

OVĚŘENÁ TECHNOLOGIE

**Veterinární dietetický přípravek fortifikovaný
vaječnou hmotou obsahující protilátky
IgY specifické proti
*Clostridium perfringens***

**MVDr. Josef Krejčí
Hana Kudláčková
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D.**

Ověřená technologie 74/2019

**Veterinární dietetický přípravek fortifikovaný vaječnou hmotou obsahující
protilátky IgY specifické proti *Clostridium perfringens***

Autoři:

MVDr. Josef Krejčí

Hana Kudláčková

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 (QJ1510218 a RO0518) a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR NPU-I LO1218.

ISBN 978-80-88233-56-5

Technická dokumentace

Účel použití:

Krmivo sloužící k prevenci nebo podpůrné léčbě průjmu u novorozených selat vyvolaných bakteriemi *Clostridium perfringens*.

Popis výrobku:

Veterinární krmný přípravek, který má vhodné antimikrobiální a imunomodulační účinky sloužící k ochraně hospodářských zvířat, zejména novorozených selat, před průjmy, vyvolanými bakteriemi *Clostridium perfringens* a tím omezení klinické manifestace onemocnění nebo úhynů hospodářských zvířat, zejména novorozených selat.

Jedná se o sušenou směs vhodnou pro mísení s mlékem nebo tekutou mléčnou náhražkou pro individuální perorální podání. Tato směs obsahuje vaječnou melanž, která byla vyrobena z vajec snesených nosnicemi, které byly imunizovány antigeny z bakterie *Clostridium perfringens*.

Podmínky výroby:

Antigen:

Pro imunizaci slepic byly použity bakteriální kmeny:

- *Clostridium perfringens* typ A (CAPM 5744), produkující toxin alfa (cpa), původně izolován ze skotu
- *Clostridium perfringens* typ C (CECT 820), produkující toxin alfa a beta (cpa a cpb), izolován z gangrény ovce

Kultivace:

- vyočkování klostridií na KA5 (krevní agar s 5 % beraní krve), inkubace 24h 37°C anaerobně
- po kontrole čistoty narostlé kultury byly kolonie klostridií smyty a resuspendovány ve 20 ml PBS (phosphate buffer saline)

- úprava optické density na 5°McF (kultivačně odpovídá asi 6×10^7 až 1×10^8 CFU/ml)

Inaktivace:

- Inaktivace bakterií v 8% formaldehydu 1 hodinu. Poté 2x promyto v PBS.

Kontrola sterility:

- Po inaktivaci bakterií bylo provedeno kontrolní vyočkování 250 μ l suspenze na KA5 pro aerobní i anaerobní kultivaci
- Kontrola nárůstu bakterií po 48 hod. a po 72 hod.

Celobuněčný lyzát bakterií *C. perfringens* typ A a *C. perfringens* typ C byl připraven sonikací při 90% amplitudě pulzně po dobu 12 minut na ledu na přístroji Sonopuls HD 3100 (Bandelin, Německo).

Imunizace:

Intramuskulární imunizace nosnic ve věku 16 týdnů.

Imunizační dávka obsahuje bakteriální lyzát z $2,7 - 2,9 \times 10^9$ CFU na jedno zvíře.

den 0	antigeny + 50 % Freundova kompletního adjuvans
den 28	antigeny + 50 % Freundova inkompletního adjuvans
den 56	antigeny + 50 % Freundova inkompletního adjuvans
den 86	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 μ g/ml ve vazném karbonátovém pufru pH 9,6; 100 μ l / 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

Návod k přípravě veterinárního dietetického přípravku fortifikovaného vaječnou hmotou

- Sušená doplňková mléčná krmná směs pro selata do odstavu (hlavní složky: sušená syrovátka a sójový proteinový koncentrát) se smíchá se sušenou vaječnou melanží v objemu 5 % celkového váhového objemu směsi.
- Směs se naředí podle návodu výrobce.
- Perorální individuální aplikace v objemu 2-3 ml podle velikosti selete 3x denně po dobu 3 dnů.

Skladování:

Sušený dietetický přípravek na suchém a chladném místě.

Přípravek smíchaný do mléčné náhražky v chladničce 24 hodin

Exspirace:

Sušený dietetický přípravek 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