden dat een samenstelling volgens de uitvinding verrassend doeltreffend is voor de preventie, onderdrukking en/of behandeling van piscirickettsiosis, waardoor het toelaat zowel de productiviteit als de rentabiliteit van de aquacultuur significant te verhogen. Daarnaast levert de onderhavige uitvinding ook een aanzienlijke bijdrage tot de vermindering van het lijden van de dieren en de verbetering van het welzijn van de dieren. Tot slot vermindert de samenstelling voor gebruik volgens de uitvinding ook de nood aan de toediening van antibiotica

aan de dieren tijdens aquacultuur waardoor het dus helpt de verdere opkomende verspreiding van geneesmiddelenresistente pathogenen te voorkomen.

In een derde aspect biedt de onderhavige uitvinding een werkwijze voor het verbeteren van de zoötechnische prestatie van poikilotherme waterdieren volgens conclusie 16. Meer in het bijzonder biedt de uitvinding een werkwijze omvattende de stap van het toedienen van een samenstelling omvattende een of meerdere vetzuren met middellange keten (MCFAs) en/of derivaten daarvan aan poikilotherme waterdieren. Toediening van de samenstelling volgens de uitvinding aan de poikilotherme waterdieren heeft geleid tot een onverwachte stijging in de productiviteit van de dieren, als gevolg van hun verbeterde zoötechnische prestatie. De werkwijze volgens de uitvinding resulteert daarom in verhoogde inkomsten voor de kweker.

GEDETAILLEERDE BESCHRIJVING VAN DE UITVINDING

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een samenstelling voor gebruik bij de preventie, onderdrukking en/of behandeling van piscirickettsiosis bij poikilotherme dieren die in water leven, met het kenmerk dat de genoemde samenstelling een of meerdere vetzuren met middellange keten (MCFA's) of derivaten daarvan omvat.

Tenzij anders gedefinieerd hebben alle termen die zijn gebruikt in de beschrijving van de uitvinding, inclusief technische en wetenschappelijke termen, de betekenis die algemeen wordt begrepen door een vakman in het gebied waarop deze uitvinding betrekking heeft. Verder zijn de definities van de termen opgenomen om de beschrijving van de onderhavige uitvinding beter te begrijpen.

Zoals hier gebruikt, hebben de volgende termen de volgende betekenis:

"Een", "de" en "het" zoals hier gebruikt, verwijzen zowel naar het enkelvoud als het meervoud, tenzij de context anders aangeeft. "Een compartiment" verwijst, bij wijze van voorbeeld, naar één of meer dan één compartiment.

"Ongeveer" zoals hier gebruikt, dat verwijst naar een meetbare waarde zoals een parameter, een hoeveelheid, een tijdsduur en dergelijke, is bedoeld om variaties te

omvatten van +/-20% of minder, bij voorkeur +/-10% of minder, meer bij voorkeur +/-5% of minder, zelfs meer bij voorkeur +/-1% of minder, en nog meer bij voorkeur +/-0,1% of minder van de gespecificeerde waarde, voor zover dergelijke variaties geschikt zijn om uit te voeren in de beschreven uitvinding. Het zal echter duidelijk zijn dat de waarde waarop de modificeerder "ongeveer" betrekking heeft, zelf ook specifiek beschreven wordt.

"Omvatten", "omvattende" en "omvat" en "bestaande uit" zoals hier gebruikt, zijn synoniem met "bevatten", "bevattende" of "bevat" en zijn inclusieve of open termen die de aanwezigheid specificeren van wat volgt bijv. een component en de aanwezigheid van aanvullende, niet-genoemde componenten, kenmerken, elementen, delen, stappen, die welbekend zijn in de stand der techniek of daarin beschreven zijn, niet uitsluiten.

Het citeren van numerieke bereiken door eindpunten omvat alle getallen en breuken die zijn opgenomen binnen dat bereik, evenals de genoemde eindpunten.

De uitdrukking "% in gewicht", "gewichtsprocent", "%gew." of "gew.%" verwijzen, hier en doorheen de beschrijving tenzij anders gedefinieerd, naar het relatieve gewicht van de respectievelijke component gebaseerd op het totale gewicht van de formule.

De term "vetzuur met middellange keten" of "MCFA" zoals hier gebruikt, verwijst naar vetzuren met een middellange ketenlengte, waarbij de vetzuren verzadigd of onverzadigd kunnen zijn. In de onderhavige uitvinding kan de langste continue keten van een MCFA bestaan uit 5 tot 12 koolstofatomen, bijvoorbeeld, valeriaanzuur (C5), capronzuur (C6), caprylzuur (C8), caprinezuur (C10) of laurinezuur (C12). De term MCFA verwijst ook naar vetzuren met een middellange keten die chemisch gewijzigd zijn, en naar vetzuren met middellange keten die ook voorzien zijn van zijketens, zoals, zonder beperking, een of meerdere alkylgroepen, bij voorkeur C1-C10 alkylgroepen. Zoals hier beschreven verwijst de term "derivaat van vetzuur met middellange keten (MCFA)" naar een vetzuurketen waarvan de carboxylgroep omkeerbaar omgevormd is naar een verschillende groep, bij voorkeur, maar zonder beperking, naar een amide, zout, ester of glyceride zoals, bijvoorbeeld, een mono-, di- of triglyceride.

De term "piscirickettsiosis" zoals hier gebruikt, verwijst naar een besmettelijke ziekte die piscirickettsiosis organismen treft die in water leven, veroorzaakt door

Piscirickettsia salmonis (P. salmonis), Piscirickettsia-achtige organismen (PLO) en/of vis rickettsia-achtige organismen (RLO). De term piscirickettsiosis zoals hier gebruikt, verwijst ook naar de ziekte salmonid rickettsial septicemia (SRS).

"Piscirickettsia-achtige organismen" (PLO) en "vis rickettsia-achtige organismen " (RLO), zoals hier gebruikt zijn organismen waarvan de ontwikkelingsfasen morfologisch gelijkaardig zijn aan die van organismen die behoren tot de familie van Piscirickettsiaceae en/of aan die van organismen die behoren tot de orde van Rickettsiales en die ziekte bij poikilotherme waterdieren veroorzaken die resulteert in symptomen die gelijkaardig zijn aan deze veroorzaakt door infectie van zalmachtigen met P. salmonis.

De term "poikilotherme waterdieren" of "poikilotherm waterorganisme" zoals hier gebruikt, verwijst naar waterdieren waarvan de lichaamstemperatuur aanzienlijk varieert, en het grootste deel van de tijd, afhankelijk is van de omgeving. Poikilotherme waterdieren die kunnen lijden aan piscirickettsiosis zijn onder andere, maar zijn niet beperkt tot, witte zeebaars (*Atactoscion noblis*), zwarte zeebaars (*Dicentrarchus sp*.), tilapia (*Oreochromis, Tilapia* en *Sarotherodon spp*.) en blauwoog plecostomus (*Panaque suttoni*).

De term "zalmachtige" verwijst naar vissoorten die behoren tot de familie van Salmonidae binnen de orde van Salmoniformes. Zalmachtigen omvatten, maar zijn niet beperkt tot, zalm, forel, zalmforel, zoetwaterhouting en vlagzalm. Zalmen omvatten, maar zijn niet beperkt tot, Atlantische zalmsoorten zoals Atlantische zalm (*Salmo salar*) en zalmsoorten uit de Stille Oceaan zoals Chinookzalm (*Oncorhynchus tshawytscha*), Chumzalm (*O. keta*), Cohozalm (*O. kisutch*), Masuzalm (*O. Masou),* roze zalm (*O. gorbuscha*) en Sockeyezalm (*O. nerka*).

De term "Voederconversieratio" of "FCR (Feed Conversion Ratio) beschrijft de efficiëntie waarmee de dieren voeder in de gewenste output omzetten. Bij dieren die gekweekt worden voor vlees (zoals mestkoeien, varkens, kippen en vissen) is de output het vlees, dat wil zeggen, de lichaamsmassa verkregen door het dier, voorgesteld hetzij in de uiteindelijke massa van het dier hetzij in de massa van de schoongemaakte output.

De term "minimum inhiberende concentratie" of "MIC" zoals hier gebruikt, verwijst naar de laagste concentratie van een verbinding of samenstelling die meetbare groei van een bacterie voorkomt.

De term "minimum bacteriedodende concentratie" of "MBC" zoals hier gebruikt, verwijst naar de laagste concentratie van een verbinding of samenstelling die resulteert in microbiële dood zoals gedefinieerd door het onvermogen om bacteriën opnieuw te kweken.

De term "kolonievormende eenheid" (CFU, colony-forming unit) verwijst naar een eenheid die wordt gebruikt voor het schatten van levensvatbare bacteriën of schimmelcellen in een monster, dat een celcultuur, een voederadditief of een voedersamenstelling kan zijn. Levensvatbaarheid wordt gedefinieerd als het vermogen om zich te vermenigvuldigen via binaire splijting onder de gecontroleerde omstandigheden.

In een eerste aspect biedt de onderhavige uitvinding een samenstelling voor gebruik bij de preventie, onderdrukking en/of behandeling van piscirickettsiosis, bij voorkeur bij poikilotherme waterdieren, met het kenmerk dat de genoemde samenstelling een of meerdere vetzuren met middellange keten (MCFA's) of derivaten daarvan omvat. MCFA('s) zijn vetzuren met een middellange ketenlengte, waarbij de vetzuren verzadigd of onverzadigd zijn. In de onderhavige uitvinding bestaat de langste continue keten van een MCFA uit 5 (C5) tot 12 (C12) koolstofatomen. De vetzuren die kunnen worden gebruikt in deze uitvinding, omvatten zowel vetzuren met een even als een oneven aantal koolstofatomen. Bij voorkeur omvat de samenstelling van de uitvinding een of meerdere MCFA's gekozen uit C5 tot C12 of derivaten daarvan. De term MCFA verwijst ook naar vetzuren met een middellange keten die chemisch gewijzigd zijn, en naar vetzuren met middellange keten die ook voorzien zijn van zijketens, zoals, zonder beperking, een of meerdere alkylgroepen, bij voorkeur C1-C10 alkylgroepen. MCFA-derivaten omvatten MCFA's waarvan de carboxylgroep omkeerbaar is omgevormd naar een verschillende groep zoals, maar niet beperkt tot, een amide, een zout, een ester of een glyceride zoals, bijvoorbeeld, een mono-, di- of triglyceride.

Piscirickettsiosis is de grootste uitdaging met betrekking tot de gezondheid in de koudwater-aquacultuursector, die zowel de productiviteit als rentabiliteit treft, die resulteert in een enorme economische impact van de ziekte op de aquacultuursector. De uitvinders hebben gevonden dat een samenstelling omvattende ten minste één MCFA of MCFA-derivaat verrassend doeltreffend is voor de preventie, onderdrukking en/of behandeling van deze ziekte, waardoor het zowel

de productiviteit als de rentabiliteit van de aquacultuur significant kan worden verhogen.

Verder is piscirickettsiosis een gruwelijke en gemene ziekte waarvan de impact op het welzijn van de dieren niet mag worden onderschat. Vissen die aan de ziekte lijden, vertonen onder andere symptomen zoals extreem gewichtsverlies, huidletsels die zich ontwikkelen tot zweren op de flanken en het hoofd, een grijze, gezwollen milt en in de nieren verspreide hemorragie in de lever en diverse letsels die het resultaat zijn van granuloma's en gebieden van weefselnecrose. Jammer genoeg leidt infectie met piscirickettsiosis in veel gevallen uiteindelijk tot de dood van het dier. De onderhavige uitvinding biedt dus een samenstelling die een aanzienlijke bijdrage kan leveren tot de vermindering van het lijden van de dieren en de verbetering van het welzijn van de dieren.

Om het voorkomen van ziektes in koudwater-aquacultuursystemen te verminderen, worden er vaak antibiotica toegediend aan de dieren. Deze strategie is grotendeels onsuccesvol gebleken bij het voorkomen of stoppen van de uitbraak van piscirickettsiosis. Daarnaast maakt het probleem van weerstandsontwikkeling van pathogene organismen en de overdracht van de antibioticumsubstanties in producten die afkomstig zijn van de dieren het erg wenselijk om het gebruik van antibiotica te verminderen. Daarom biedt de onderhavige uitvinding een doeltreffende manier voor de toediening van antibiotica en helpt het dus bij het voorkomen van de opkomende verspreiding van pathogenen die resistent zijn tegen geneesmiddelen. Tot slot heeft de onderhavige uitvinding ook het voordeel dat de nood aan de toediening van antibiotica aan de dieren gedaald is.

De uitvinders hebben gevonden dat het leveren van specifieke MCFA in het bereik van C5-C12, de derivaten of mengsels daarvan aan bacteriën die piscirickettsiosis veroorzaken hun verdere groei afremt en dat de bacteriën uiteindelijk gedood worden door het toegediende MCFA. In een uitvoeringsvorm omvat de samenstelling een of meerdere MCFA's die zijn geselecteerd uit de groep omvattende capronzuur (C6), caprylzuur (C8), caprinezuur (C10), laurinezuur (C12) en derivaten daarvan. De uitvinders hebben gevonden dat deze MCFA's en de afgeleiden daarvan specifiek doeltreffend zijn tegen bacteriën die piscirickettsiosis veroorzaken. In de onderhavige uitvinding wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van een samenstelling omvattende een mengsel van specifieke verschillende MCFA's, waarbij de individuele MCFA's een verschillend aantal koolstofatomen bevatten. De uitvinders

hebben gevonden dat een samenstelling omvattende ten minste caprylzuur (C8), caprinezuur (C10) en laurinezuur (C12) of een respectievelijk derivaat, opmerkelijk doeltreffend is voor het behandelen, voorkomen en/of onderdrukken van piscirickettsiosis. De samenstelling van de uitvinding omvat bij voorkeur:

- tussen 30% en 70% caprylzuur (C8) of een derivaat daarvan;
- tussen 15% en 55% caprinezuur (C10) of een derivaat daarvan; en
- tussen 1% en 35% laurinezuur (C12) of een derivaat daarvan gebaseerd op het totale gewicht van de samenstelling.

De uitvinders hebben gevonden dat een samenstelling omvattende een mengsel van MCFA's of MCFA-derivaten zoals hierboven beschreven, antimicrobiële eigenschappen vertoont naar de bacteriën toe die verantwoordelijk zijn voor het veroorzaken van de ziekte piscirickettsiosis.

Omwille van deze uitstekende doeltreffendheid bij de preventie, onderdrukking en/of behandeling van piscirickettsiosis moeten er kleinere doses van de samenstelling volgens de uitvinding worden gebruikt voor het verkrijgen van de gewenste resultaten voor de gezondheid van het dier en de gelijktijdige positieve effecten op de productiviteit van de aquacultuur. Daarom leidt de onderhavige uitvinding tot hogere inkomsten voor de kwekers terwijl de kosten van de preventie, behandeling en/of onderdrukking van ziektes verlaagd worden.

In een verdere uitvoeringsvorm ligt de totale hoeveelheid van MCFA's en/of MCFA-derivaten tussen 1% en 100% gebaseerd op het totale gewicht van de samenstelling, bij voorkeur tussen 5% en 90%, meer bij voorkeur tussen 15 en 80%, zelfs meer bij voorkeur tussen 30% en 80% gebaseerd op het totale gewicht van de samenstelling. De uitvinders hebben gevonden dat de doeltreffendheid van de samenstelling voor gebruik bij de preventie, behandeling en/of onderdrukking van piscirickettsiosis, binnen de bovengenoemde bereiken, verder wordt verhoogd.

De soort Piscirickettsia salmonis was het eerste pathogeen dat werd geïdentificeerd als de oorzaak van piscirickettsiosis. De ziekte zelf, evenals de pathogenen die daarvoor verantwoordelijk zijn, zijn echter nog niet goed gekenmerkt. Jammer genoeg is P. salmonis niet het enige pathogeen dat piscirickettsiosis veroorzaakt, en zijn verscheidene bacteriën een opkomende bedreiging voor de visproductie. De uitvinders hebben gevonden dat bacteriën die gelijkaardig zijn aan P. salmonis ook gevoelig zijn voor de effecten van de samenstelling volgens de uitvinding. Overeenkomstig, in een andere verdere uitvoeringsvorm, is de samenstelling geschikt voor gebruik bij de behandeling, preventie en/of onderdrukking van de

ziekte piscirickettsiosis wanneer het wordt veroorzaakt door ten minste één obligate intracellulaire parasitaire soort, bij voorkeur wanneer het wordt veroorzaakt door ten minste één soort die behoort tot de familie van Piscirickettsiaceae en/of tot de orde van Rickettsiales, zelfs meer bij voorkeur door ten minste één soort die is geselecteerd uit de groep omvattende P. salmonis, Piscirickettsia-achtige organismen (PLO's) en vis Rickettsia-achtige organismen (RLO's). De samenstelling is niet gericht op een soortspecifieke eigenschap van het pathogeen, maar eerder op een ziektespecifieke eigenschap van verschillende gerelateerde pathogeensoorten. De samenstelling biedt daarom een brede spectrumefficiëntie voor gebruik bij de behandeling, onderdrukking en/of preventie van piscirickettsiosis in poikilotherme waterdieren.

De samenstelling volgens de uitvinding kan gemakkelijk worden gebruikt bij de behandeling, onderdrukking en/of preventie van piscirickettsiosis bij poikilotherme waterdieren, aangezien het oraal en/of topicaal kan worden toegediend aan de dieren.

Topicale toediening van de samenstelling aan poikilotherme waterdieren wordt verkregen, in een verdere uitvoeringsvorm, door het oplossen van de samenstelling in het zwemwater van de dieren. Bij voorkeur wordt het volume zwemwater van de dieren eerst gereduceerd voor het beperken van de totale hoeveelheid samenstelling die moet worden gebruikt. Topicale toediening door het rechtstreeks brengen van de samenstelling in het zwemwater van de dieren biedt de mogelijkheid om een groot aantal dieren tegelijkertijd te behandelen. Daarnaast kunnen de dieren daarna worden verwijderd uit het zwemwater omvattende de samenstelling en kan een volgende groep dieren worden behandeld met hetzelfde zwemwater, waardoor de hoeveelheid van de samenstelling die nodig is per dier verder wordt gereduceerd. In een verdere uitvoeringsvorm kan de samenstelling voor topicale toediening verder een of meerdere oppervlakteactieve stoffen omvatten. Zonder gebonden te willen zijn door enige theorie wordt aangenomen dat oppervlakteactieve stoffen het contact tussen de samenstelling en het lichaamsoppervlak van het dier verbeteren, waardoor ze de topicale toediening van de samenstelling optimaliseren. Oppervlakteactieve stoffen zijn geselecteerd uit de groep omvattende niet-ionische, kationische of anionische oppervlakteactieve stoffen zoals, maar niet beperkt tot, kokosnoot alkylbenzyl dimethylammonium chloride, dioctyl dimethylammonium chloride, tributyl tetradecylfosfonium chloride, lauryl dimethyl amine oxide, cocoamidopropyl betaïne, lauramidopropyl betaïne,

cocamide propyl ammonium hydroxide, alkyl benzeen sulfonzuren, alkylsulfonaten, carboxylzuurethers en geëthoxyleerde en gepropoxyleerde vetalcoholen.

Als alternatief hebben de uitvinders gevonden dat orale ingestie van de samenstelling door de dieren resulteert in doeltreffende behandeling, onderdrukking en/of preventie van piscirickettsiosis bij deze dieren. Daarom, en in een alternatieve verdere uitvoeringsvorm, wordt de therapeutisch doeltreffende hoeveelheid van de samenstelling voor gebruik bij de behandeling, onderdrukking en/of preventie van piscirickettsiosis bij poikilotherme waterdieren oraal toegediend aan de genoemde poikilotherme waterdieren. In een verdere uitvoeringsvorm wordt orale toediening van de samenstelling bereikt door het voederen van de samenstelling aan de dieren. Deze methode van toediening heeft als voordeel dat een minimale hoeveelheid samenstelling wordt gebruikt en, bijgevolg, een minimale hoeveelheid samenstelling wordt verspild of achterblijft in het zwemwater van de dieren. Daarnaast is deze methode gemakkelijk uit te voeren en brengt het geen grote investeringen voor nieuwe uitrusting met zich mee voor de kweker.

In een verdere uitvoeringsvorm omvat de samenstelling verder vitamines, mineralen, spoorelementen of een combinatie daarvan. Vitamines omvatten, maar zijn niet beperkt tot, Vitamine A, Vitamine D3, Vitamine E, Vitamine K3, Thiamine, Riboflavine, Panthotheenzuur, Biotine, Foliumzuur, Vitamine B12, Niacine, Pyridoxine, Ascorbinezuur, Inositol en Choline. Mineralen en spoorelementen omvatten, maar zijn niet beperkt tot, magnesium, natrium, mangaan, ijzer, zink, koper, selenium, fosfor kobalt en jood. De toevoeging van deze componenten draagt verder bij aan een volledige en gezonde voeding van de dieren en heeft een positieve invloed op de zoötechnische prestatie ervan. Inclusie van deze componenten in de samenstelling vereenvoudigt de stappen die nodig zijn voor het voederen van de dieren aangezien deze componenten niet langer afzonderlijk moeten worden toegevoegd aan het voeder, hetgeen resulteert in een verbeterde efficiëntie van het voederproces. Daarnaast hebben de uitvinders gevonden dat de voorzien van MCFA's en/of MCFA-derivaten in het voeder van de dieren resulteert in een stijging in eetbaarheid van het voeder, hetgeen de dieren er op zijn beurt toe aanzet meer te eten, groter, sneller en/of gezonder te groeien, hetgeen uiteindelijk leidt tot een stijging in de rentabiliteit van aquacultuur.

Hoewel piscirickettsiosis voor het eerst geobserveerd werd bij een Cohozalm (Oncorhynchus kisutch), is nu bekend dat de ziekte een breed gamma poikilotherme waterdieren treft waaronder, maar niet beperkt tot zalmachtigen, witte zeebaars

(Atactoscion noblis), zwarte zeebaars (Dicentrarchus sp.), tilapia (Oreochromis, Tilapia en Sarotherodon spp.) en blauwoog plecostomus (Panaque suttoni). De term zalmachtigen verwijst naar vissoorten die behoren tot de familie van Salmonidae waaronder, maar niet beperkt tot, zalmen, forellen, zalmforellen, zoetwaterhoutings en vlagzalmen. Zalmen omvatten, maar zijn niet beperkt tot, Atlantische zalmsoorten zoals Atlantische zalm (Salmo salar) en zalmsoorten uit de Stille Oceaan zoals Chinookzalm (Oncorhynchus tshawytscha), Chumzalm (O. keta), Cohozalm (O. kisutch), Masuzalm (O. Masou), roze zalm (O. gorbuscha) en Sockeyezalm (O. nerka).

Omdat zalmachtigen de belangrijkste groep vissen in aquacultuur vormen, heeft de behandeling, onderdrukking en/of preventie van piscirickettsiosis in deze groep soorten een prominent positief effect op de productiviteit en rentabiliteit van de aquacultuursectie. Overeenkomstig, in een verdere uitvoeringsvorm, wordt de samenstelling volgens de uitvinding gebruikt bij de behandeling, onderdrukking en/of preventie van piscirickettsiosis bij zalmachtigen, meer in het bijzonder zalmen, forellen, zalmforellen, zoetwaterhoutings en vlagzalmen.

In een verdere uitvoeringsvorm is de samenstelling volgens de uitvinding zoals hier beschreven, geformuleerd als een vloeibare of als een vaste vorm. De term "vaste vorm" betekent in het bijzonder een poeder, een korrel of een pellet. De term "vloeibare vorm" betekent in het bijzonder een oplossing in water of betekent een oplossing in olie en omvat een viskeuze pasta en een niet-viskeuze oplossing. De MCFA's en/of MCFA-derivaten zoals hierboven beschreven, zijn in olie oplosbaar en kunnen worden voorzien hetzij als poeder hetzij als een olieoplossing. De samenstelling is in het bijzonder geschikt voor orale toediening. Een visvoeder of voederadditief omvattende de samenstelling volgens een uitvoeringsvorm van de uitvinding wordt geproduceerd of gefabriceerd door middelen die bekend zijn bij een vakman. Het visvoeder omvattende de samenstelling volgens de uitvinding wordt bij voorkeur voorzien als een droge geëxtrudeerde voederpellet. Deze formulering laat een relatief lange levensduur toe en laat ook de verpakking en opslag van grote hoeveelheden voeder toe.

Orale toediening van de samenstelling heeft, in tegenstelling tot andere methodes voor toediening, als voordeel dat een minimale hoeveelheid samenstelling wordt gebruikt en, bijgevolg, een minimale hoeveelheid samenstelling wordt verspild of achterblijft in het zwemwater van de dieren. Daarnaast is orale toediening gemakkelijk uit te voeren en brengt het geen grote investeringen voor nieuwe

uitrusting met zich mee. Orale toediening van de samenstelling kan worden uitgevoerd door het mengen van het diervoeder met de samenstelling volgens de uitvinding voorafgaand aan het voederen, door het voederen van het dier met een diervoeder dat de samenstelling reeds bevat. Overeenkomstig, in een derde aspect, biedt de uitvinding een visvoeder omvattende een samenstelling voor gebruik zoals hierboven beschreven, waarbij de dosering van het genoemde MCFA in het genoemde visvoeder 100 ppm tot 5000 ppm, tussen 100 en 3000 ppm in gewicht, tussen 100 en 1000 ppm, meer bij voorkeur 100 en 500 ppm, meer bij voorkeur 100 en 300 ppm, zoals 225 ppm gebaseerd op het totale gewicht van het genoemde visvoeder, bedraagt.

In een andere uitvoeringsvorm wordt de genoemde samenstelling toegevoegd aan het water van de genoemde waterdieren, bijvoorbeeld in de tank. De genoemde samenstelling wordt zodanig toegevoegd dat de MCFA-concentratie in het water in een concentratie van 100 en 5000 ppm; tussen 100 en 3000 ppm, tussen 100 en 1000 ppm, meer bij voorkeur 100 en 500 ppm, meer bij voorkeur 100 en 300 ppm, zoals 225 ppm, is.

In een tweede aspect biedt de uitvinding een werkwijze voor het verbeteren van de zoötechnische prestatie van poikilotherme waterdieren omvattende de stap van het toedienen van een samenstelling omvattende een of meerdere vetzuren met middellange keten (MCFAs) en/of derivaten daarvan aan de genoemde poikilotherme dieren. Bij voorkeur ligt de totale hoeveelheid van MCFA's en/of MCFA-derivaten tussen 1% en 100% gebaseerd op het totale gewicht van de samenstelling, meer bij voorkeur bij voorkeur tussen 5% en 90%, zelfs meer bij voorkeur tussen 10% en 80%, meest bij voorkeur tussen 10% en 50%, meer bij voorkeur tussen 10 en 30%, zoals 15% gebaseerd op het totale gewicht van de samenstelling. De uitvinders hebben gevonden dat, onafhankelijk van de aanwezigheid of afwezigheid van piscirickettsiosis, toediening van de samenstelling volgens de uitvinding aan de poikilotherme waterdieren leidt tot een onverwachte stijging in de productiviteit van de dieren, als gevolg van hun verbeterde zoötechnische prestatie. Dit positieve effect kan worden gemeten, bijvoorbeeld, gebaseerd op de groei van het dier of gebaseerd op de voedingswaarde van de dieren en de afgeleide producten ervan. Uiteraard kunnen andere werkwijzen voor het meten van de zoötechnische prestatie van de dieren, die bekend zijn bij de vakman, worden gebruikt in combinatie met de uitvinding. Groei kan bijvoorbeeld worden gemeten aan het einde van de groeiperiode als het gewicht van het dier of

de lengte van het dier (zoals bijvoorbeeld de lengte van de vis). Als alternatief kan de groei van het dier worden gemeten over een bepaalde periode hetgeen resulteert in de groeisnelheid van het dier in de tijd. De zoötechnische prestatie kan verder ook worden gemeten als de zwemcapaciteit van het dier. Kwekers evalueren de zoötechnische prestatie van de dieren tot slot vaak op basis van de meting van hun voederconversieratio of FCR (feed conversion ratio). De FCR beschrijft de efficiëntie waarmee de dieren voeder in de gewenste output omzetten. Bij dieren die gekweekt worden voor vlees (zoals mestkoeien, varkens, kippen en vissen) is de output het vlees, dat wil zeggen, de lichaamsmassa verkregen door het dier, voorgesteld hetzij in de uiteindelijke massa van het dier hetzij in de massa van de schoongemaakte output.

De werkwijze die is beschreven in de onderhavige uitvinding kan worden toegepast op alle gekweekte poikilotherme waterdieren, en is in het bijzonder goed geschikt voor zalmachtigen. Meer bepaald hebben zalmachtigen de neiging een lagere FCR te hebben dan andere gekweekte poikilotherme waterdieren, en zijn ze dus doeltreffender bij het omvormen van voeder in lichaamsmassa. De uitvinders hebben gevonden dat leden van deze groep vissen in het bijzonder gevoelig zijn voor de effecten op zoötechnische prestatie bij orale toediening van de samenstelling, hetgeen wordt gereflecteerd door een significante verdere daling in de FCR. Daarom resulteert toepassing van de werkwijze bij zalmachtigen in een grote stijging in inkomsten voor de kweker. Daarnaast, omdat zalmachtigen visetende vissen zijn, vertaalt een verdere daling in FCR zich in een lagere belasting voor het milieu omvat het voederen van een kleinere hoeveelheid wilde vis resulteert in een niet-beïnvloede opbrengst aan zalm.

In een verdere uitvoeringsvorm omvat het visvoeder verder andere welbekende ingrediënten voor het bieden van een voedingsmatig evenwichtig volwaardig voeder, maar niet beperkt tot, plantenmaterie, bijv. bloem, meel, zetmeel of gekraakte of verwerkte korrel geproduceerd uit een gewas zoals tarwe of andere granen, alfalfa, maïs, haver, aardappel, rijst, sojabonen of andere groenten; cellulose in een vorm die kan worden verkregen uit houtpulp, grassen, plantenbladeren en afvalplantenmaterie zoals rijst- of sojaboonschillen; dierenmaterie bijv. vis- of schaaldiermeel, olie, eiwit of oplosbare producten en extracten, krill, vleesmeel, botmeel, veermeel, bloedmeel, of krakelings; algenmaterie; gist; bacteriën; vitamines; mineralen en aminozuren; organische bindmiddelen of kleefmiddelen; en chelators en bewaarmiddelen.

In een andere uitvoeringsvorm wordt toediening van de samenstelling volgens de uitvinding oraal uitgevoerd of door het voederen met een voeder volgens de uitvinding. Orale toediening kan worden uitgevoerd op enige manier en volgens een voederschema dat wordt gebruikt bij het kweken van vissen en schaaldieren. Voedersnelheden variëren gewoonlijk volgens abiotische factoren, hoofdzakelijk seizoensgebonden zoals temperatuur, en biotische, in het bijzonder grootte en de ontwikkelingsfase van het dier.

De ontwikkeling van vissen kent 5 perioden die achtereenvolgens optreden: embryonale periode; larvenperiode; juveniele periode; volwassen periode en oudere periode. De larvenperiode treedt op zodra het embryo uitkomt en onafhankelijk van de eierdooier (of moeder in zeldzame gevallen) kan eten, orgaansystemen zich morfologisch ontwikkelen en winnen aan fysiologische functie. De juveniele periode is wanneer alle orgaansystemen volledig gevormd en functioneel zijn (behalve de gonaden) en vissen het uitzicht van miniatuurvolwassenen krijgen. De juveniele periode duurt tot de gonaden rijp worden. Zodra de gonaden rijp zijn, bereiken de vissen de volwassen periode. Tot slot wordt de oudere periode bereikt wanneer de groei stopt en de gonaden niet langer gameten produceren.

Juveniele vissen krijgen gewoonlijk 5-10% van hun lichaamsgewicht aan voeder per dag gedurende ongeveer 4-6 voederbeurten per dag. Grotere vissen krijgen gewoonlijk 2-5% van hun lichaamsgewicht aan voeder per dag gedurende ongeveer 1-2 voederbeurten per dag. Juveniele schaaldieren kunnen tot 5-10% van hun lichaamsgewicht aan voeder krijgen verdeeld over 6 voederbeurten per dag, terwijl grotere schaaldieren een minimum van ongeveer 2% van hun lichaamsgewicht aan voeder kunnen krijgen over ongeveer 2-3 voederbeurten per dag. De vissen of schaaldieren kunnen ook voeder naargelang hun eetlust krijgen.

Overeenkomstig, in een verdere uitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding omvat de dosering van de MCFA's en/of MCFA-derivaten 100 ppm tot 5000 ppm in gewicht, gebaseerd op het totale gewicht van het voeder van de genoemde poikilotherme waterdieren, bij voorkeur tussen 100 en 5000 ppm; tussen 100 en 3000 ppm, tussen 100 en 1000 ppm, meer bij voorkeur 100 en 500 ppm, meer bij voorkeur 100 en 300 ppm, zoals 225 ppm.

De dieren worden bij voorkeur ten minste eenmaal per dag gevoederd, meer bij voorkeur tweemaal of meerdere keren per dag zoals, bijvoorbeeld, 2-6 of 4-6 keer per dag. Het draagt de voorkeur dat enig overmatig voeder wordt verwijderd na de

voederperiode, bijv. door het uitspoelen van een toevoersysteem, of door verwijderen van de bodem van de zeekooi. Als alternatief kan een vis zoals een katvis worden toegevoegd aan de vispopulatie om overtollig voeder op te eten.

In een andere uitvoeringsvorm wordt de genoemde samenstelling dan aan de omgeving van de waterdieren gegeven, zoals het zwemwater of tank. De genoemde samenstelling wordt zodanig toegevoegd dat de MCFA-concentratie in het water in een concentratie van 100 en 5000 ppm; tussen 100 en 3000 ppm, tussen 100 en 1000 ppm, meer bij voorkeur 100 en 500 ppm, meer bij voorkeur 100 en 300 ppm, zoals 225 ppm, is.

De uitvinding zal verder beschreven worden door de volgende niet-limitatieve voorbeelden die de uitvinding verder illustreren, en die niet zijn bedoeld, en niet mogen worden geïnterpreteerd als zijn een beperking van het bereik van de uitvinding.

VOORBEELDEN

<u>Voorbeeld 1: In vitro inhibitie van de groei van Piscirickettsia salmonis door een samenstelling volgens een uitvoeringsvorm van de uitvinding.</u>

Een natuurlijk voorkomende stap van P. salmonis (veldstam PM-15972) werd gebruikt. Bacteriële groei werd geëvalueerd gebaseerd op M49-A van de CLSI/NCCLS normen.

Bacterieel kweekmedium (minimum essentieel medium (volgens Eagle) met 2 mM L-glutamine en Earle's BSS aangepast voor het bevatten van 1,5 g/L natriumbicarbonaat, 0,1 mM niet-essentiële aminozuren, 1,0 mM natriumpyruvaat en 10 mM HEPES, 90%; foetaal bovien serum, 10%) bevattende toenemende concentraties van de samenstelling en een controle (bacterieel kweekmedium zonder MCFA of MCFA-derivaten) werden geïnoculeerd met een gelijke hoeveelheid van P. salmonis (PM-15972). De mengsels werden geïncubeerd, en de bacteriële groei kreeg een score toegewezen: positief voor de aanwezigheid van bacteriële groei; negatief voor de afwezigheid van bacteriële groei. De resultaten zijn getoond in Tabel 1.

Tabel 1. In vitro inhibitie van groei van P. salmonis in de aanwezigheid van MCFA's.

Concentratie van samenstelling	P. salmonis groei
Controle (0ppm)	Positief
60 ppm	Negatief/Positief
100 ppm	Negatief
300 ppm	Negatief
1000 ppm	Negatief
5000 ppm	Negatief
120 ppm	Negatief
5000 ppm	Negatief

Hoewel P. salmonis nog steeds kon groeien in de aanwezigheid van 60 ppm van de samenstelling, werd de minimum inhiberende concentratie (MIC) in vitro bereikt bij 70 ppm van de samenstelling, aangezien geen groei van P. salmonis kon worden gedetecteerd in de aanwezigheid van 70 ppm of meer van de samenstelling in het medium.

<u>Voorbeeld 2: In vitro levensvatbaarheid van Piscirickettsia salmonis in de aanwezigheid van een samenstelling volgens een uitvoeringsvorm van de uitvinding.</u>

Een natuurlijk voorkomende stap van P. salmonis (veldstam PM-15972) werd gebruikt. Bacteriële overleving werd geëvalueerd gebaseerd op protocol BS EN 1656:2009 van het British Standards Institution (BSI).

Een waterige oplossing bevattende toenemende concentraties van de samenstelling werd geïnoculeerd met een gelijke hoeveelheid van P. salmonis (PM-15972). De mengsels werden geïncubeerd bij 18°C. Na 3 uur werd de samenstelling geneutraliseerd door verdunning en werd de oplossing op een plaat gebracht op P. salmonis medium. De platen werden geïncubeerd gedurende 7 tot 10 dagen bij 18°C en de levensvatbaarheid van de bacteriën werd berekend gebaseerd op de konolievormende eenheden (CFU) /ml. De "CFU" is een eenheid die wordt gebruikt voor het schatten van het aantal levensvatbare bacteriën in een monster. "Levensvatbaar" wordt gedefinieerd als het vermogen om zich te vermenigvuldigen via binaire splijting onder de gecontroleerde omstandigheden. De resultaten zijn getoond in Tabel 2.

Tabel 2. In vitro overleving van P. salmonis in de aanwezigheid van MCFA's.

Concentratie van samenstelling	P. salmonis levensvatbaarheid[a]	Doden van P. salmonis[b]
Zeggenschap	$5,53 \times 10^8$	0%
60 ppm	1.20×10^5	99,9%
70 ppm	507×10^4	99,99%
80 ppm	$2,30 \times 10^3$	99,999%
90 ppm	0	100%
100 ppm	0	100%
110 ppm	0	100%
120 ppm	0	100%
3000 ppm	0	100%

[a] Levensvatbaarheid van P. salmonis is uitgedrukt als CFU/ml

[b] Doden van P. salmonis is uitgedrukt als de vermindering in levensvatbaarheid van P. salmonis (vergeleken met het controlemonster).

Op basis van deze resultaten kan worden besloten dat de minimum bacteriedodende concentratie of MBC, de laagste concentratie van de samenstelling die resulteert in het doeltreffend doden van P. salmonis 80 ppm bedraagt volgens het standaardprotocol (99,999%). Bovendien toont deze test dat de samenstelling, bij een concentratie van 90 ppm of meer, 100% doeltreffend was in het verminderen van de levensvatbaarheid van P. salmonis.

<u>Voorbeeld 3: In vivo experiment over zoötechnische prestatie / behandeling, onderdrukking en/of preventie van piscirickettsiosis</u>

Opstelling: vistanks met 50 zalmen die zijn geïnfecteerd met P. salmonis stam LF-89 (ATCC VR-1361) werden behandeld met hetzij 225 ppm van een MCFA-samenstelling van 40% C8, 40% C10 en 5% C12 in het watervolume van de tank, hetzij een controlemiddel zonder MCFA. De resultaten van de behandeling werden geëvalueerd na 10 dagen behandeling:

Met MCFA behandelde populatie	**Controlepopulatie**
2 overlijdens, populatie ziet er in het algemeen gezond uit	25 overlijdens, populatie duidelijk ziek

Na 15 dagen steeg het aantal overlijdens in de controlepopulatie tot 34, terwijl er in de met MCFA behandelde tank geen overlijdens meer werden gerapporteerd.

Dit experiment werd herhaald met geïnfecteerde forellen. Ook hier werden er minder overlijdens geobserveerd in de met MCFA behandelde populatie vergeleken met de controlepopulatie. We kunnen concluderen dat MCFA's kunnen worden gebruikt als een doeltreffende behandeling van piscirickettsiosis.

Er wordt verondersteld dat de onderhavige uitvinding niet beperkt is tot enige uitvoeringsvorm die hierboven is beschreven en dat bepaalde wijzigingen kunnen worden aangebracht aan het onderhavige voorbeeld zonder af te wijken van de bijgevoegde conclusies. De onderhavige uitvinding is bijvoorbeeld beschreven met verwijzing naar P. salmonis, maar het is duidelijk dat de uitvinding ook toegepast kan worden op piscirickettsiosis veroorzaakt door Piscirickettsia-achtige organismen (PLO) of, bijvoorbeeld, vis rickettsia-achtige organismen (RLO).

CONCLUSIES

1. Samenstelling voor gebruik bij de behandeling, onderdrukking en/of preventie van piscirickettsiosis, bij voorkeur bij aquatische poikilothermen, met het kenmerk, dat de genoemde samenstelling een of meerdere middellange ketenvetzuren (MCFA's) en/of derivaten daarvan omvat.
2. Samenstelling voor gebruik volgens de voorgaande conclusie, met het kenmerk, dat de MCFA's zijn gekozen uit de groep omvattende vetzuren met een langste continue keten van 5 koolstofatomen tot 12 koolstofatomen en derivaten daarvan.
3. Samenstelling voor gebruik volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de genoemde MCFA's zijn geselecteerd uit de groep omvattende capronzuur (C6), caprylzuur (C8), caprinezuur (C10), laurinezuur (C12), derivaten daarvan of een combinatie daarvan.
4. Samenstelling voor gebruik volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de genoemde samenstelling ten minste caprylzuur (C8), caprinezuur (C10), laurinezuur (C12) of een derivaat daarvan omvat.
5. Samenstelling voor gebruik volgens conclusie 4, waarbij de genoemde samenstelling

   tussen 30% en 70% caprylzuur (C8) of een derivaat daarvan;

   tussen 15% en 55% caprinezuur (C10) of een derivaat daarvan; en

   tussen 1% en 35% laurinezuur (C12) of een derivaat daarvan

   gebaseerd op het totale gewicht van de samenstelling omvat.
6. Samenstelling voor gebruik volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de totale hoeveelheid MCFA's in de samenstelling ligt tussen 1% en 100%, meer bij voorkeur tussen 5 en 50% gebaseerd op het totale gewicht of volume van de samenstelling.
7. Samenstelling voor gebruik volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de genoemde piscirickettsiosis wordt veroorzaakt door een of meerdere obligate intracellulaire parasitische soorten.
8. Samenstelling voor gebruik volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de genoemde piscirickettsiosis wordt veroorzaakt door ten minste één soort behorende tot de familie van Piscirickettsiaceae en/of de orde van Rickettsiales.
9. Samenstelling voor gebruik volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de genoemde piscirickettsiosis wordt veroorzaakt door ten minste één soort geselecteerd uit de groep omvattende *Piscirickettsia salmonis,* Piscirickettsia-achtige organismen en vis rickettsia-achtige organismen.

10. Samenstelling voor gebruik volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat een therapeutisch doeltreffende hoeveelheid van de genoemde samenstelling oraal wordt toegediend aan het genoemde aquatische poikilotherm.
11. Samenstelling voor gebruik volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de genoemde samenstelling verder vitamines, mineralen, spoorelementen of een combinatie daarvan omvat.
12. Samenstelling voor gebruik volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de genoemde samenstelling wordt toegediend als een poeder, een korrel, een pellet, een vloeistof of een pasta.
13. Samenstelling voor gebruik volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het genoemde aquatische poikilotherm een zalmachtige is.
14. Samenstelling voor gebruik volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het genoemde aquatische poikilotherm is geselecteerd uit de groep omvattende zalmen, forellen, zoetwaterige witte vissen en vlagzalmen.
15. Visvoeder omvattende een samenstelling volgens één der voorgaande conclusies 1 tot 14, waarbij de dosering van de genoemde samenstelling in het genoemde visvoeder 100 ppm tot 5000 ppm op gewichtsbasis bedraagt, gebaseerd op het totale gewicht van het genoemde visvoeder.
16. Werkwijze voor het verbeteren van de zoötechnische prestatie van aquatische poikilothermen omvattende de stap van het toedienen van een samenstelling omvattende een of meerdere middellange ketenvetzuren (MCFAs) en/of derivaten daarvan aan de genoemde poikilothermen.
17. Werkwijze volgens de voorgaande conclusie16, met het kenmerk, dat de totale hoeveelheid MCFA's in de samenstelling is begrepen tussen 1% en 100%, gebaseerd op het totale gewicht of volume van de samenstelling.
18. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies 16-17, met het kenmerk, dat het genoemde aquatische poikilotherm is geselecteerd uit de groep van zalmachtigen.
19. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies 16 tot 18, met het kenmerk, dat de dosering van de genoemde MCFA's en/of MCFA-derivaten 100 ppm tot 5000 ppm op gewichtsbasis bedraagt, gebaseerd op het totale gewicht van het voeder van de genoemde aquatische poikilothermen.
20. Werkwijze volgens één der conclusies 15 tot 16, waarbij de genoemde samenstelling wordt toegevoegd aan het water van de genoemde aquatische poikilothermen, en waarbij de concentratie van MCFA's of derivaten daarvan is begrepen tussen 100 en 5000 ppm in het genoemde water.

SAMENWERKINGSVERDRAG INZAKE OCTROOIEN

VERSLAG BETREFFENDE HET ONDERZOEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE OPGESTELD KRACHTENS ARTIKEL XI.23., §10 VAN HET BELGISCH WETBOEK VAN ECONOMISCH RECHT

IDENTIFICATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE	KENMERK VAN DE AANVRAGER OF GEMACHTIGDE **NUSC-029-BE**
Belgische nationale aanvrage nr. **201905082**	Datum van indiening **08-02-2019**
	Ingeroepen voorrangsdatum
Aanvrager (Naam) **NUTRITION SCIENCES N.V.**	
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type **11-05-2019**	Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. **SN73682**

I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)

Volgens de internationale octrooiclassificatie (CIB), of tezelfdertijd volgens de nationale classificatie en de CIB

A61K31/19;A61K31/20;A23K50/80;A01K61/13;A61P31/04;A61K45/06

II. ONDERZOCHTE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie

Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen
IPC	**A61K;C11C;A01K;A23K;A61P**

Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

III. ☐ **MEN IS VAN OORDEEL DAT BEPAALDE CONCLUSIES NIET HET ONDERWERP KONDEN UITMAKEN VAN EEN ONDERZOEK** (opmerkingen op aanvullingsblad)

IV. ☐ **GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING EN/OF VASTSTELLING BETREFFENDE DE OMVANG VAN HET ONDERZOEK** (opmerkingen op aanvullingsblad)

ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar de stand van de techniek
BE 201905082

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
INV. A61K31/19 A61K31/20 A23K50/80 A01K61/13 A61P31/04
A61K45/06
ADD.
Volgens de Internationale Classificatie van octrooien (IPC) of zowel volgens de nationale classificatie als volgens de IPC.

B. ONDERZOCHTE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte miminum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)
A61K C11C A01K A23K A61P

Onderzochte andere documentatie dan de mimimum documentatie, voor dergelijke documenten, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

Tijdens het onderzoek geraadpleegde elektronische gegevensbestanden (naam van de gegevensbestanden en, waar uitvoerbaar, gebruikte trefwoorden)
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	WO 2015/052672 A1 (NUTRITION SCIENCES N V [BE]) 16 april 2015 (2015-04-16) * bladzijde 7, regel 36 * * bladzijden 15-20; conclusies * -----	15-20
X,D	DATABASE WPI week 199228 Thomson Scientific, London, GB; AN 1992-231738 XP002793573, & JP H04 158750 A (KAO CORP) 1 juni 1992 (1992-06-01) in de aanvraag genoemd * samenvatting * ----- -/--	15-20

[X] Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.

[X] Leden van dezelfde octrooifamilie zijn vermeld in een bijlage

° Speciale categorieën van aangehaalde documenten

"A" niet tot de categorie X of Y behorende literatuur die de stand van de techniek beschrijft

"D" in de octrooiaanvrage vermeld

"E" eerdere octrooi(aanvrage), gepubliceerd op of na de indieningsdatum, waarin dezelfde uitvinding wordt beschreven

"L" om andere redenen vermelde literatuur

"O" niet-schriftelijke stand van de techniek

"P" tussen de voorrangsdatum en de indieningsdatum gepubliceerde literatuur

"T" na de indieningsdatum of de voorrangsdatum gepubliceerde literatuur die niet bezwarend is voor de octrooiaanvrage, maar wordt vermeld ter verheldering van de theorie of het principe dat ten grondslag ligt aan de uitvinding

"X" de conclusie wordt als niet nieuw of niet inventief beschouwd ten opzichte van deze literatuur

"Y" de conclusie wordt als niet inventief beschouwd ten opzichte van de combinatie van deze literatuur met andere geciteerde literatuur van dezelfde categorie, waarbij de combinatie voor de vakman voor de hand liggend wordt geacht

"&" lid van dezelfde octrooifamilie of overeenkomstige octrooipublicatie

Datum waarop het onderzoek naar de stand van de techniek van internationaal type werd voltooid	Verzenddatum van het rapport van het onderzoek naar de stand van de techniek van internationaal type
19 augustus 2019	

Naam en adres van de instantie	De bevoegde ambtenaar
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Steendijk, Martin

2

ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar de stand van de techniek
BE 201905082

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
A	M ROZAS ET AL: "Piscirickettsiosis and Piscirickettsia salmonis in fish: a review", JOURNAL OF FISH DISEASES, deel 37, nr. 3, 26 maart 2014 (2014-03-26) , bladzijden 163-188, XP55144904, ISSN: 0140-7775, DOI: 10.1111/jfd.12211 * bladzijden 180-182 *	1-20

A	WO 2011/119047 A1 (EWOS INNOVATION AS [NO]; TRANCOSO KIRSTEN JOSE MIGUEL [CL] ET AL.) 29 september 2011 (2011-09-29) * conclusies *	1-20

A	NO 20 171 171 A1 (SAPONIN RES CENTER S A [CL]) 13 juli 2017 (2017-07-13) * conclusies *	1-20

ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar de stand van de techniek
BE 201905082

In het rapport genoemd octrooigeschrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
WO 2015052672 A1	16-04-2015	CA 2924979 A1	16-04-2015
		CN 105611840 A	25-05-2016
		DK 3054783 T3	05-08-2019
		EA 201690483 A1	30-01-2017
		EP 3054783 A1	17-08-2016
		US 2016213029 A1	28-07-2016
		WO 2015052672 A1	16-04-2015
JP H04158750 A	01-06-1992	JP 2831835 B2	02-12-1998
		JP H04158750 A	01-06-1992
WO 2011119047 A1	29-09-2011	CA 2794480 A1	29-09-2011
		CL 2012002654 A1	09-08-2013
		CL 2015000848 A1	28-08-2015
		DK 2552431 T3	14-08-2017
		EP 2552431 A1	06-02-2013
		WO 2011119047 A1	29-09-2011
NO 20171171 A1	13-07-2017	CA 2972175 A1	29-01-2018
		CL 2017001679 A1	23-03-2018
		US 2018325970 A1	15-11-2018
		WO 2018018170 A1	01-02-2018

SCHRIFTELIJKE OPINIE

Dossier Nummer	Indieningsdatum *(dag/maand/jaar)*	Voorrangsdatum *(dag/maand/jaar)*	Aanvraagnummer
SN73682	08.02.2019		BE201905082

Classificatie (IPC)
INV. A61K31/19 A61K31/20 A23K50/80 A01K61/13 A61P31/04 A61K45/06

Aanvrager
NUTRITION SCIENCES N.V.

Deze schriftelijke opinie bevat een toelichting en de corresponderende pagina's met betrekking tot de volgende onderdelen:

- ☒ Onderdeel I Basis van schriftelijke opinie
- ☐ Onderdeel II Voorrang
- ☐ Onderdeel III Formulering van een opinie inzake nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid niet mogelijk
- ☐ Onderdeel IV De aanvraag heeft betrekking op meer dan één uitvinding
- ☒ Onderdeel V Gemotiveerde verklaring ten aanzien van nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid; citaten en explicaties ter ondersteuning van deze verklaring
- ☐ Onderdeel VI Bepaalde geciteerde documenten
- ☐ Onderdeel VII Gebreken in de aanvraag
- ☒ Onderdeel VIII Opmerkingen betreffende de aanvraag

De Examinator
Steendijk, Martin

Aanvraagnummer

SCHRIFTELIJKE OPINIE

BE201905082

Onderdeel I Basis van de opinie

1. Deze opinie is opgesteld op basis van de conclusies ingediend voor aanvang van het onderzoek.

2. Met betrekking tot **nucleotide en/of aminozuur sequenties** die, in voorkomend geval, genoemd worden in de aanvraag, is deze opinie opgesteld op basis van de volgende elementen:

a. Aard van het element:

☐ een lijst van de sequentie(s)

☐ tabel(len) met betrekking tot de lijst van de sequentie(s)

b. Type drager:

☐ op papier

☐ in elektronische vorm

c. Moment van indiening of levering:

☐ opgenomen in de aanvraag zoals ingediend

☐ samen met de aanvraag elektronisch ingediend

☐ later geleverd

3. ☐ Bovendien, wanneer er mer dan één versie of kopie van een sequentielijst of van één of meerdere tabellen die er betrekking op hebben, werd ingediend, zijn de benodigde verklaringen ingediend,dat de informatie, die later of bij wijze van aanvullende kopieën werd geleverd naar gelang het geval, identiek is aan diegene die oorspronkelijk werd geleverd en niet verder gaat dan de openbaarmaking in de internationale aanvraag zoals oorspronkelijk ingediend.

4. Aanvullende opmerkingen:

Aanvraagnummer

SCHRIFTELIJKE OPINIE

BE201905082

Onderdeel V Gemotiveerde verklaring ten aanzien van nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid; citaten en explicaties ter ondersteuning van deze verklaring

1. Verklaring

Nieuwheid	Ja:	Conclusies	1-14
	Nee:	Conclusies	15-20
Inventiviteit	Ja:	Conclusies	1-14
	Nee:	Conclusies	15-20
Industriële toepasbaarheid	Ja:	Conclusies	1-20
	Nee:	Conclusies	

2. Citaten en explicaties:

Zie apart blad

Onderdeel VIII Opmerkingen betreffende de aanvraag

Zie apart blad

box V

box VIII

1) The present application relates to a composition comprising medium chain fatty acid (MCFA), e.g. caprylic, capric or lauric acid, for use in treatment / prevention of piscirickettsiosis (claims 1-14), a fish feed comprising such MCFA containing composition(100-5000 ppm) (claim 15) and a method for enhancing zootechnical performance using such composition comprising MCFA (claims 16-20).

2) Cited documents

D1 WO 2015/052672 A1 (NUTRITION SCIENCES N V [BE]) 16 april 2015 (2015-04-16)

D2 DATABASE WPI
week 199228
Thomson Scientific, London, GB;
AN 1992-231738
& JP H04 158750 A (KAO CORP) 1 juni 1992 (1992-06-01)

D3 M ROZAS ET AL: "Piscirickettsiosis and Piscirickettsia salmonis in fish: a review",
JOURNAL OF FISH DISEASES,
deel 37, nr. 3, 26 maart 2014 (2014-03-26), bladzijden 163-188,
XP55144904,
ISSN: 0140-7775, DOI: 10.1111/jfd.12211

D4 WO 2011/119047 A1 (EWOS INNOVATION AS [NO]; TRANCOSO KIRSTEN JOSE MIGUEL [CL] ET AL.) 29 september 2011 (2011-09-29)

D5 NO 20 171 171 A1 (SAPONIN RES CENTER S A [CL]) 13 juli 2017 (2017-07-13)

3) Novelty

3.1 Documents D1 and D2 already describe fish feed products comprising MCFAs, including relevant combinations, which exhibit antibacterial properties. In view of documents D1/D2 the subject-matter of claim 15, which is not characterized by the particular indication relating to piscirickettsiosis, is considered to lack novelty.

Furthermore, in view of the beneficial properties of the feed products described in documents D1 and D2 the subject-matter of claims 16-20, which merely refers to enhancement of zootechnical performance is considered implicitly anticipated by documents D1 and D2.

Documents D1 and D2 do not specifically refer to treatment of piscirickettsiosis.

3.2 Documents D3-D5 describe various approaches for treatment of piscirickettsiosis. These documents do not refer to compositions comprising MCFAs as presently defined.

4) Inventive step

In as far as the claimed subject-matter is new (claims 1-14) the following observations regarding the requirement of inventive step apply.

Documents D3-D5 may be considered as representative for the closest prior art. The problem to be solved may be seen in the provision of further effective treatment / prevention of piscirickettsiosis. The application reports on experiments in which a composition comprising MCFA was found highly effective in infected fish. None of documents D3-D5 provides any suggestion towards the utility of MCFAs. Moreover, in view of the particular challenge presented by piscirickettsiosis, as evidenced by document D3, the effectivity of MCFAs against piscirickettsiosis cannot be considered as obvious merely in view of the antimicrobial properties reported in documents D1 and D2.

5) Further observations

5.1 The claims refer to MCFAs or derivatives thereof. The term derivative is vague and has no defined meaning, due to which the claims lack clarity.

5.2 Claims 16-20 relate to a method of enhancing zootechnical perfomance. It seems evident in view of the known beneficial properties of MCFA's (D1/D2), that enhanced zootechnical perfomance is linked to enhanced health of the animals, such that the method cannot be considered separate from therapeutic / prophylactic treatment, which may be excluded from patentability.

It is further noted that having regard to documents D1/D2 no common distinguishing aspect is evident between the utility of the known MCFA comprising compositions in treatment of piscirickettsiosis and the utility of the known MCFA comprising compositions for enhancing zootechnical perfomance.

box V

box VIII

1) De onderhavige aanvrage betreft een samenstelling omvattende middellange ketenvetzuur (MCFA), bijvoorbeeld capryl-, caprine- of laurinezuur, voor gebruik bij de behandeling / preventie van piscirickettsiosis (conclusies (1-14), een visvoeder omvattende een dergelijke MCFA-bevattende samenstelling (100-5000 ppm) (conclusie 15) en een werkwijze voor het verbeteren van de zoötechnische prestatie door middel van een dergelijke samenstelling omvattende MCFA (conclusies 16-20).

2) Geciteerde documenten

D1 WO 2015/052672 A1 (NUTRITION SCIENCES N V [BE]) 16 april 2015 (16-04-2015)

D2 DATABASE WPI
week 199228
Thomson Scientific, London, GB;
AN 1992-231738
& JP H04 158750 A (KAO CORP) 1 juni 1992 (01-06-1992)

D3 M ROZAS ET AL: "Piscirickettsiosis and Piscirickettsia salmonis in fish: a review",
JOURNAL OF FISH DISEASES,
deel 37, nr. 3, 26 maart 2014 (26-03-2014), bladzijden 163-188,
XP55144904,
ISSN: 0140-7775, DOI: 10.1111/jfd.12211

D4 WO 2011/119047 A1 (EWOS INNOVATION AS [NO]; TRANCOSO KIRSTEN JOSE MIGUEL [CL] ET AL.) 29 september 2011 (29-09-2011)

D5 NO 20 171 171 A1 (SAPONIN RES CENTER S A [CL]) 13 juli 2017 (13-07-2017)

3) Nieuwheid

3.1 In de documenten D1 en D2 worden reeds visvoederproducten omvattende MCFA's, inclusief relevante combinaties, beschreven, welke antibacteriële eigenschappen vertonen. Gezien de documenten D1/D2 wordt de materie volgens

conclusie 15, welke niet wordt gekenmerkt door de specifieke indicatie betreffende piscirickettsiosis, geacht geen nieuwheid te omvatten.

Gezien de voordelige eigenschappen van de voederproducten als beschreven in de documenten D1 en D2 wordt voorts de materie volgens de conclusies 16-20, welke veeleer verwijst naar verbetering van zoötechnische prestatie, geacht impliciet te worden geanticipeerd door de documenten D1 en D2.

In de documenten D1 en D2 wordt niet specifiek verwezen naar behandeling van piscirickettsiosis.

3.2 In de documenten D3-D5 worden verschillende benaderingen voor behandeling van piscirickettsiosis beschreven. In deze documenten wordt niet verwezen naar samenstellingen omvattende MCFA's zoals momenteel gedefinieerd.

4) Inventiviteit

Voor zover de materie volgens de conclusies nieuw is (conclusies 1-14), gelden de volgende opmerkingen met betrekking tot de eis van inventiviteit.

De documenten D3-D5 kunnen worden geacht representatief te zijn voor de meest nabijgelegen stand van de techniek. Het op te lossen probleem kan worden beschouwd als het voorzien in verdere effectieve behandeling / preventie van piscirickettsiosis. In de aanvrage worden experimenten vermeld waarin werd gevonden dat een samenstelling omvattende MCFA zeer effectief was bij geïnfecteerde vissen. In geen van de documenten D3-D5 wordt enige suggestie richting de bruikbaarheid van MCFA's voorzien. Gezien de specifieke uitdaging gegeven door piscirickettsiosis, zoals onderbouwd in document D3, kan de effectiviteit van MCFA's tegen piscirickettsiosis bovendien niet worden geacht voor de hand liggend te zijn, gezien veeleer de antimicrobiële eigenschappen als vermeld in de documenten D1 en D2.

5) Verdere opmerkingen

5.1 In de conclusies wordt verwezen naar MCFA's of derivaten daarvan. De term derivaat is vaag en heeft geen gedefinieerde betekenis, waardoor de conclusies onvoldoende duidelijk zijn.

5.2 De conclusies 16-20 betreffen een werkwijze voor het verbeteren van de zoötechnische prestatie. Gezien de bekende voordelige eigenschappen van MCFA's (D1/D2) lijkt het vanzelfsprekend te zijn dat verbeterende zoötechnische prestatie is gerelateerd aan verbeterde gezondheid van de dieren, waardoor de werkwijze niet

afzonderlijk kan worden beschouwd van therapeutische / profylactische behandeling, hetgeen kan worden uitgesloten van octrooieerbaarheid.

Voorts wordt opgemerkt dat met betrekking tot de documenten D1/D2 er geen gemeenschappelijk onderscheidend aspect duidelijk is tussen de bruikbaarheid van de bekende MCFA-omvattende samenstellingen bij behandeling van piscirickettsiosis en de bruikbaarheid van de bekende MCFA-omvattende samenstellingen voor het verbeteren van de zoötechnische prestatie.