



FUNKČNÍ VZOREK

**Metoda detekce protilátek proti složkám
preparátu Improvac v séru prasat**

**Hana Kudláčková
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.**

4302
2016

Funkční vzorek

4302/2016

**Metoda detekce protilátek proti složkám preparátu Improvac
v séru prasat**

**Hana Kudláčková
Martin Faldyna**

2016

ISBN 978-80-86895-94-9

Funkční vzorek

Metoda detekce protilátek proti složkám preparátu Improvac v séru prasat

Hana Kudláčková
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.

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

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu (QJ1510233), projektu Rozvoj výzkumné organizace RO0516 a projektu LO1218 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci programu NPU-I.

2016

OBSAH

1. Úvod	3
2. Cíl metodiky	4
3. Vlastní popis funkčního vzorku	5
<i>3.1. Sestavení ELISA metody</i>	5
<i>3.2. Validace ELISA metody</i>	5
<i>3.3. Ověření použitelnosti ELISA metody na reálných vzorcích</i>	7
4. Srovnání „novosti postupů“	8
5. Uplatnění funkčního vzorku	8
6. Ekonomické aspekty	8
7. Seznam použité související literatury	9
8. Dedikace	9

1. Úvod

Kastrace prasat je častým tématem u odborné i laické veřejnosti. V současné době jsou uplatňovány tři hlavní způsoby prevence kančího pachu u vepřového masa, konkrétně předčasná porážka, odstranění varlat (chirurgická kastrace) či imunokastrace.

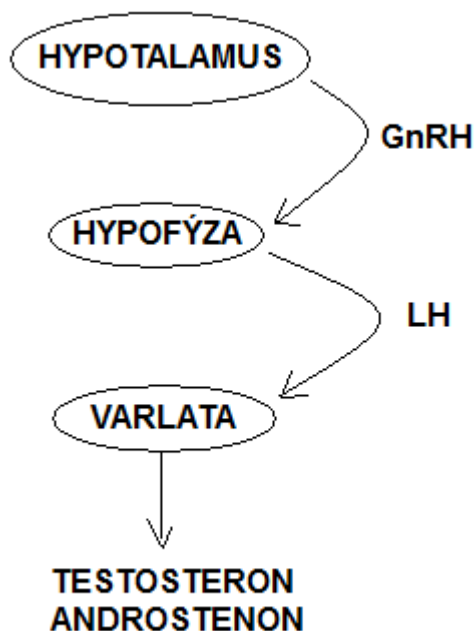
Nejvíce diskutovanou problematikou je chirurgická kastrace prasat, která představuje problém z hlediska dobrých životních podmínek zvířat. Na základě fyziologických a etologických parametrů bylo vědecky dokázáno, že chirurgická kastrace představuje bolestivý zákrok i tehdy, je-li prováděna u velmi mladých zvířat. Současná evropská legislativa (Směrnice Rady 2008/120/ES, kterou se stanoví minimální požadavky pro ochranu prasat) povoluje provádění kastrace prasat pouze odborně způsobilým osobám, tj. veterinárním lékařům nebo školeným osobám. Chirurgická kastrace se provádí u mladých zvířat - bez anestezie ji lze provádět do 7 dní po narození, po této lhůtě musí být při chirurgické kastraci použita anestezie a následné tišení bolesti. Stanovisko vědecké komise pro zdraví a dobré životní podmínky zvířat Evropského úřadu pro bezpečnost potravin **EFSA (2004)** ovšem uvádí, že chirurgická kastrace prasat je bolestivá v každém věku. Proto se řada evropských zemí rozhodla od chirurgické kastrace ustoupit a nahradit ji jinými, nebolestivými metodami. Jedním z prvních kroků je zavedení analgezie nebo anestezie k utišení bolesti, které se používá od 1. ledna 2012. Dalším krokem, ke kterému se evropské země zavázaly, je postupné upouštění od chirurgické kastrace. Tento způsob prevence kančího pachu by se měl přestat používat do 1. ledna 2018.

Kastrací samců je dosaženo dvou základních cílů - welfare prasat, která jsou s narůstající pohlavní aktivitou více agresivní vůči ostatním chovaným prasatům i vůči ošetřovatelům, a zabránění vzniku tzv. kančího pachu, který může znehodnotit chuť masa. Kančí pach je senzorická odchylka vepřového masa patrná při tepelné úpravě zejména tukové tkáně některých jedinců samčího pohlaví. Je způsoben vysokou koncentrací dvou látek, a to androstenonu (chemicky: 5-androst-16-en-3-on) a skatolu (3-methyl-indol).

Androstenon je látka steroidní povahy, nemá žádnou hormonální funkci. Je produkován v Leydigových buňkách varlat spolu s dalšími steroidy, jako je samčí pohlavní hormon testosteron. U kanců je androstenon transportován do slinných žláz, kde je přítomný s jinými steroidy (3-androstenol, 3 β -androstenol). Kromě androstenonu se na kančím pachu podílí skatol (a také indol), které vznikají v tlustém střevě mikrobiální degradací aminokyseliny L-tryptofanu (**Chen, 2007**). Tvorba indolu v tlustém střevě probíhá za účasti řady bakterií, produkce skatolu vyžaduje přítomnost vysoce specifických mikroorganismů. Obě látky jsou částečně absorbovány střevní sliznicí a metabolizovány v játrech působením enzymu cytochrom P450. Nemetabolizovaný podíl skatolu se hromadí v tuku a je odpovědný za kančí pach. Koncentraci skatolu i indolu ovlivňuje i složení krmiva. Např. hladinu skatolu lze snížit úpravou krmné dávky s využitím prebiotik, ale hladinu androstenonu lze snížit pouze kastrací (**Zammerini et al., 2012**).

Imunokastrace je založená na indukci protilátek proti endogennímu hormonu uvolňujícímu gonadotropin (gonadotropin releasing factor GnRF), který je zodpovědný za kontrolu funkce

varlat prostřednictvím gonadotropních hormonů LH (luteinizační hormon) a FSH (folikuly stimulující hormon). Tím dojde ke snížení koncentrace testosteronu a jiných steroidů varlat včetně androstenonu a nepřímým účinkem také skatolu (**Bonneau et al., 1994**).



V České republice registrovaný preparát s indikací imunologického potlačení funkce varlat je **IMPROVAC**, injekční roztok pro prasata. Tento preparát obsahuje syntetický peptidový analog GnRH (kratší o 1 aminokyselinu než přirozený hormon) spojený s imunogenním nosným proteinem - difteriovým toxoidem. Preparát se aplikuje nekastrovaným kancům od 8 týdnů života. Dočasného potlačení funkcí varlat je dosaženo druhou aplikací preparátu v odstupu nejméně 4 týdnů po primoaplikaci. Tento účinek se projeví v průběhu jednoho týdne po aplikaci a snížení hodnot androsteronu a skatolu bylo prokázáno od 4 do 6 týdnů po aplikaci (**Zamaratskaia et al., 2008**).

Jednou z potenciálních nevýhod tohoto způsobu kastrace může být variabilita v intenzitě imunitní odpovědi vyvolaná individuální variabilitou jednotlivých zvířat, ale také např. vlivem výživy nebo např. vlivem subklinicky probíhajících infekcí. Proto je za určitých okolností vhodná individuální diagnostika intenzity odpovědi jednotlivých zvířat.

2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Jedním ze způsobů průkazu indukce požadované imunitní odpovědi je detekce specifických protilátek proti složkám preparátu. Proto cílem metodiky bylo sestavit a validovat metodu ELISA pro detekci specifických protilátek proti složkám preparátu **IMPROVAC**.

3. Vlastní popis funkčního vzorku

3.1. Sestavení ELISA metody

Jako antigen byl použit komplex GnRH s difterickým toxoidem obsažený v preparátu IMPROVAC (Pfizer Animal Health, S.A., Belgie) naředěný tak, aby jeho koncentrace byla 1 µl/ml ve vazném karbonátovém pufru o pH 9,6. To bylo aplikováno v objemu 100 µl do jamek mikrotitrační destičky (Maxisorb, NUNC, USA). Vazba na dno jamky probíhala přes noc v chladničce. Následovalo 5x promytí destiček směsí PBS a 0,05% Tween 20 s použitím poloautomatické promývačky ELx50 (Biotek Instrumentals, USA).

Obsazení případných nespecických vazebných míst bylo provedeno přidáním roztoku obsahujícího 0,5% kaseinu a 10% sacharózy na 60 min a následným proplachem.

Vyšetřovaná séra před a po aplikaci preparátu IMPROVAC byla naředěna 300 x. Ředící roztok měl složení PBS, 0,05% Tween 20 a 0,5% kaseinový hydrolyzát. Inkubace sér v jamkách mikrotitrační destičky probíhala při pokojové teplotě po dobu 60 minut následované 5x promytím směsí PBS a 0,05% Tween 20.

Do jamek byl přidán 30.000 x ředěný konjugát křenové peroxidázy s polyklonální protilátkou anti-pig IgG (Bethyl, USA) v objemu 100 µl na jamku v ředícím roztoku (PBS, 0,05% Tween a 0,5% kaseinový hydrolyzát). Inkubace při pokojové teplotě trvala 30 minut a byla následována 5x promytím směsí PBS a 0,05% Tween 20.

V dalším kroku byl aplikován substrát TMB (Test-line, ČR) v objemu 100 µl do každé jamky, který se nechal působit po dobu 30 min. Průběh reakce byl zastaven přidáním 2M H₂SO₄ v objemu 50 µl do každé jamky. Absorbance intenzity barevné reakce byla měřena při 450 nm (multifunkční reader Synergy H1, Biotek Instrumentals, USA).

3.2. Validace ELISA metody

3.2.1. Homogenita potažené destičky

Prováděla se v dané šarži na jedné mikrotitrační destičce v 96 jamkách s jedním sérem v ředění 300x. Provedl se standardní test podle pracovního postupu uvedeného výše a byly vypočteny hodnoty průměru absorbancí, směrodatné výběrové odchylky a variačního koeficientu.

Výpočet:

- průměrná hodnota absorbance – vzorec č. 1

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

kde x ... hodnota absorbance vzorku
 n ... počet vzorků

- směrodatná výběrová odchylka – vzorec č. 2

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

kde x ... hodnota absorbance vzorku
 $\bar{x}$... průměrná hodnota absorbance
 n ... počet vzorků

- variační koeficient – vzorec č. 3

$$CV (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

kde SD ... směrodatná výběrová odchylka
 $\bar{x}$... průměrná hodnota absorbance

Při hodnocení homogenity by variační koeficient neměl překročit hodnotu 10 % .

Vypočtené hodnoty

variační koeficient	8,19 %
směrodatná výběrová odchylka	0,0324

3.2.2. Opakovatelnost – intra-assay

Prováděla se v jedné šarži na jedné mikrotitrační destičce minimálně se 4 vzorky v zastoupení 2 vzorky s nízkou absorbancí a 2 a vzorky s vysokou absorbancí v 16 jamkách od každého vzorku. Provedl se test podle pracovního postupu uvedeného výše. Pro každý vzorek byla vypočtena průměrná hodnota absorbance, směrodatné výběrové odchylky a variační koeficienty. Pro celý rozsah byla následně vypočtena směrodatná odchylka a variační koeficient, které vyjadřují přesnost a relativní přesnost pro celý rozsah.

Výpočet: průměrné hodnoty absorbance, směrodatné výběrové odchylky a variační koeficienty viz vzorce č. 1, 2 a 3.

- přesnost pro celý rozsah – vzorec č. 4

$$SD = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 \dots (n_k - 1)s_k^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) \dots (n_k - 1)}}$$

kde s ... směrodatná výběrová odchylka vzorku
 n ... počet vzorků

- relativní přesnost pro celý rozsah – vzorec č. 5

$$CV = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)v_1^2 + (n_2 - 1)v_2^2 \dots (n_k - 1)v_k^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) \dots (n_k - 1)}}$$

kde v ... variační koeficient vzorku

n ... počet vzorků

Vypočtené hodnoty

přesnost pro celý rozsah **0,0047**

relativní přesnost pro celý rozsah **9,64 %**

3.2.3. Opakovatelnost – inter-assay

Prováděla se v jedné šarži jako 10 samostatných analýz. Testovaly se 4 vzorky – 2 s nízkou a 2 s vysokou absorbancí, každý vzorek ve 4 jamkách, současně se analyzovaly slepé vzorky a kontrolní séra soupravy testované šarže. Provedl se test podle pracovního postupu uvedeného výše. Pro každý vzorek byla vypočtena průměrná hodnota absorbance, směrodatná výběrová odchylka a variační koeficient a pro celý rozsah soupravy přesnost a relativní přesnost.

Výpočet: průměrná hodnota absorbance, směrodatná výběrová odchylka, variační koeficient, přesnost a relativní přesnost pro celý rozsah – viz vzorce č. 1, 2, 3, 4 a 5.

Vypočtené hodnoty

Přesnost pro celý rozsah **0,4339**

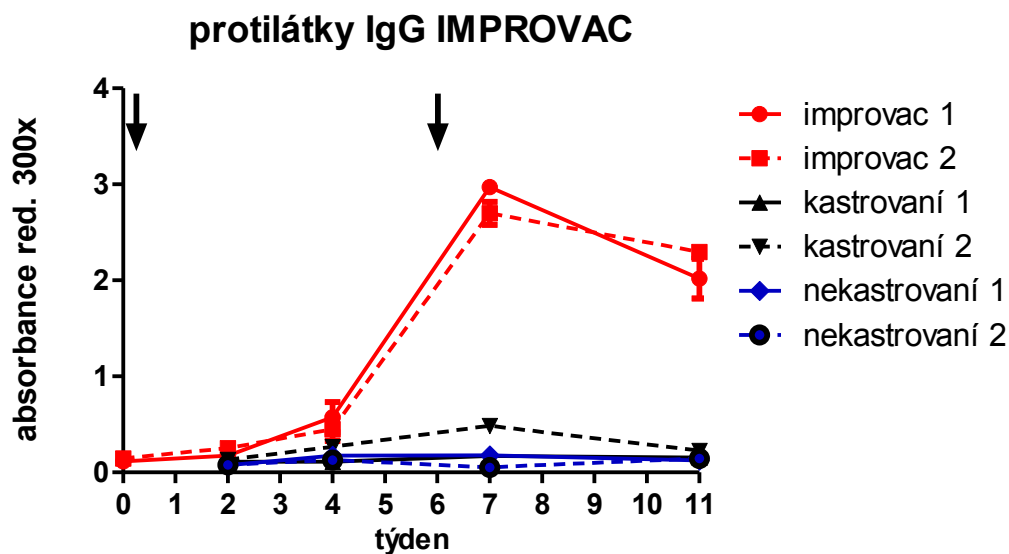
Relativní přesnost pro celý rozsah **8,9 %**

3.3. Ověření použitelnosti ELISA metody na reálných vzorcích

ELISA test sestavený a použitý tak, jak je popsáno v předchozích kapitolách, byl ověřen na reálných vzorcích. Tyto vzorky byly získány v průběhu experimentálního použití preparátu Improvac v prostorách experimentálního zařízení Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. Tento pokus byl schválen rezortní komisí Ministerstva zemědělství ČR pod kódem MZe 1685.

Pokus byl rozdělen do dvou na sobě nezávislých časově oddělených opakování. Celkem bylo použito 40 kanečků rozdělených pro tyto účely do 3 skupin:

- 10 kanečků kastrovaných chirurgicky ve věku 6-7 dní života
- 10 kanečků kastrovaných imunologicky aplikací preparátu Improvac v souladu s doporučením výrobce (subkutánní aplikace 2 ml preparátu ve věku 8 týdnů a opakovaně za 6 týdnů)
- 20 kanečků nekastrovaných vůbec



Výsledky stanovení přítomnosti protilátek proti složkám preparátu Improvac v séru prasat kastrovaných preparátem Improvac (označení jako „improvac“, n=10), kastrovaných chirurgicky (označení jako „kastrovaní“, n=10) a nekastrovaných (označení jako „nekastrovaní“, n=20). Výsledky jsou znázorněny jako průměrné hodnoty zvířat zařazených do dvou na sobě nezávislých časově oddělených experimentů (označení jako „1“ a „2“).

4. Srovnání „novosti postupů“

Rutinní detekce specifických protilátek proti složkám preparátu Improvac není podle našich vědomostí v současné době používána jako průkaz úspěšné a dostatečné imunitní odpovědi zvířat, kterým byl tento preparát aplikován. Využití námi sestavené ELISA by mohlo reagovat na případnou potřebu tyto protilátky detekovat.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Funkční vzorek je na pracovištích autorů zaveden. Jeho další případné komerční využití závisí na zájmu terénních nebo laboratorních pracovníků. Ale vzhledem k tomu, že se evropské země zavázaly k postupnému upouštění od chirurgické kastrace, která by se měla přestat používat do 1. ledna 2018, a vzhledem k tomu, že imunokastrace je jedním z alternativních způsobů prevence kančího pachu, dá se předpokládat, že o funkční vzorek by mohly projevit zájem např. biotechnologické společnosti vyrábějící imunodiagnostika.

6. Ekonomické aspekty

V současné době není možné ekonomické aspekty funkčního vzorku určit. Tyto aspekty budou závislé na několika faktorech:

- intenzita implementace dohody o ukončení používání chirurgické kastrace bez anestezie,

- reálná poptávka po takovéto diagnostice ze strany laboratoří nebo zpracovatelského průmyslu, ale potenciálně také např. ze strany dozorových orgánů – Česká zemědělská a potravinářská inspekce, Státní veterinární správa ČR.
- případný export takového produktu.

Použití metody ELISA představuje levnější a rychlejší cestu identifikovat individuálně nebo na úrovni směsných vzorků úroveň přetrvávajících GnRH-specifických protilátek jako známky dostatečně vysoké imunitní odpovědi na aplikaci preparátu Improvac a s tím spojeného útlumu „kančího zápachu“.

7. Seznam použité literatury

- EFSA (2004): Welfare aspects of the castration of piglets. Scientific Report of the Scientific Panel for Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare aspects of the castration of Piglets. European Food Safety Authority AHAW/04-087, 1-100.
- Chen, G. (2007): Physiological and Biochemical Factors Responsible for Boar Taint. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 110, 1-52.
- Bonneau, M., Dufour, R., Chouvet, C., Roulet, C., Meadus, W., Squires, E.J. (1994): The effects of immunization against luteinizing hormone-releasing hormone on performance, sexual development, and levels of boar taint-related compounds in intact male pigs. *Journal of Animal Sciences*, 72, 14-20.
- Zamaratskaia, G., Andersson, H.K., Chen, G., Andersson, K., Madej, A., Lundström, K. (2008): Effect of a Gonadotropin-releasing Hormone Vaccine (Improvac™) on Steroid Hormones, Boar Taint Compounds and Performance in Entire Male Pigs. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 351-359.
- Zammerini, D., Wood, J.D., Whittington, F.M., Nute, G.R., Hughes, S.I., Hazzledine, M., Matthews, K. (2012): Effect of dietary chicory on boar taint. *Meat Science*, 91, 396-401.

8. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu (QJ1510233), projektu Rozvoj výzkumné organizace RO0516 a projektu LO1218 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci programu NPU-I.

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70, 621 00 Brno

Název: **Metoda detekce protilátek proti složkám preparátu Improvac v séru prasat**

Autoři: Hana Kudláčková
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.



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

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