

OVĚŘENÁ TECHNOLOGIE

**Veterinární dietetický přípravek
fortifikovaný vaječnou
hmotou obsahující protilátky IgY
specifické proti *Escherichia coli*
a rotavirům**

**MVDr. Josef Krejčí
MVDr. Jan Bernardy, Ph.D.
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.**

**4796
2017**

Ověřená technologie 4796/2017

**Veterinární dietetický přípravek fortifikovaný vaječnou hmotou obsahující
protilátky IgY specifické proti *Escherichia coli* a rotavirům**

Autoři:

MVDr. Josef Krejčí

MVDr. Jan Bernardy, Ph.D.

MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.

MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 296/70, Brno

Ověřená technologie byla vyvinuta v rámci projektů Ministerstva zemědělství ČR (QJ1310258 a RO0517) a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR NPU-I LO1218.

ISBN 978-80-88233-26-8

Technická dokumentace

Účel použití:

Krmivo sloužící k prevenci nebo podpůrné léčbě poodstavových průjmů u selat.

Popis výrobku:

Veterinární krmný přípravek, který má vhodné antimikrobiální a imunomodulační účinky sloužící k ochraně hospodářských zvířat, zejména selat, před poodstavovými průjmy, a tím omezení úhynů hospodářských zvířat, zejména selat po jejich odstavení, nebo nutnosti použít antimikrobiální léčbu nebo suplementaci krmné dávky oxidu zinku.

Jedná se o granulovanou krmnou směs s obsahem zejména pšenice, ječmene a extrahovaného sójového šrotu, která je obohacena o 0,8% sušené vaječné melanže, která byla vyrobena z vajec snesených nosnicemi, které byly imunizovány antigeny z bakterie *Escherichia coli* a rotavirů.

Vývoj a výroba této krmné směsi reaguje na stupňující se tlak na omezení používání antibiotik nebo oxidů zinku.

Podmínky výroby:

Imunizace nosnic

Pro imunizaci slepic byly použity bakteriální kmeny *Escherichia coli* (*E.coli*) a prasečí rotavirus A.

Prasečí rotavirus, katalogové číslo sbírky CAPM V-334, kmen OSU (taxonomické zařazení: rod *Rotavirus*, druh *Rotavirus A*, původ kmene: prase, střevo - trus a střevní obsah selat s gastroenteritidou, země původu: USA).

Kultivace rotaviru:

- buněčná linie fetálních opičích (*Cercopithecus aethiops*) ledvin, MA-104, v monolayeru, kultivační médium DMEM (glukóza 4,5 g/l, 8-10% FBS)
- aktivace rotaviru před infekcí buněk: zásobní virovou suspenzi naředit 100x v DMEM s trypsinem (10 µg/ml), inkubovat 1hod/37°C
- infekce buněk: slít kultivační médium, monolayer pečlivě opláchnou dvakrát PBS, infikovat aktivovaným virem (na 25 cm² kultivační láhev 0,5 ml viru), inkubovat 30 min/37°C, doplnit kultivačním médiem DMEM (glukóza 4,5 g/l) s trypsinem (2 µg/ml)
- kultivace do 2-3 dny/37°C do vytvoření CPE na 80% monolayeru, zamrazit ve vodorovné poloze v -80°C, po rozmrazení řádně promíchat a rozdělit do 1 ml alikvotů, uchovávat v hlubokomrazícím boxu při -80°C
- metodou kvantifikační reverzní transkripční PCR v reálném čase je prováděna kvantifikace podle kalibrační křivky.

Bakteriální kmeny *Escherichia coli*, 12548 (O149: F4ac) a 8914 (O141: F18ac) z důvodu vysoké exprese adhezinů a kmeny 12640 (O149: F4/LT) a 11758 (O8: F18) z důvodů vysoké adherence.

Kultivace *Escherichia coli*:

- příprava narostlé kultury – do 5 ml média (kmeny s antigenem F4 - médium MINCA, kmeny s antigenem F18 - kaseinhydrolyzátové médium) přes noc na třepačce při teplotě 37°C
- naočkování tekuté půdy (250 ml Minca či kaseinhydrolyzátového média) 1/10 narostlé kultury – kultivace přes noc na třepačce při teplotě 37°C
- kontrola čistoty – vyočkování narostlých kultur na krevní agar, kontrola růstu bakterií a jejich následná inaktivace 0,5% roztokem formalínu do následujícího dne
- kontrola sterility – po inaktivaci 0,5% roztokem formalínu narostlých kultur vyočkování 100 µl narostlé kultury na krevní agar, kontrola růstu bakterií po 48 hod. a po 72 hod.

Intramuskulární imunizace nosnic ve věku 16 týdnů.

Imunizační dávka obsahuje *E.coli* F4+ a *E.coli* F18+ ($1,5 \times 10^9$ CFU na jedno zvíře) a rotavirem (4×10^{14} kopií na jedno zvíře).

den 0	antigeny + 50 % Freundova kompletního adjuvans
den 30	antigeny + 50 % Freundova inkompletního adjuvans
den 60	antigeny + 50 % Freundova inkompletního adjuvans
den 120	antigeny + 50 % Freundova inkompletního adjuvans

Sušení vaječné melanže

Vejce mohou být sbírána od začátku snášky. Vaječná hmota je připravena homogenizací vaječných obsahů (bílek + žloutek). Před samotnou homogenizací byla odstraněna vaječná poutka (chalázie) filtrací přes gázu.

Homogenáty je nutné sušit sprejovým sušením v rozsahu teplot 155-200 °C (vzduch) a 65-80 °C (produkt).

Kontrola kvality vaječné melanže:

Obsah protilátek ve vaječné melanži se kontroluje pomocí metody ELISA podle postupu:

- vazba antigenu - antigen v koncentraci 1 µg/ml ve vazném karbonátovém pufru pH 9,6; 100 µl / jamku, vazba přes noc lednice, desky Maxisorp (Nunc)
- 5x promytí PBS + 0,05 % Tween 20
- blokace 60 min 0,5 % kasein + 10% sacharóza
- vyředění vzorků 100x a dále 3kově v ředícím roztoku – PBS + 0,05 % Tween 20 + 0,5 % kaseinový hydrolyzát
- inkubace 60 min při pokojové teplotě
- 5x promytí v PBS + 0,05 % Tween 20
- konjugát anti-ChIgY (Bethyl) s křenovou peroxidázou ředěný 60 000×, 100 µl /jamka, 60 minut při pokojové teplotě
- 5x promytí v PBS + 0,05 % Tween 20
- aplikace substrátu – TMB (Test-line), 100 µl /jamku, doba působení 0 - 30 min.
- zastavení reakce přidáním 2M H₂SO₄ 50 µl/jamku
- měření při 450 nm

Příprava granulovaného veterinárního dietetického přípravku

- jednotlivé komponenty, použité na přípravu granulovaného veterinárního dietetického přípravku jsou na vstupu kontrolovány podle definovaných specifikací
- příprava sypké homogenní směsi:
 - navážení sypkých komponent s přesností na 0,5%
 - úprava velikosti částic u zrnin šrotováním
 - nadávkování do míchacího zařízení
 - homogenizace v míchacím zařízení DDMA40
 - doba homogenizace suchých komponent 3 minuty
 - nástřik kapalných komponent
 - míchání kompletní směsi 3 minuty
- granulace sypké směsi
 - homogenní sypká směs je napařována a míchána
 - vlastní granulace - protlačení přes matrici (2,3mm)
 - chlazení
 - sítování
- balení na pytlovací lince do papírových pytlů s PE nástřikem (25 kg) opatřených etiketou a uzavření pytle šitím

Finální složení veterinárního dietetického přípravku:

pšenice, ječmen, extrahovaný sójový šrot 48 %, rybí moučka, sušená syrovátka, sójový olej, mouka krmná pšeničná, chlorid sodný, L-lyzin, L-threonin, D-, L-methionin, L-tryptofan, premix doplňkových látek.

Obsah v 1 kg:

Analytická složka		
Ca	%	0,57
P	%	0,60
Na	%	0,27
hrubý protein	%	19,72
hrubé oleje a tuky	%	6,45
hrubý popel	%	4,58
hrubá vláknina	%	3,06
Vitamíny		
vitamín A	m.j.	16.000
vitamín D3	m.j	1.920
Alfatokoferol	mg	154,47
Stopové prvky		
Cu	mg	146,38
Zn	mg	107,27
Mn	mg	70,20
Fe	mg	229,09
I	mg	0,63
Se	mg	0,49
Aminokyseliny		
lyzin	g	14,13
threonin	g	10,24
methionin	g	6,04
tryptofan	g	3,14
Antioxidanty		
buthylhydroxy-toluen	mg	18,47
ethoxyquin	mg	11,98

Přípravek dále obsahuje enzymy:

3-fytáza EC 3.1.3.8.	499,20 FTU
endo-1-4-beta xylanáza	560,90 TXU
endo-1,4 beta-glukanáza	250,40 TGU

Skladování:

Na suchém a chladném místě.

Exspirace:

4 měsíce od data výroby.



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